

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

CUANTIFICACIÓN EN TIEMPO REAL DE LA SUBUNIDAD
HTERT (TELOMERASE REVERSE TRANSCRIPTASE) DEL
GEN DE LA TELOMERASA EN PLASMA DE PACIENTES
CON CÁNCER COLORRECTAL

ROBERTO RIPOLL MARTÍN

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2007

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 5 de Juliol de 2007 davant un tribunal format per:

- D. Estebán Morcillo Sánchez
- D. Francisco Sánchez Bueno
- D. Carlos Julián Ciudad Gómez
- D. Rafael Calpena Rico
- D. Eduardo García Granero Ximénez

Va ser dirigida per:

D. Salvador Lledó Matoses

D. Salvador F. Aliño Pellicer

©Copyright: Servei de Publicacions

Roberto Ripoll Martín

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6946-3

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Artes Gráficas, 13 bajo

46010 València

Spain

Telèfon: 963864115

UNIVERSITAT DE VALENCIA



FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

TESIS DOCTORAL

**“CUANTIFICACIÓN EN TIEMPO REAL DE LA SUBUNIDAD hTERT
(TELOMERASE REVERSE TRANSCRIPTASE) DEL GEN DE LA TELOMERASA EN
PLASMA DE PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL”**

Presentada por:

ROBERTO RIPOLL MARTÍN

Dirigida por:

Prof. D. Salvador Lledó Matoses

Prof. D. Salvador F. Aliño Pellicer

VALENCIA

2006

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

CUANTIFICACIÓN EN TIEMPO REAL DE LA SUBUNIDAD hTERT
(TELOMERASE REVERSE TRANSCRIPTASE) DEL GEN DE LA TELOMERASA
EN PLASMA DE PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL

ROBERTO RIPOLL MARTÍN

UNIVERSITAT DE VALENCIA

2006

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de Tesis:

El Prof. Salvador Lledó Matoses, Jefe de Servicio de Cirugía, magnífico cirujano, avalado por su gran trayectoria profesional, de cuyas enseñanzas he tenido el privilegio de aprender. Por su gran ayuda y colaboración en todo momento, por su nivel científico, sin su empuje y constancia nunca hubiese sido posible la realización de esta Tesis.

El Prof. Salvador Aliño Pellicer, por su inestimable ayuda en la concepción y desarrollo de la investigación que contiene esta Tesis. Su compromiso y dedicación han hecho posible la culminación de esta investigación en una realidad escrita.

Quiero dar las gracias de manera muy especial al Prof. Eduardo García-Granero Ximenez, Jefe de sección de la Unidad de Cirugía Colorrectal y excelente cirujano, pero sobretodo gran persona, amigo y compañero. Por su gran dedicación y apoyo en todo momento, por todas las facilidades para disponer de los pacientes y la recogida de muestras, y en especial por estar siempre ahí en los momentos personales más difíciles tendiéndome una mano. Gracias por tu desinteresada ayuda.

A todos los componentes de la Unidad de Cirugía Colorrectal del H.C.U.V: Los Dres. P. Esclapez, A. Espí, J. García Armengol y la Sta. Tina, por haberme proporcionado todas las facilidades, orientaciones y apoyo en la confección de esta Tesis.

A Paco Dasí y sus colaboradores del laboratorio del Departamento de Farmacología de la Universitat de Valencia, por la proporción y realización del método de investigación presentado en esta Tesis, animándoles a continuar con su labor investigadora, imprescindible para llevar a cabo los avances de la medicina actual.

A las enfermeras del quirófano de Cirugía: Stas. M^a Teresa, Concha, Chelo y Amparo, por su colaboración en la recogida de muestras de los pacientes.

A las enfermeras de la sala de Cirugía; en especial Concha, Rosa, Salvador, Pepe, M^a José, Victoria, Marga, etc..., por su ayuda desinteresada en la recogida de muestras de los controles y pacientes.

A mi madre y difunto padre,
a quienes se lo debo todo en la vida

A mi esposa Eva,
por estar siempre a mi lado

ÍNDICE

ÍNDICE	1
INTRODUCCIÓN	7
1. - PATOGENIA DEL CÁNCER COLORRECTAL.....	14
2. - BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER: GENÉTICA Y CÁNCER COLORRECTAL.....	16
2.1. Mecanismos moleculares subyacentes a estas anomalías genéticas.....	17
2.2. Mecanismos de activación oncogénica.....	18
2.3. Genética y cáncer Colorrectal.....	20
2.4. Cáncer colorrectal: Hereditario y esporádico.....	26
2.5. Papel del oncogen K-ras.....	31
3. - MARCADORES TUMORALES EN EL CÁNCER COLORRECTAL.....	34
4. - TELÓMEROS; ESTRUCTURA Y FUNCIÓN.....	38
5. - TELOMERASA; BIOLOGÍA, FUNCIÓN E IMPLICACIONES CLÍNICAS.....	41
5.1. Antecedentes e historia.....	41
5.2. Biología de la telomerasa.....	43
5.2.1. Actividad enzimática.....	43
5.2.2. Organización del gen hTERT.....	48
5.2.3. Regulación de la telomerasa.....	49
5.3. Métodos analíticos de la telomerasa.....	53
5.4. Implicaciones clínicas de la telomerasa en el cáncer.....	55
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	60
MATERIAL Y MÉTODOS	63
1. - SELECCIÓN DE PACIENTES.....	64
2. - OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	67
3. - PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	68
4.- DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN hTERT: TRANSCRIPCIÓN INVERSA. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	72
5.- DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD TELOMERASA EN TEJIDOS.....	77
6. - ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	79

6.1. Análisis descriptivo.....	79
6.2. Análisis bivariante.....	79
6.3. Análisis multivariante.....	80
6.3.1. Sensibilidad, especificidad y curva ROC.....	83
RESULTADOS.....	86
1.- NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD hTERT DEL GEN DE LA TELOMERASA EN PLASMA.....	87
1.1. Expresión del hTERT _N en el grupo de pacientes con CCR.....	87
1.2. Expresión del hTERT _N en el grupo control.....	90
1.3. Comparación entre los dos grupos.....	93
2.- VARIACIONES DE LA EXPRESIÓN DEL hTERT CON RESPECTO AL SEXO EN LOS DOS GRUPOS.....	96
3.- RELACIÓN DE LAS CIFRAS DEL hTERT CON LOS VALORES PREOPERATORIOS DEL ANTIGENO CARCINOEMBRIÓNARIO (CEA) EN EL GRUPO DE PACIENTES.....	97
4.- VARIACIONES DE LA EXPRESIÓN DEL hTERT CON RESPECTO A LA EDAD EN AMBOS GRUPOS.....	103
5.- CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DEL hTERT Y EL ESTADIO TUMORAL DE LOS PACIENTES:.....	107
5.1. Comparación de los niveles de expresión del hTERT _N y CEA entre los pacientes con y sin metástasis hepáticas y ganglionares.....	112
6.- RELACIÓN ENTRE LAS CIFRAS DEL hTERT Y EL GRADO DE DIFERENCIACIÓN TUMORAL.....	114
7.- RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD TELOMERASA EN TEJIDOS TUMORALES Y DE MUCOSA SANA DE COLON.....	117
8.- SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL hTERT _N COMO PRUEBA DIAGNÓSTICA.....	119
DISCUSIÓN.....	122
1.- RELACIÓN DE LA ENZIMA TELOMERASA EN EL DESARROLLO DE CÁNCER.....	125
2.- COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DEL hTERT EN PLASMA ENTRE EL GRUPO CON CCR Y EL GRUPO CONTROL.....	130

3.- ANÁLISIS DE LOS VALORES DEL hTERT EN FUNCIÓN DE VARIABLES DEMOGRÁFICAS.....	135
3.1. Sexo.....	135
3.2. Edad.....	135
4.- CORRELACIÓN ENTRE CIFRAS ELEVADAS DE CEA PREOPERATORIO Y VALORES AUMENTADOS DEL hTERT DE LOS PACIENTES.....	137
5.- ANÁLISIS Y CORRELACIÓN DEL hTERT EN FUNCIÓN DE VARIABLES ANATOMOPATOLÓGICAS.....	139
5.1. Estadio tumoral.....	139
5.2. Diferenciación tumoral.....	141
6.- ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD TELOMERASA EN TEJIDOS: TUMOR Y MUCOSA DE COLON.....	143
7.- SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL hTERT EN EL ESTUDIO. IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LA INHIBICIÓN DE LA TELOMERASA.....	144
CONCLUSIONES.....	148
BIBLIOGRAFÍA.....	151

ABREVIATURAS

AZT: Ácido timidina

CCR: Cáncer Colorrectal

CCHNP: Cáncer Colorectal Hereditario No Poliposico (Síndrome de Lynch)

CEA: Antígeno Carcinoembrionario

ddG: Didesoxiguanosina

DEL: Delección

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

Gen GAPDH: Gen que codifica la encima glutaraldehido fosfato
deshidrogenasa

ETM: Exéresis Total del Mesorrecto

H.C.U.: Hospital Clínico Universitario (Valencia)

hTERT: Gen que expresa la subunidad catalítica de la telomerasa humana

hTERT_N: Gen que expresa la subunidad catalítica de la telomerasa humana
normalizado

hTR: Gen que expresa el molde de RNA complementario del telómero

LIE: Lesión intraepitelial escamosa

mRNA: Ácido Ribonucleico mensajero

MMR: Genes reparadores del DNA

ODNs-AS: Oligonucleótidos Antisentido

PCNA: Proliferative cell nuclear antigen

PAAF: Punción aspiración con aguja fina

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PSA: Antígeno específico prostático

RNA: Ácido Ribonucleico

ROC: Response Operating Characteristic

rpm: Revoluciones por minuto

RT: Transcripción inversa

RT-PCR: Transcripción inversa-Reacción en cadena de la polimerasa

qRT-PCR: RT-PCR cuantitativa

VPH: Virus papiloma humano

TAG-72: Glicoproteína-72 asociada a tumor

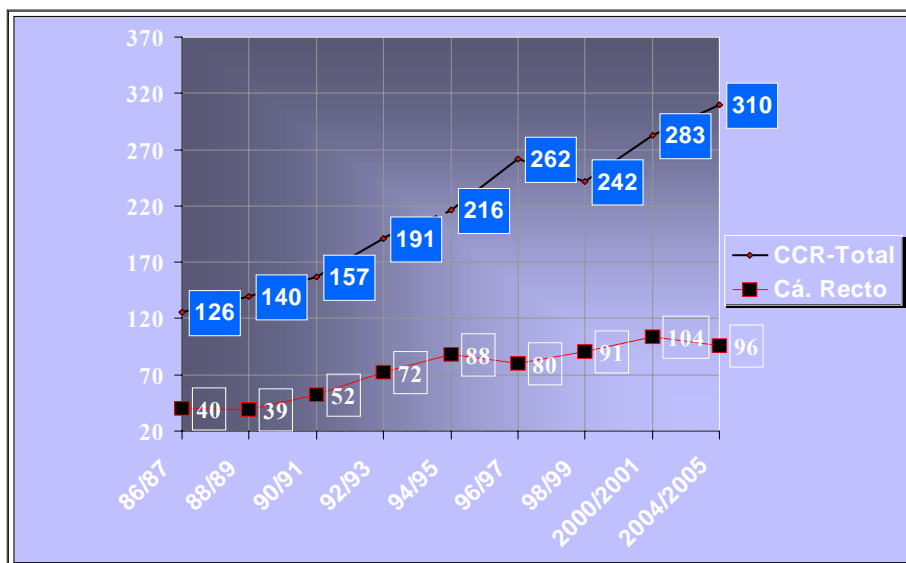
Tg: Tiroglobulina

TP₁: Glicoproteína asociada a telomerasa

TRAP: Telomerase Repeat Amplification Protocol

INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal es actualmente una de las causas de muerte más frecuente. De hecho, supone la tercera causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer de pulmón, siendo el segundo tumor en frecuencia si incluimos ambos sexos en nuestro país. Solamente en la Comunidad Valenciana se diagnostican entre 1200-1300 casos de cáncer colorrectal anualmente. En el año 1990 este tumor fue el responsable de 800 muertes en esta comunidad¹. Actualmente en el Servicio de Cirugía del Hospital Clínico Universitario de Valencia se intervienen a más de 280 nuevos casos anuales, y los pocos datos fiables de nuestro entorno siguen arrojando incidencias crecientes en los últimos años². En la figura – 1 se muestra la incidencia ascendente que tiene este tumor en nuestra actividad quirúrgica:

Figura 1. - Incidencia de CCR en pacientes operados en el HCU: 1986-2005.

Todo ello indica que la repercusión desde el punto de vista médico y social del cáncer colorrectal, constituye hoy un desafío que justifica cualquier planteamiento de investigación, encaminado a mejorar los resultados de nuestra actuación en estos pacientes de tan alta prevalencia en nuestro medio. Se ha avanzado mucho en cuanto al conocimiento del genoma y las diferentes mutaciones implicadas en el cáncer colorrectal, pero también en cuanto a su tratamiento, tanto quirúrgico como el de quimio y radioterapia, con lo que en la actualidad poseemos diversas armas en la lucha contra dicho cáncer.

En la mejoría de los resultados alcanzados en el manejo del cáncer colorrectal, ha contribuido de forma significativa el tratamiento quirúrgico, cuyos principales logros se pueden resumir en las siguientes acciones:

1. Introducir una nueva técnica y táctica quirúrgicas en el tratamiento de estos pacientes, sobretodo en el tratamiento quirúrgico del cáncer de recto.
2. Implicación de los cirujanos para impulsar el manejo multidisciplinario en este tipo de cáncer, especialmente en los tratamientos adyuvantes y neoadyuvantes.

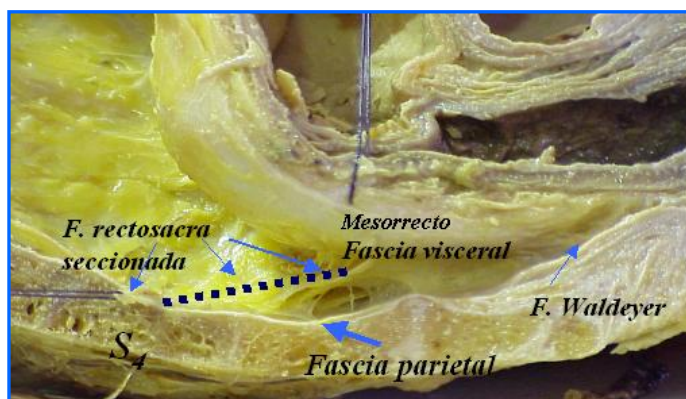
3. Asimismo, el cirujano no ha sido ajeno a los avances desde el punto de vista epidemiológico, etiopatogénico y diagnóstico. Se ha participado en los estudios de cribaje, en la incorporación de nuevas tecnologías para mejorar la estadificación sobretodo preoperatoria (ultrasonografía endorrectal, RNM, etc.), investigación de nuevos marcadores tumorales, y finalmente, en la implicación en los estudios genéticos y de biología molecular, tanto en los cánceres colorrectales esporádicos como en los hereditarios.

Durante la última década, con la introducción de renovados y nuevos conceptos anatómicos, la evidencia del impacto pronóstico de los implantes mesorrectales distales al tumor, así como la infiltración circunferencial mesorrectal de esta neoplasia, han cambiado la táctica y técnica quirúrgica de la exéresis del cáncer de recto. Sin embargo, uno de los problemas más difíciles de resolver, ha sido y es el difundir una depurada y exquisita técnica quirúrgica, que requiere la exéresis de este cáncer^{3,4}. En nuestra experiencia, como medio importante de aprendizaje ha sido volver a los estudios de disección anatómica en pelvis tanto masculinas como femeninas de cadáveres⁵. En las figuras 2 y 3 se muestran algunos de los detalles anatómicos claves, estudiados por nuestro grupo, para una correcta ejecución quirúrgica de estos pacientes.

Figura 2. - Pelvis de mujer en cadáver: Se muestra la disección del mesorrecto.



Figura 3. - Pelvis de cadáver: Se muestra la disección del mesorrecto y sus fascias.



Gracias a ello, uno de los progresos actuales de la cirugía del cáncer de recto, viene condicionado por la adopción y la correcta realización de la exéresis total del mesorrecto (EMT), siendo la cirugía ideal del cáncer de recto con preservación de esfínteres para casi el 90% de los pacientes. Ello, ha llevado a una reducción media de las recidivas locales del 19% al 6% a expensas de la concentración de pacientes, la especialización y la creación de unidades de cirugía colorrectal, incrementándose con ello la supervivencia. En las figuras 4, 5, 6 y 7 se muestra la evolución^{6,7} de los resultados de nuestros pacientes.

Figura 4. - Incidencia proporcional del cáncer de recto en relación con el cáncer de colon en el HCU: 1986-2005.

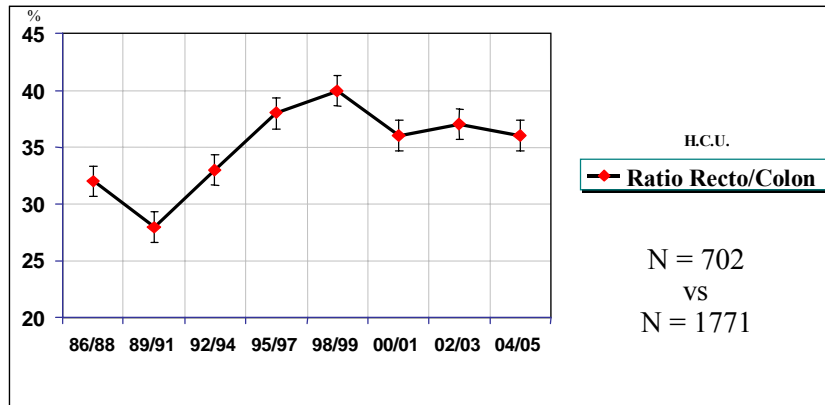


Figura 5. - Cáncer de recto de tercio medio (1986-2005): Evolución de la cirugía con preservación de esfínteres.

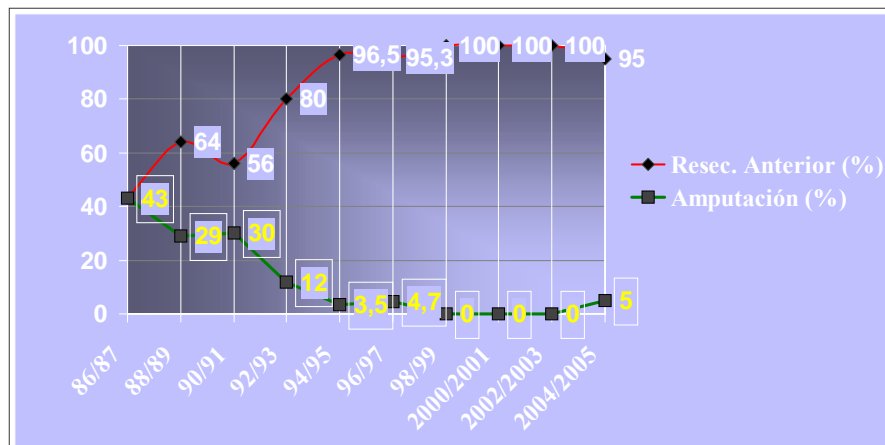


Figura 6. - Cáncer de recto de tercio inferior (1986-2005): Evolución de la cirugía con preservación de esfínteres.

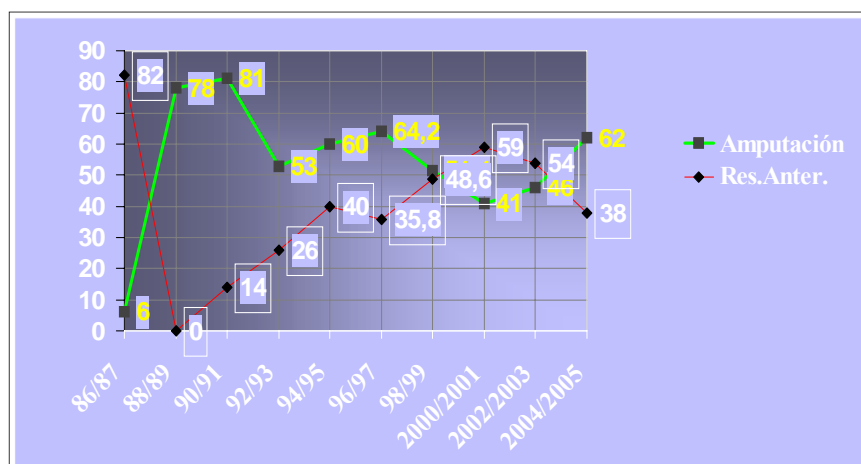
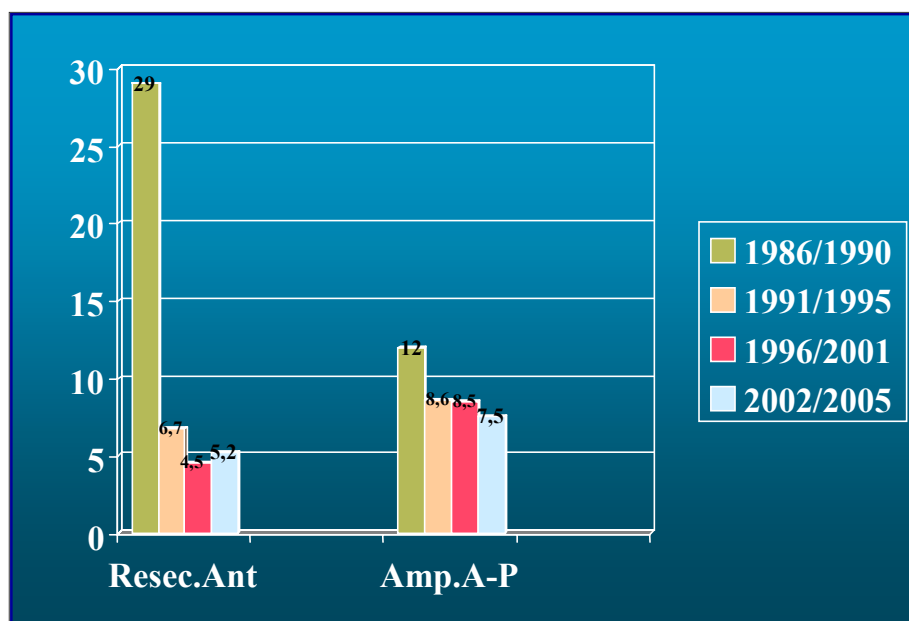


Figura 7. - Cáncer de recto (1986-2005): Evolución de las recidivas loco- regionales.



Las razones que justifican este hecho son: El diagnóstico precoz mediante endoscopia, programas de cribaje⁸ en los pacientes de alto riesgo (mayores de 50 años, antecedentes familiares de CCR, colitis ulcerosa), mejoría de la técnica quirúrgica, mejores cuidados pre-intra-postoperatorios y mejoría en los criterios de diagnóstico y estadificación. Esta mejoría de resultados se aprecia en los tumores con extensión local o regional. La supervivencia, tras la cirugía considerada curativa, está marcada por el desarrollo de recidivas tanto locales como a distancia^{9,10}. Existe una fuerte relación entre la recidiva local y la supervivencia. En resecciones consideradas como curativas la tasa de supervivencia a los 5 años varía del 40 al 80% en función de la tasa de recidiva local obtenida por cada cirujano¹¹. Hermanek¹² ha realizado un cálculo de la frecuencia de muertes por cáncer en relación a la frecuencia de recidiva local. Con un control local de la enfermedad del 100%, las muertes por cáncer serán de un 17%; un control local del 95%, condiciona una mortalidad por cáncer del 20%; y con un control del 80%, ocurrirán un 31% de muertes por cáncer. Por tanto, para disminuir las muertes en este tipo de cáncer, el primer paso debe ser conseguir un control adecuado de las cifras de recidiva local, por lo que el tratamiento eficaz implica a medio plazo una reducción de la tasa de recidivas locales y a largo plazo un incremento de la supervivencia.

1. - PATOGENIA DEL CÁNCER COLORRECTAL:

Uno de los aspectos que más interés ha despertado en los últimos años, ha sido la identificación de los defectos genéticos en el CCR. Sin embargo, la patogenia de esta enfermedad continúa obedeciendo a complejas interrelaciones entre la configuración genética y su entorno medioambiental.

Los factores etiopatogénicos implicados en este tipo de cáncer son los siguientes (figura-8):

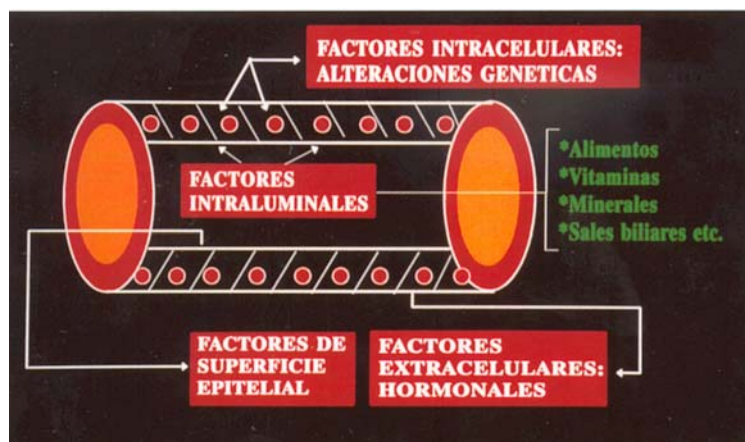


Figura 8. - Factores patogénicos en el CCR.

A) FACTORES INTRALUMINALES: Los hábitos alimenticios y la ingesta de ciertas sustancias químicas influyen claramente sobre el epitelio colorrectal, favoreciendo el desarrollo de adenomas y cáncer, entre ellos cabe destacar:

1. Hábitos dietéticos con ingesta abundante de carnes y grasas, así como carbohidratos refinados.
2. Ingesta deficiente de fibra vegetal.
3. Diversas vitaminas y sales minerales han demostrado, sobretodo a nivel experimental, un efecto protector sobre la formación de adenomas y CCR. La vitamina D tiene efecto sobre el retraso del crecimiento celular, las vitaminas A, C y E, así como el selenio, se consideran también factores de protección por sus efectos antioxidantes y citoprotectores.

B) FACTORES EXTRACELULARES: Se conoce el efecto de ciertas hormonas, algunos estudios han demostrado mayores concentraciones de gastrina en pacientes portadores de adenomas y/o CCR, de la misma manera en pacientes acromegálicos (hormona del crecimiento), se ha visto que tienen mayor incidencia de pólipos y CCR. Se ha constatado que un 70% de mujeres con cáncer de colon poseen receptores estrogénicos positivos.

C) FACTORES SOBRE LA SUPERFICIE DEL EPITELIO INTESTINAL: Se ha estudiado la relación entre la enfermedad inflamatoria intestinal crónica y el CCR. La colitis ulcerosa evolucionada se considera como enfermedad de alto riesgo, probablemente la inflamación reiterada sobre el epitelio, pudiera explicar la displasia epitelial y el desarrollo posterior de carcinoma, aunque también se ha visto que en estas enfermedades también confluyen factores intraluminales semejantes al cáncer esporádico.

D) FACTORES INTERCELULARES; GENÉTICOS Y HEREDITARIOS: En los últimos 15 años, el CCR ha resultado ser uno de los tumores más estudiados desde el punto de vista genético. La posibilidad que brinda la secuencia adenoma-cáncer y su fácil accesibilidad endoscópica, ha permitido el estudio de los cambios genotípicos que van desde la mucosa normal y la hiperplasia, hasta el cáncer invasor, pasando por los diversos tipos evolutivos del adenoma: tubular, túbulo-velloso y velloso^{13,14}. Asimismo, la existencia de formas hereditarias de este cáncer¹⁵, asociadas o no a la poliposis adenomatosa familiar, ha facilitado el desarrollo de una hipótesis genética en el proceso de carcinogénesis colorrectal.

2. - BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER; GENÉTICA Y CÁNCER COLORRECTAL:

Como hemos mencionado, durante los últimos años se han realizado progresos muy importantes en el conocimiento de las bases biológicas y bioquímicas del cáncer. Así, los conocimientos del cáncer, como proceso patológico se han visto reforzados por la consideración del cáncer como un trastorno genético adquirido. En efecto, las alteraciones genéticas parecen desempeñar un papel esencial en la oncogénesis. Existen diversos datos que apoyan esta conclusión:

1. Se han encontrado diversos ejemplos de grupos familiares con tipos histológicos específicos de tumores.
2. Las anomalías cromosómicas incluidas en la línea de células germinales confieren un mayor riesgo de desarrollar ciertos tipos de cáncer (por ejemplo, leucemia en la trisomía 21).
3. Con frecuencia, los tumores presentan reagrupamientos somáticos específicos que afectan a cromosomas o a genes (por ejemplo, leucemia mieloide crónica).
4. La disminución de la capacidad para reparar las lesiones del ADN secundarias a la acción de mutágenos se acompaña de un aumento en el riesgo de neoplasia (por ejemplo, xeroderma pigmentosa).
5. La capacidad de los distintos agentes para mutar el ADN y su capacidad para actuar como carcinógenos está estrechamente relacionada.
6. Las mutaciones o expresión no regulada de determinados genes pueden convertir células que se comportan normalmente, en células que se comportan de forma maligna.

2.1. MECANISMOS MOLECULARES SUBYACENTES A ESTAS ANOMALÍAS GENÉTICAS:

a) **Oncogenes**: Son genes que pueden producir transformación maligna cuando se expresan de forma inadecuada debido a mutación, a ampliación, o a nueva disposición. Los protooncogenes son los genes normales que desempeñan un importante papel en la proliferación y diferenciación celular normales, pero que son susceptibles de ser mutados y convertirse en oncogenes, provocando la aparición de cáncer. En la mayor parte de los casos codifican factores de crecimiento, receptores, u otras moléculas implicadas en las vías de transducción de la señal, o factores que regulan la transcripción génica. Es importante destacar que para los protooncogenes es suficiente la activación de uno de los dos alelos para alterar la fisiología celular, lo que permite clasificarlos como de actuación dominante. El número de protooncogenes identificados hasta ahora sobrepasa los 50, y se cree que podrían alcanzar los 100.

b) **Antioncogenes o genes supresores de tumores**: Actúan inhibiendo el crecimiento celular, una categoría relacionada de estos genes están implicados en la génesis tumoral cuando se pierden o inactivan. La transformación maligna debida a genes supresores es recesiva, de forma que ambos alelos deben alterarse. Sin embargo, puede parecer que estos genes tengan un patrón de herencia dominante debido a que un alelo puede estar borrado constitucionalmente o debido a que el producto del gen anormal puede inactivar al del gen normal, como ocurre en el caso de p53. Este gen parece actuar como “policía molecular” o “guardián del genoma”, de modo que impide la progresión del ciclo celular cuando el ADN se ha lesionado por radiación, quimioterapia, u otros agentes. En efecto, una de las funciones más importantes de p53 es la de actuar como guardián de la integridad genómica. Cuando las células sufren algún daño génico, p53 detiene el ciclo celular al final de la fase G1, para que no se replique el genoma hasta que se haya reparado la mutación. En el caso de que las alteraciones sean muy graves, p53 pone en marcha los mecanismos de apoptosis (muerte celular programada) para impedir que se perpetúen defectos en la población celular. Puede con ello advertirse fácilmente el enorme riesgo que corren las células cuyo p53 es inactivo o inexistente, de acumular mutaciones en genes clave para la proliferación y transformarse en células cancerosas.

2.2. MECANISMOS DE ACTIVACIÓN ONCOGÉNICA:

1. Mutación puntual: Lleva apareado el cambio de una única base, que a su vez cambia un aminoácido. Esto parece ser suficiente para modificar la conformación de la proteína de manera que altera el metabolismo celular y predispone a la célula a la transformación maligna. Este hecho solo ocurre cuando la mutación puntual afecta a una región crítica de la molécula. El ejemplo clásico lo proporcionan los genes ras, que se encuentran activados por este mecanismo en el 30% de los cánceres humanos.
2. Reordenamiento genético: Es el sustrato molecular de las alteraciones que se observan en los tumores con traslocaciones cromosómicas. El ejemplo más importante es la traslocación 9:22 encontrada en la leucemia mieloide crónica. En este caso, el oncogen abl está truncado y yuxtapuesto a un gen denominado bcr en otro cromosoma.
3. Delección: La delección de porciones de un gen puede conducir a una expresión o una función aberrante. Esto es lo que ocurre con erbB1, el gen que codifica el factor de crecimiento epidérmico.
4. Amplificación: El oncogén se replica múltiples veces, bien en forma de copias cromosómicas repetidas secuencialmente o de partículas extracromosómicas. La amplificación génica origina a menudo la sobreexpresión del producto génico, y esta puede desencadenar una proliferación celular anormal. Este parece ser el caso del gen N-myc en los neuroblastomas.
5. Inserción de un virus en un cromosoma: La expresión inoportuna de un oncogen puede ser consecuencia de la inserción de un genoma vírico en un cromosoma celular, de forma que el protooncogen se encuentre bajo el control transcripcional de la secuencia regulada del virus.
6. Pérdida o inactivación de antioncogenes: La elevada frecuencia de determinados cánceres en ciertas familias, sugiere que exista una predisposición genética hacia esas enfermedades. Un ejemplo de este fenómeno se presenta en el retinoblastoma, asociado a la herencia de una

copia del cromosoma 13 que presenta la delección de un determinado segmento, dicho segmento contiene el gen Rb que codifica un factor que reprime la proliferación celular incontrolada; el producto del gen Rb actúa como supresor tumoral, siendo por lo tanto antioncogén.

En relación con la inactivación de genes supresores de tumores se han descrito mecanismos de mutagénesis similares a los de la activación de los oncogenes. La diferencia principal proviene del hecho de que en este caso es necesario inactivar ambos alelos, y este requerimiento a menudo significa que hay una combinación de mecanismos en el proceso. El hallazgo más común incluye la delección completa de uno de los alelos y la delección parcial del otro. Otras combinaciones frecuentes son la delección con mutación puntual, la mutación puntual seguida de no disyunción y la mutación puntual que se acompaña más tarde de conversión génica o de recombinación mitótica.

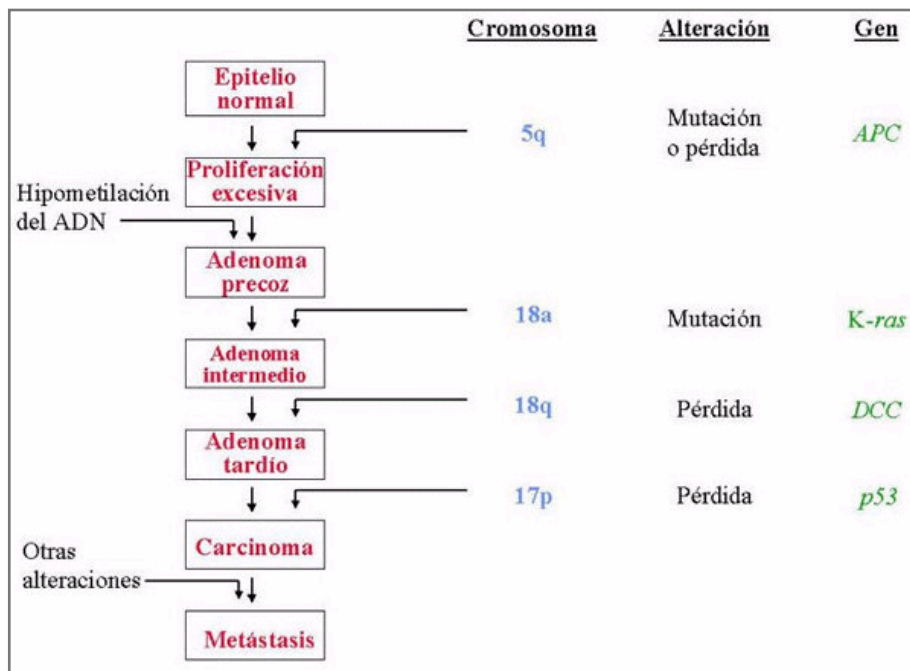
Los factores capaces de originar mutaciones pueden ser exógenos o endógenos. Los factores exógenos incluyen agentes físicos (radiaciones), químicos (tabaco, citostáticos) y biológicos (virus). Como se ha visto, los procesos endógenos están relacionados con la maquinaria enzimática responsable de la replicación y del mantenimiento de la fidelidad en el ADN celular.

Actualmente se acepta que el cáncer es un proceso multifásico (Figura-9), considerando este concepto, el cáncer puede definirse operativamente como una enfermedad desencadenada por la acumulación de alteraciones genéticas.

Experimentos descritos sugieren que estas alteraciones tienen que acumularse en un grupo específico de genes responsables del control de la proliferación celular, estos son los oncogenes y los genes supresores de tumores, de manera que estas investigaciones concluyen que la patogenia del cáncer es la subversión de los mecanismos celulares de proliferación por la acumulación de alteraciones genéticas en los oncogenes y en los genes supresores de tumores. Con ello, se sustenta más la hipótesis según la cual el componente hereditario en el cáncer tiene un papel más importante de lo que se pensaba a raíz de los estudios realizados en los gemelos univitelinos. Esto podría explicarse si se considera que lo que se hereda es la predisposición al cáncer, y aunque esta sea igual en dos gemelos univitelinos, es

imposible que su interacción con el ambiente haya sido idéntica. Por lo tanto, la estrecha interrelación entre los componentes genéticos y ambiental tiene fundamental importancia para explicar el origen del cáncer.

Figura 9. - El cáncer como un proceso multifásico.



2.3. GENÉTICA Y CÁNCER COLORRECTAL:

Los cirujanos siempre han sido protagonistas de los grandes avances médicos. Tanto el desarrollo de antisépticos y antibióticos, la fisiopatología del shock y la transplantología contaron con el indispensable aporte de los cirujanos. En este nuevo milenio es el desarrollo genético el que ofrece una nueva oportunidad para continuar con esta tradición. Si bien la profundidad de la biología molecular probablemente sea de interés para unos pocos, el conocer sus bases se hace cada vez más necesario en la práctica diaria.

El cáncer colorrectal es desde hace muchos años el modelo sobre el cual se basó la mayor parte del conocimiento de la carcinogénesis y probablemente el más relevante dado sus implicaciones prácticas. Si bien, el 80% de los pacientes con cáncer colorrectal no tienen antecedentes familiares, aproximadamente entre un 8 y 10% tienen familiares

afectos y entre un 4 y 8 % presentan formas hereditarias. Los procesos en biología molecular han aclarado de manera importante los conocimientos sobre la fisiopatología de la aparición de cáncer colorrectal (CCR). La identificación de las alteraciones genéticas esenciales durante el desarrollo de dicho cáncer, tiene además aplicación clínica práctica en la elaboración de las pruebas diagnósticas presintomáticas, las pruebas pronósticas y los sitios novedosos potenciales de tratamiento específico del tumor¹⁶.

Existen multitud de estudios que apuntan que el CCR se genera como resultado de una acumulación de mutaciones de genes específicos que controlan la división celular, la apoptosis y las reparaciones del DNA, y que estos factores genéticos, tienen una interacción directa con los factores dietéticos y otros de tipo ambiental, así como estados inmunológicos del huésped. Por todo ello, nos tenemos que involucrar en estos estudios genéticos y de biología molecular, si queremos participar en los avances del imprescindible manejo multidisciplinar de los pacientes con este tipo de tumor.

En el CCR, se produce una progresión del tejido normal a adenoma y de éste a un carcinoma invasivo, debido a la acumulación de expansiones clonales de una serie de alteraciones genéticas^{17,18}, necesitándose al menos cinco alteraciones somáticas para llegar al fenotipo invasivo¹⁹. Las mutaciones pueden ser heredadas (mutaciones germinales) o adquiridas (mutaciones somáticas). La acumulación de estas alteraciones genéticas en el epitelio colónico requiere algunos años, normalmente décadas, y esto está de acuerdo con la edad media de los pacientes diagnosticados de cáncer colorrectal que suele ser de alrededor de los 65-70 años.

Existe consenso en que el requisito para adquirir el número de mutaciones necesarias para el desarrollo tumoral es el establecimiento de una inestabilidad genética. Actualmente se reconocen 2 tipos de inestabilidad genética:

1. *Inestabilidad cromosomal*: es la asociada a la pérdida o ganancia de gran parte o todo un cromosoma produciendo la denominada pérdida de heterocigocidad. El mecanismo preciso de esta inestabilidad se desconoce. Entre los genes más conocidos habitualmente involucrados están el APC (5q), el p53 (17p) y el DDC (18q). Esta forma de inestabilidad es la implicada en la gran mayoría de los CCR esporádicos y en la poliposis adenomatosa familiar²⁰.

2. *Inestabilidad microsatélite*: El reconocimiento de otro tipo de camino en la secuencia adenoma-carcinoma estuvo directamente relacionado con la caracterización del Síndrome de Lynch. Los microsatélites son una parte de los genes sin función conocida, formados por secuencias de bases cortas repetitivas que están predispuestas a que durante la replicación del ADN se produzcan errores de apareamiento de bases (“errores de replicación”). Estos errores son reparados por complejos de proteínas codificadas por los denominados genes reparadores (hMLH1, hMLH2, hMLH6, hMSH3, hMPS1, hMPS2). Cuando estos genes adquieren mutaciones que alteran su funcionamiento, se produce una acumulación de errores que alargan o acortan los microsatélites. A este estado se le denomina inestabilidad microsatélite. La disfunción de los genes reparadores produce un estado de hipermutabilidad en el resto de genes que controlan el ciclo celular y predispone a una secuencia adenoma-carcinoma acelerada. Este fenómeno biomolecular explica por que la secuencia adenoma-carcinoma (que en las formas esporádicas implica un periodo de 8 a 10 años) se ve reducida a 1-3 años²¹.

Se puede decir que las alteraciones que confieren ventajas proliferativas sobre una célula específica que va a dar lugar a un CCR y a otros cánceres, pueden ser de varios tipos:

a) Por un estímulo; oncogen activado:

Aparte del oncogen K-ras pocos oncogenes se han visto implicados en el CCR. Un porcentaje pequeño de tumores colorrectales muestran mutaciones en Myc, Myb o Nev²². Independientemente de las mutaciones puntuales, otro mecanismo por el cual se activan los protooncogenes es por un aumento de su expresión. En el CCR se ha detectado sobreexpresión de C-myc, C-myb, C-erb/nev y de ciclinas D y E.

El oncogen K-ras se encuentra en el cromosoma 12p, y la mutación más frecuente es la del aspártico del codón 12, y en menor medida la del aspártico del codón 13, el primero se relaciona con la aparición de cáncer en edades más tempranas (promedio de 58 años), y el segundo de forma más tardía (promedio de 77 años).

b) Por inactivación del gen supresor; fallo de los factores frenadores:

En la carcinogénesis colorrectal, hay que destacar la gran importancia que tienen los genes supresores, cuya función es la de inhibir la proliferación celular. Hasta la fecha han sido localizados los genes supresores en los siguientes cromosomas:

1. *Deleción del brazo largo del cromosoma 5:* Se han encontrado pérdidas alélicas (de un alelo) del cromosoma 5q en el 20-30% de los tumores colorrectales esporádicos, que ocurre tanto en tumores benignos pequeños como tumores malignos. Por otro lado, se vió por estudios citogenéticos, que los pacientes con poliposis adenomatosa familiar presentan una deleción en el cromosoma 5q. El gen APC se encuentra mutado en la línea germinal de los pacientes con poliposis adenomatosa familiar^{23,24}, y en los tumores colorrectales esporádicos²³, cerca del 20% de los mismos, se caracterizan por pérdida de la heterocigosidad (pérdida de un alelo en el DNA tumoral a causa de la supresión de dicho segmento) en esta región. Dicho gen se debe utilizar como factor diagnóstico de la poliposis adenomatosa familiar, pero también es importante en los tumores colorrectales esporádicos²⁵. Powell y cols.²³ estudiaron todo el gen APC en pacientes con CCR esporádico y observaron que el 60% de estos tumores presentan mutaciones somáticas de este gen. Se encuentra el mismo porcentaje de mutaciones tanto en tumores benignos (adenomas, 29-63%) como en los malignos (60%), este hecho es diferente al que ocurre en otros genes como ras, p53 o DDC, en los cuales su frecuencia aumenta con la progresión del tumor. Aunque está claro que el gen APC tiene un papel en la FAP y en los tumores esporádicos, sin embargo, hasta la fecha muchas de sus funciones no están claras. Se puede decir que el gen APC controla el crecimiento celular por distintos mecanismos, entre ellos la regulación de la adhesión celular, el mantenimiento de la actina y microtúbulo, los componentes del citoesqueleto y el procesamiento de múltiples mecanismos de señalización celular incluyendo a aquellos envueltos en la progresión del ciclo celular y en la apoptosis. De manera global podemos concluir que como las mutaciones APC son frecuentes y de

incidencia equivalente en los adenomas y en los carcinomas, parecen desempeñar una función importante en el desarrollo temprano del CCR esporádico.

2. Deleción del brazo largo del cromosoma 17; pérdida del gen p53: El gen p53 se encuentra localizado en el cromosoma 17p13 y codifica a una fosfoproteína nuclear que ejerce una influencia negativa sobre la proliferación celular. Se trata del gen supresor más ampliamente implicado en casi todos los tumores humanos²⁶. Se ha visto que las pérdidas alélicas localizadas en 17p están asociadas con las mutaciones puntuales de p53. Estas pérdidas alélicas son infrecuentes en los adenomas, sin embargo aparecen en un 70% de los carcinomas, por lo cual la pérdida de función del gen p53 se asocia a la transición de un adenoma benigno a carcinoma²⁷. En las neoplasias colorrectales clasificadas según estadio, se ha visto también que las pérdidas alélicas del cromosoma 17p son más frecuentes en los carcinomas avanzados, estando dicha pérdida asociada a la diseminación tumoral²⁸. Por lo tanto, en ciertas neoplasias la inactivación del gen p53 puede estar implicada en la progresión más que en la transformación tumoral. La mutación puntual del gen p53 se ha descrito aproximadamente en el 30-40% de los carcinomas colorrectales²⁹, variando estas cifras según autores. Con frecuencia esta mutación da lugar a una proteína de mayor estabilidad, que se acumula en los núcleos de la célula maligna y puede detectarse por ensayos inmunohistoquímicos, encontrándose la sobreexpresión de dicha proteína en el 40-70% de los cánceres colorrectales³⁰, aunque se ha comprobado que no siempre que la proteína está sobreexpresada es debido a la existencia de mutaciones del gen^{31,32}. El valor pronóstico de p53 varía de unos autores a otros, encontrándose por lo general menor supervivencia en aquellos pacientes con sobreexpresión de la proteína o con mutaciones puntuales en el gen³³.
3. Expresión del gen p27: Estudios recientes muestran la implicación de este gen supresor en los mecanismos de carcinogénesis. Loda y cols.³⁴ estudiaron la expresión de p27 en 149 carcinomas colorrectales,

encontrando que los pacientes que expresaban p27 tenían una supervivencia media de 151 meses, mientras que los pacientes con baja expresión o sin expresión, la supervivencia media era de 69 meses. La pérdida de p27 se asocia con mal pronóstico, particularmente en pacientes con estadio II, por lo tanto, su estudio podría ayudar a seleccionar los pacientes en los cuales sería beneficioso una terapia adyuvante.

4. Delección del brazo largo del cromosoma 18; delección del cáncer cólico o gen DCC: Aproximadamente entre un 60-80% de los cánceres colorrectales presentan pérdidas alélicas en este cromosoma³⁵. El gen DDC se clonó en esta región y se trata de un gen supresor³⁶, sintetizando una proteína que tiene una gran homología estructural con la molécula de adhesión celular. La relación entre mutaciones en el gen DDC y la pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 18, no es tan directa como la existente entre las pérdidas de heterocigosidad en el 17p y mutaciones en p53 o las de 5q y el gen APC. De manera global, se puede concluir que la pérdida del gen DDC es una alteración tardía que puede participar en el progreso del cáncer colorrectal como consecuencia de cambios en la adherencia celular.
5. Mutación del gen MCC: Se trata de una secuencia específica localizada en el brazo largo del cromosoma 5, próximo al gen APC. Se encuentra deletado en las mismas alteraciones genéticas que producen las pérdidas alélicas en el locus de APC. Sin embargo, la significación de estas deleciones no están claras aunque se le implica cierta responsabilidad en el desarrollo de cánceres esporádicos, identificándose una mutación somática en cerca del 6% de casos de CCR³⁷. Dicho gen codifica para una proteína de 829 aminoácidos que al igual que la proteína APC tiene una similitud con la miosina y otras proteínas filamentosas.

c) Genes reparadores:

Es otra de las alteraciones que pueden dar lugar a la proliferación celular. Los tumores de esta vía se caracterizan por la alteración de uno o más genes reparadores del DNA (MMR), de manera que cuando están mutados alteran los mecanismos de asegurar la fidelidad en la replicación del DNA, produciendo mutaciones en protooncogenes y en genes supresores de tumores. Las células con deficiencia en los genes MMR pierden la capacidad de reparar debidamente los errores que ocurren espontáneamente durante el proceso de replicación del DNA, y por ello acumulan mutaciones que afectan sobre todo a las secuencias microsatélites. De ahí, que los tumores que pertenecen a este denominado fenotipo “mutador” presenten un patrón molecular característico conocido como alta inestabilidad de microsatélites. A esta clase pertenecen los genes responsables de la susceptibilidad al cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis (CCHNP) en algunas familias. Se ubican en el cromosoma 2p16(hMSH2) (40-50%), y en el cromosoma 3p21-23(hMLH1) (30-40%). En estudios más recientes, se han descrito dos nuevos genes implicados: el hMPS1 en 1q31-33 con una incidencia del 5-10% y el hPMS2 en el cromosoma 7p22 con una incidencia del 5-10%. Se sugirieron alteraciones en estos genes al identificarse inestabilidad de microsatélites del DNA proveniente de células tumorales de pacientes con CCR.

2.4. CÁNCER COLORRECTAL: HEREDITARIO Y ESPORÁDICO:

Las mutaciones anteriormente descritas y relacionadas con el CCR, pueden estar presentes como defectos hereditarios de la extirpe germinal, o se originan en las células somáticas, secundariamente a lesiones ambientales. Atendiendo pues a estas dos formas de mutaciones, hoy en día podemos clasificar el cáncer colorrectal en:

1. - CCR esporádico.
2. - CCR hereditario:

Existen dos síndromes principales asociados a una mayor predisposición; los casos restantes, se atribuyen al denominado CCR esporádico:

2.1. Síndromes de poliposis múltiple familiar hereditaria:

2.1.1. Poliposis adenomatosa familiar: Se trata de una enfermedad de transmisión autosómica dominante con desarrollo de pólipos adenomatosos en el colon durante la segunda y la tercera décadas de la vida. Los pólipos son histológicamente idénticos a los que preceden al CCR esporádico y, si bien individualmente presentan bajo riesgo de transformación maligna, el riesgo de CCR alcanza el 100% a los 40 años. Se pueden detectar mutaciones del gen productor en familiares no sintomáticos, con una sensibilidad del 100%.

Se han descrito también otras variedades de poliposis, en función de asociaciones diversas a lesiones extradigestivas. El llamado *síndrome de Gardner*, en el que se asocian fibromas desmoides, osteomas y exostosis óseas, y el *síndrome de Turcot*, en el que la asociación se da a neoplasias malignas del sistema nervioso central, así como la *poliposis adenomatosa gastrointestinal diseminada*, se incluyen dentro de esta denominación, pues el trastorno génico es común³⁸. El gen APC, causante de este síndrome, se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 5. En condiciones normales codifica la síntesis de proteínas inhibitoras del crecimiento celular, de forma que los pacientes portadores de la mutación carecen de esta inhibición y quedan predispuestos al crecimiento neoplásico. En la poliposis adenomatosa familiar esta mutación se hereda (80%) o se adquiere en la concepción (20%), de forma que siempre implica a todas las células del organismo, y el estímulo hiperproliferativo y neoplásico es global, aunque se manifiesta de forma predominante en la mucosa colónica.

La poliposis adenomatosa familiar es la forma más común de síndromes de poliposis hereditaria, siendo aún así rara, aceptándose que el cáncer colorrectal asociado a estos síndromes no llega a suponer el 1% de los cánceres colorrectales globalmente considerados.

2.1.2. Poliposis hamartomatosas:

- Síndrome de Peutz-Jeghers: Consiste en un síndrome hereditario autosómico dominante con alto grado de penetrancia, en el que se asocian pólipos múltiples hamartomatosos en el intestino y una pigmentación mucocutánea que se caracteriza por máculas de color marrón oscuro o negro, agrupadas alrededor de la boca, en los labios, en la mucosa lingual y palatina, alrededor de los ojos y orificios nasales³⁹.

Los pólipos se localizan preferentemente en la porción superior del intestino delgado, pero pueden encontrarse también en estómago y colon, desarrollándose habitualmente en la adolescencia. Se ha encontrado también una asociación a cánceres extraintestinales, de páncreas, mama y ovario.

- Poliposis juvenil: Se trata de una entidad poco frecuente que se confundió inicialmente con la poliposis adenomatosa familiar hasta que se demostró su naturaleza hamartomatosa. Su transmisión es de carácter autosómico dominante y algunas veces, se asocian malformaciones como cardiopatías congénitas, hidrocefalia, malrotaciones intestinales, paladar hendido y polidactilia. La incidencia de CCR en los afectos de este síndrome es superior al de la población normal, habiéndose estimado un riesgo del 70% a los 60 años⁴⁰.

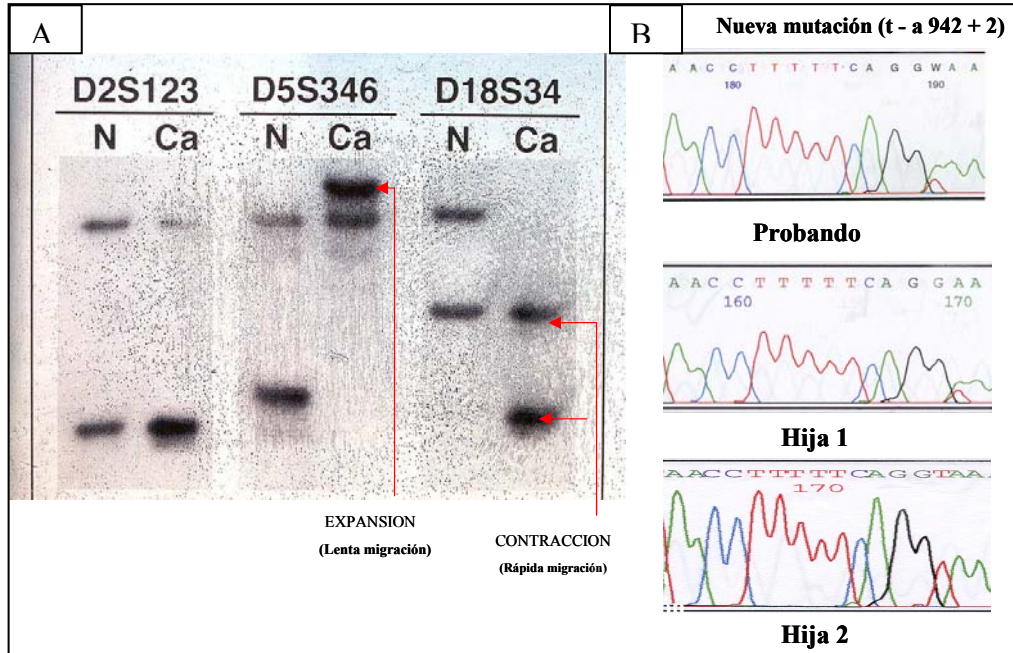
2.2. Cáncer colorrectal hereditario sin poliposis:

2.2.1. Cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis (CCHNP) o síndrome de Lynch:

Se trata de un trastorno genético transmitido de forma autosómica dominante cuya manifestación fenotípica es la aparición en una misma familia de cáncer de colon asociado a otros tumores entre los que se encuentran los cánceres de endometrio, ovario, mama, estómago, intestino delgado, páncreas, vías biliares, uréter y pelvis renal. Aunque

no hay una idea clara sobre la incidencia de CCHNAP, se estima que oscila entre el 2 y el 5% de todos los CCR². Todavía existen dudas sobre los criterios diagnósticos más adecuados y la prevalencia de las mutaciones en esta enfermedad. La investigación de todo el genoma de pacientes con CCHNAP se ha realizado por medio de análisis de relación con unos marcadores de DNA llamados “microsatélites de repetición”. Estos marcadores son una secuencia corta de di o trinucleótidos que se hallan dispersos por todo el genoma y presentan gran variabilidad entre individuos sanos, se repiten un número variable de veces y se hallan repartidos en múltiple número de copias en todos los cromosomas y pueden encontrarse dentro o fuera de los genes. Se sugirieron alteraciones de estos genes al identificarse inestabilidad de microsatélites (figura-10) del DNA proveniente de pacientes con cáncer colorrectal, la inestabilidad de microsatélites se presenta hasta en el 86% de los tumores CCHNP, pero solo en el 15% de los tumores esporádicos. Mediante esta técnica se detectaron los genes implicados. La mutación para los genes MLH1(35%) y MSH2(40%), son los genes de reparación de errores de DNA más importantes implicados y los más estudiados desde el punto de vista clínico y que han demostrado ciertas diferencias fenotípicas, junto con MPS1(5-10%) y MPS2(5-10%). Además debe haber otros genes en otros casos de CCHNAP, ya que solo el 20-70% de las familias que cumplen criterios diagnósticos estrictos de CCHNAP se detectan las mutaciones conocidas⁴¹. La estimación sobre la penetrancia en el CCHNAP sugiere que el riesgo de padecer un cáncer colorrectal en individuos con mutaciones a lo largo de toda su trayectoria vital oscila entre el 80-85%, aunque el riesgo puede ser inferior en las mujeres que en los varones. Por otra parte, el riesgo de padecer cáncer de endometrio en las mujeres portadoras de mutaciones está entre el 50-60%¹⁴.

Figura 10. - (A) Estudio de inestabilidad de microsatélites en paciente sospechosa de CCHNP. (B) Análisis por secuenciación de las mutaciones de los genes implicados.



2.2.2. Síndrome hereditario pólipo-cáncer colorrectal: En muchos pacientes con CCR aparentemente esporádico, se ha encontrado una predisposición hereditaria para desarrollar adenomas y cáncer². Esta predisposición se hereda con carácter dominante pero con baja penetración. Este síndrome se ha definido en base a las observaciones de estudios concretos sobre familiares de pacientes con pólipos o cáncer de localización y patocronia similar al esporádico. Así, en el trabajo de Burt y cols.² de 1985 en Utah, se encontraron la presencia de adenomas o cáncer en un 21% de familiares de primer grado, incidencia significativamente mayor que en el grupo de familiares no consanguíneos (cónyuges) que actuó como grupo control (9%). En algunos estudios la penetrancia del gen se ha estimado en un 63% a los 80 años⁴².

2.2.3. *Síndrome de Muir-Torre*: Descrito por primera vez por Muir en 1967 y por Torre en 1968, consiste en un desorden hereditario autosómico dominante que se caracteriza por la presencia de tumores benignos o malignos de piel y glándulas sebáceas, cáncer del tracto gastrointestinal y otros tumores malignos extraintestinales, siendo los más frecuentes los del tracto urinario. El tumor maligno que más frecuentemente se asocia a este síndrome es el colorrectal, con un diagnóstico a una edad promedio de 50 años². Parece ser que guarda relación con mutaciones en el exón 12 del gen MSH2⁴³.

2.4. PAPEL DEL ONCOGEN K-RAS EN EL CÁNCER COLORRECTAL:

Pertenece a la familia de genes ras compuesta por tres proteínas homólogas: K (Kirsten), Ha (Harvey) y N (Neural). La forma más frecuente es la K-ras. Cada una de ellas puede funcionar para traducir señales fisiológicas. Pertenecen a una amplia familia de GPTasas, encargadas de la síntesis proteica y la traducción de señales de crecimiento y diferenciación. Funcionan mediante ciclos binarios, ciclando entre la forma activa, unidas a GTP, y la forma inactiva, unidas a GDP⁴⁴. Los sitios de unión al GTP se encuentran en la porción amino terminal media de la proteína, siendo esta región donde se diferencian unas de otras, determinando los tres tipos existentes.

Se ha visto que las mutaciones de punto sobre los codones 12, 13 y 61 dentro de los genes ras pueden producir transformación celular, presentándolas muchos tumores inducidos por carcinógenos humanos⁴⁵. Entre el 75 y 95% de los cánceres pancreáticos, 50-80% de los carcinomas colorrectales, el 30% de los adenocarcinomas pulmonares y el 25% de las leucemias no linfocíticas, se caracterizan por mutaciones en los genes ras (H-ras, N-ras, K-ras)⁴⁶.

Por lo general, aparece mutado en un tercio de los cánceres y en concreto entre un 40-80% de neoplasias colorectales según series⁴⁷, apareciendo generalmente las mutaciones, como se ha comentado previamente en los codones 12, 13 y 61.

En estudios realizados por Forrester y colaboradores⁴⁸, encontraron mutaciones en el codón 12 del K-ras en el 39% de los cánceres colorrectales primarios. Boss y

colaboradores⁴⁷, hallaron mutaciones en el gen ras en el 41% de los CCR esporádicos, la mayor parte también en el codón 12. Vogelstein³⁵ encontró mutaciones del ras en el 47% de los CCR, el mismo autor, realizó estudios en los adenomas, encontrando mutaciones en el 13% de los adenomas de clase I (adenomas tubulares pequeños) en siete pacientes con FAP, en el 42% de los adenomas de clase II (adenomas que no progresaron hasta carcinomas) y en el 57% de los adenomas de clase III (adenomas con zonas de carcinoma invasivo). De los adenomas mayores de 1cm de tamaño, el 58% tenían mutaciones del gen ras, en comparación con solo el 9% de los adenomas que medían menos de 1cm de diámetro. Capella y cols.⁴⁹ obtuvieron resultados semejantes.

Las mutaciones del gen ras son, por tanto, acontecimientos tempranos en la tumorigénesis, pero probablemente no los primeros porque los adenomas pequeños manifiestan con poca frecuencia estas mutaciones³⁵.

En numerosos estudios se ha intentado determinar la importancia pronóstica de las mutaciones del gen k-ras en el carcinoma colorrectal. Kern y cols.⁵⁰ no encontraron diferencias importantes en la supervivencia entre los pacientes con tumores que tenían mutaciones ras en comparación con los que no las tenían. Otros estudios⁵¹ determinaron la supervivencia a cinco años de pacientes con CCR y mutaciones de dicho gen, siendo de 34 meses, en comparación con 47 meses para los sujetos sin mutaciones.

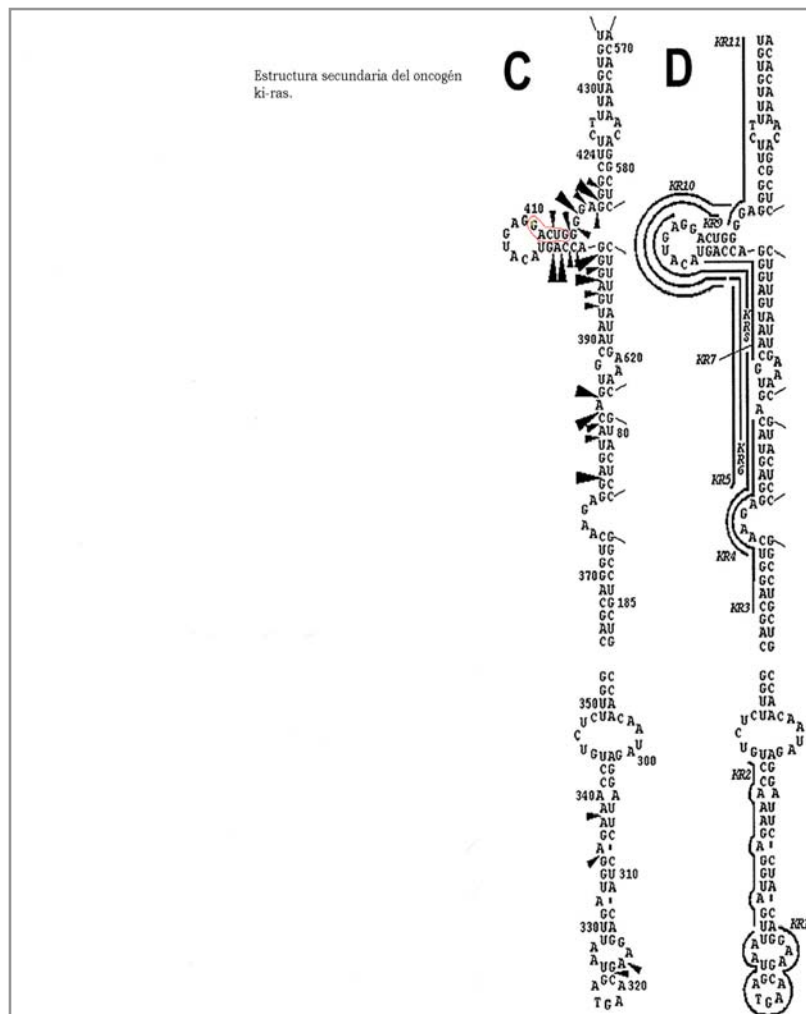
En otros estudios se ha sugerido que las mutaciones específicas del gen k-ras pueden correlacionarse con diferencias en la agresividad biológica. Sin embargo, el número de tumores estudiados ha sido demasiado pequeño para que se puedan poner de manifiesto diferencias convincentes^{52,53,54}. De manera global, parece ser que las mutaciones del gen k-ras pueden tener valor pronóstico en caso de CCR, aunque no ha podido comprobarse así.

El mecanismo por el que dicho gen favorece el crecimiento tumoral en caso de activación, no está del todo bien esclarecido, pero parece estimular la producción de VEGF⁵⁵ (factor estimulador del crecimiento endotelial), de esta forma, la angiogénesis tumoral se ve asegurada y con ello el desarrollo tumoral in situ y a distancia. También está implicado en la migración celular, la diferenciación y mantenimiento del citoesqueleto. Parece ser, que la activación del k-ras sería al menos en parte, responsable del crecimiento incontrolado y de la disminución de los fenómenos

apoptóticos observados en las células de cáncer colorrectal^{56,57}. En la figura-11, se muestra la estructura secundaria del oncogen K-ras.

Finalmente, y en base a todo lo anteriormente expuesto, se puede concluir que la predisposición al cáncer colorrectal probablemente sea poligénica, de tal modo que la identificación de un único cambio genético puede no englobar la totalidad de los pacientes en riesgo, ni justificar por sí mismo el desarrollo tumoral. No obstante, estos marcadores genotípicos constitucionales pueden permitir la identificación de familias o sujetos con mayor probabilidad de padecer un cáncer colorrectal⁵⁸, facilitando un consejo genético o un diagnóstico intrauterino pudiendo llegar a un diagnóstico preclínico de los pacientes antes de que los seguimientos colonoscópicos demuestren las alteraciones fenotípicas con las características formaciones polipoideas.

Figura 11.- Esquema de la estructura secundaria del oncogen k-ras.



3. - MARCADORES TUMORALES EN EL CÁNCER COLORRECTAL:

El conocimiento de los marcadores tumorales actuales surge a partir de 1963, cuando Abeler⁵⁹ demuestra una relación entre una proteína fetal, la alfa-feto-proteína, y el hepatoma. Este autor comprobó que en pacientes con dicho tumor hepático se detectaba una llamativa elevación de aquella sustancia, muy por encima de los valores séricos habituales en individuos sanos, cuya determinación servía de ayuda en el diagnóstico de tales neoplasias. En 1965, Gold y Freedman⁶⁰ aíslan una glicoproteína peculiar en la mucosa intestinal fetal y también en extractos tisulares de cáncer de colon, denominándola “Antígeno Carcinoembrionario” (CEA). A partir de entonces este antígeno oncofetal, detectable también en el suero y en otros líquidos corporales, se convierte en el marcador más utilizado en el estudio de las neoplasias del tracto gastrointestinal. La glucoproteína que constituye el CEA parece estar codificada por un grupo de genes localizados en el cromosoma 19⁶¹.

Los marcadores tumorales pueden detectarse mediante dos métodos: El radioinmunoensayo y el inmunoenzimático. En su detección plasmática influyen diversos factores como son:

- La capacidad de producción, bien tumoral o por una excesiva actividad regeneradora celular.
- La liberación al torrente circulatorio.
- El metabolismo hepático.
- La eliminación renal⁶².

Así pues, procesos inflamatorios de distintas localizaciones pueden, por tanto, conllevar una elevación de estos marcadores tumorales, al igual que puede suceder en caso de insuficiencia renal o en diversas hepatopatías.

Con ello, los objetivos que debería cumplir un marcador tumoral ideal serían los siguientes:

1. Un diagnóstico precoz de la enfermedad neoplásica, incluso en pacientes asintomáticos, por medio de estudios prospectivos de la población.
2. Configurar un valor pronóstico preoperatorio de los pacientes que habrían de ser intervenidos por dicha patología tumoral.

3. La detección precoz de la recidiva tras un tratamiento quirúrgico potencialmente curativo.

Estos objetivos, han ido desvaneciéndose con los resultados de los diversos estudios, así, el CEA, solo se encuentra elevado en el 10-15% de los pacientes con tumores colorrectales inferiores a 4cm^{63,64}. Todo ello, unido a que su ascenso puede darse en otros procesos neoplásicos no intestinales, como el cáncer gástrico, cáncer de páncreas, cáncer de endometrio o el de mama; así como en diversas patologías no neoplásicas, como la pancreatitis aguda, la insuficiencia renal crónica, la cirrosis hepática o la colitis ulcerosa, lo hacen inservible como método diagnóstico específico y precoz de cualquiera de estos tumores, así como en los estudios para un diagnóstico temprano en la población asintomática^{65,66,67}.

Todavía no existe en la actualidad un marcador tumoral ideal, ya que no hay ninguno producido exclusivamente por la célula neoplásica, como tampoco ninguno específico de un determinado tipo tumoral, ni ninguno altamente sensible y sintetizado en cantidad suficiente como para permitir un diagnóstico precoz^{68,69}.

De los últimos marcadores tumorales existentes, los más utilizados en el CCR son: El CEA, el CA 19-9 y el TPA. Su mayor utilidad radica en el seguimiento de los pacientes intervenidos con intento curativo y en el valor pronóstico que pueden comportar⁷⁰. Existen otros marcadores menos difundidos, como la glicoproteína-72 asociada a tumor (TAG-72), cuya determinación resulta complementaria al CEA, aunque no se ha demostrado que su utilización en el seguimiento de los pacientes sea más ventajosa que la de este último.

Con respecto al CEA, en relación al seguimiento postoperatorio de los pacientes, los resultados de su empleo pueden no ser gratificantes, ya que hay que tener en cuenta una serie de consideraciones^{71,72}:

1. El 20-30% de los pacientes con recidiva cursan con cifras normales de CEA.
2. En el 30% de los pacientes, la elevación del CEA no precede a la aparición clínica de la recidiva.
3. Pueden existir elevaciones transitorias, sin una recurrencia implícita demostrable, en al menos el 12% de los pacientes.

4. En casos de siembra peritoneal, el CEA tiene escaso valor, siendo también inferior su utilidad en recidivas poco evolucionadas.
5. Su uso como guía diagnóstica en la recidiva da lugar a un 5-20% de falsos negativos.
6. Globalmente, la elevación del CEA en el grupo de pacientes que recidiva, oscila según las series entre el 20-70%.
7. Pueden existir variaciones en los niveles después de la radio o quimioterapia sin que ello implique modificación del estado neoplásico del paciente.

Resulta controvertido hasta que punto es decisiva la participación de los marcadores tumorales para el rescate de pacientes en quienes se diagnostica una recidiva. A modo de ejemplo, en un estudio prospectivo no randomizado, la supervivencia de los reintervenidos por las modificaciones del CEA fue muy similar a la de los reoperados en base a las manifestaciones clínicas (37% vs. 34%), aunque la resecabilidad fue mayor cuando las cifras de CEA se mantuvieron inferiores a 11ng/ml⁷³. La elevación del CEA precede a las manifestaciones clínicas de la recidiva en más de la mitad de los casos, alcanzando incluso el 79% en algunas series⁷⁴.

A pesar de que el número de pacientes con recidiva que puede considerarse curado gracias al uso del CEA no es cuantitativamente elevado, sin embargo, precisamente es el grupo de los pacientes asintomáticos, con elevación de CEA, y estudios diagnósticos de imagen negativos (un 12% del total), el que resulta más beneficiado de entre todos los que presentan recidiva. Así lo manifiestan unas tasas superiores de resecabilidad (62.5% vs. 34.5%) y una mayor supervivencia a los 5 años (50% vs. 15%)⁷⁵.

Aunque es cierto que los valores preoperatorios de CEA son significativamente inferiores en aquellos pacientes con recidiva resecable, la dispersión numérica resulta tan amplia, que invalida el sustentar o no la resecabilidad en base a dicha cifra exclusivamente⁷⁶. Así, en ausencia de contraindicaciones quirúrgicas basadas en la historia clínica o en los métodos diagnósticos de imagen, la decisión sobre la resecabilidad habrá de tomarse en el transcurso de la cirugía, con independencia del valor del marcador tumoral.

Valores bajos de CEA no implican poseer un tumor pequeño, sin embargo, valores muy elevados sí suelen traducir la existencia de un tumor importante, invasivo o metastásico, aún cuando no exista una correlación directa CEA-tamaño tumoral, en todo caso, el CEA preoperatorio parece tener un valor pronóstico independiente⁷⁷, siendo superior la probabilidad de recidiva entre aquellos pacientes con CEA preoperatorio mayor a 5ng/ml⁷⁸.

En algunas series, se han encontrado un índice de recidivas del 64.5% en los pacientes con CEA preoperatorio elevado que no se normaliza tras la cirugía, siendo del 25.9% entre aquellos en los que si se constata una normalización de sus valores. Por tanto, las cifras preoperatorias de CEA pueden identificar pacientes con mayor riesgo de recidiva⁷⁹.

La detección inmunohistoquímica del antígeno MAM-6, una glicoproteína similar a la mucina, que se expresa en muchos tejidos humanos normales y neoplásicos, pero no en la mucosa cólica normal, puede tener una gran utilidad. El 99.2% de una serie de 123 carcinomas colorrectales exhibieron este antígeno, así como el 61% de los 147 adenomas estudiados y tan sólo el 7% de las 108 biopsias de mucosa colorrectal normal. En los adenomas, el hallazgo se apreció en áreas tisulares altamente displásicas, reflejando en parte la existencia de un carcinoma insitu⁸⁰. Estas peculiaridades pueden tener un gran valor a efectos de un mejor seguimiento y tratamiento de los pacientes con displasias o con adenomas colorrectales.

Finalmente, con los avances de la biología molecular y la posibilidad de amplificación del DNA por técnicas de PCR, la identificación de genes concretos en las cadenas del DNA se ve facilitada por la utilización de moléculas de un cDNA radiactivo, complementario del gen objeto de estudio, al que se une y marca por medio de una emisión radiológica. La obtención de dichas moléculas, con una secuencia de bases inversa a la del gen, es fruto de un complejo proceso en el que se sintetiza cDNA a partir de un mRNA génico conocido con la intervención de una enzima transcriptasa inversa^{81,82}. De esta manera, muchas de las líneas de investigación van encaminadas a la búsqueda de marcadores genéticos que puedan ser detectados cómodamente en sangre, secreciones orgánicas o heces, y susceptibles de ser utilizados como detectores precoces de la neoplasia colorrectal, o de una predisposición a la misma, en estudios de población^{83,84,85}.

4. - TELÓMEROS; ESTRUCTURA Y FUNCIÓN:

Los telómeros son los extremos de los cromosomas de las células eucariotas que protegen los extremos libres del ADN de las fusiones entre un extremo y otro y de la degradación exonucleocítica⁸⁶, de manera que son estructuras importantes para el funcionamiento y la estabilidad de los cromosomas humanos. De hecho, el mecanismo por el que las células saben el número de divisiones que han sufrido, parece depender, por lo menos en parte, de la longitud de sus telómeros.

Durante muchos años se pensó que los extremos de los cromosomas (telómeros) eran estructuras estáticas sin una función determinada, sin embargo, hoy se conoce que en la mayoría de los organismos, los telómeros se acortan y se elongan constantemente. Las primeras descripciones de los telómeros vienen de los trabajos de Muller y McClintock que demostraron la función protectora que proporcionaban dichas estructuras a los extremos de los cromosomas, demostraron que éstos poseían unas estructuras que les conferían estabilidad. Muller los denominó telómeros; del griego “telos” (final) y “meros” (parte). McClintock observó que sin esas estructuras terminales, los cromosomas se pegaban unos a otros y sufrían cambios estructurales que amenazaban la supervivencia y fidelidad de su duplicación y, por tanto, de las células.

No fue hasta los años setenta cuando se determinó la composición de los telómeros en un ciliado unicelular (*Tetrahymena*), estos consistían en una secuencia de nucleótidos muy corta -TTGGGG- que se repetía muchas veces. Posteriormente, se han caracterizado los telómeros de otros organismos y en todos los casos la organización es la misma, secuencias cortas y repetidas en T y G. Por ejemplo, en humanos y ratones la secuencia es -TTAGGG-. Esta secuencia se repite varios de miles de veces hasta expandirse varios kilobases su longitud, por lo tanto, los telómeros constan de DNA repetitivo y de las proteínas a las que se unen⁸⁷ (Figuras-12 y 13).

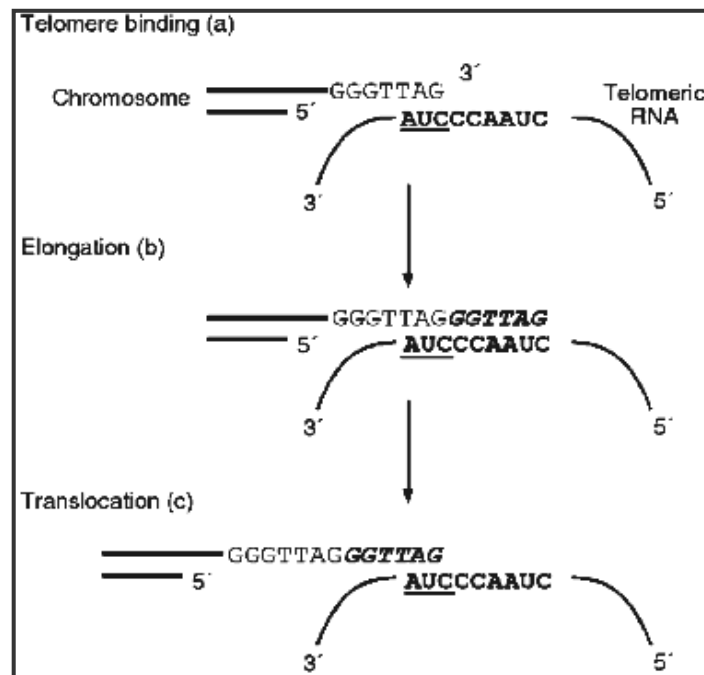
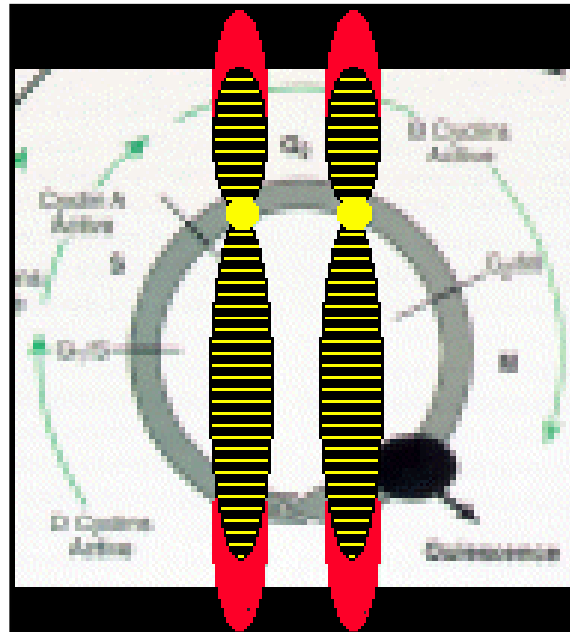
En 1988, Greider y Harley realizando estudios con cultivos celulares, demostraron que el ADN telomérico se acortaba a medida que las células se dividían. En el transcurso de cada ronda de replicación celular, se produce una pérdida de 50-200 pares de bases⁸⁸ con el consiguiente acortamiento telomérico hasta una longitud que coincida con la activación de un mecanismo antiproliferativo denominado estadio 1 de mortalidad (M1). Con ello, el acortamiento de los telómeros funciona como un “reloj mitótico”⁸⁹ y limita la división en las células somáticas a 50-70 veces⁹⁰, lo que

contribuye al envejecimiento celular y en las funciones relacionadas con el control de la duración de la vida de diferentes líneas celulares⁹¹. De manera, que las células con pérdida de DNA telomérico no solo son incapaces de dividirse, sino que no pueden sobrevivir; mueren como resultado de la apoptosis natural.

En varios estudios se ha verificado que la longitud del telómero se reduce en los tejidos tumorales, en comparación con el tejido normal. Al menos dos estudios han demostrado una reducción progresiva de las longitudes de los telómeros al aumentar el estadio de la enfermedad. Counter y cols.⁹² han comprobado el acortamiento progresivo de los telómeros en leucemias y cáncer de ovario. Ohyashiki y cols.⁹³ demostraron una correlación directa entre la longitud del telómero y la progresión del síndrome mielodisplásico hacia la leucemia mieloide aguda. El subgrupo de pacientes con leucemia mieloide aguda que tenían los telómeros más cortos presentaron una incidencia elevada de 5q y la enfermedad fue rápidamente progresiva, con una supervivencia media inferior a un año.

En algunas células, por efecto de varios mecanismos como la inactivación de p53 y pRB (producto génico del retinoblastoma)⁹⁴ se elude la fase M1 y las células pueden continuar dividiéndose hasta que los telómeros se acortan de una manera crítica (fase 2 de mortalidad o M2). En esta fase M2, en numerosas células inmortalizadas, aparece una ADN-polimerasa especializada denominada telomerasa, que utiliza su molde de RNA interno para sintetizar la secuencia telomérica y compensar la pérdida de ADN telomérico debido a la replicación incompleta. Esto evita que se sigan acortando los telómeros, estabiliza su longitud y contribuye a la inmortalización celular. Todo ello sugiere el papel determinante que poseen el complejo telómero-telomerasa en el desarrollo del cáncer^{95,96}.

Figuras 12 y 13.- Secuencia telomérica.



5. - TELOMERASA; BIOLOGÍA, FUNCIÓN E IMPLICACIONES CLÍNICAS:

5.1. ANTECEDENTES E HISTORIA:

La mayoría de células eucariotas están sometidas a un proceso de senescencia (condición donde las células aunque viables y metabólicamente activas, no proliferan) como consecuencia de su incapacidad para dividirse de forma ilimitada. Este proceso parece ser característico de las células somáticas, con la excepción de las células de la línea germinal, de la mayoría de las células tumorales y posiblemente algunas células madre. El número de divisiones que una célula normal puede llevar a cabo antes de envejecer (tabla-1) depende de la especie animal, la edad, las características genéticas del individuo y del tipo celular. El mecanismo por el que las células saben el número de divisiones que han sufrido, parece depender, por lo menos en parte, de la longitud de sus telómeros.

Tabla 1.- Duplicaciones celulares según especie.

<u>Tipo de especie animal</u>	<u>Esperanza de vida en años</u>	<u>Nº duplicaciones celulares</u>
	(In vivo)	(In vitro)
Tortugas Galápagos	175	125
Humanos	120	60
Pollo	30	35
Ratón	3.5	20

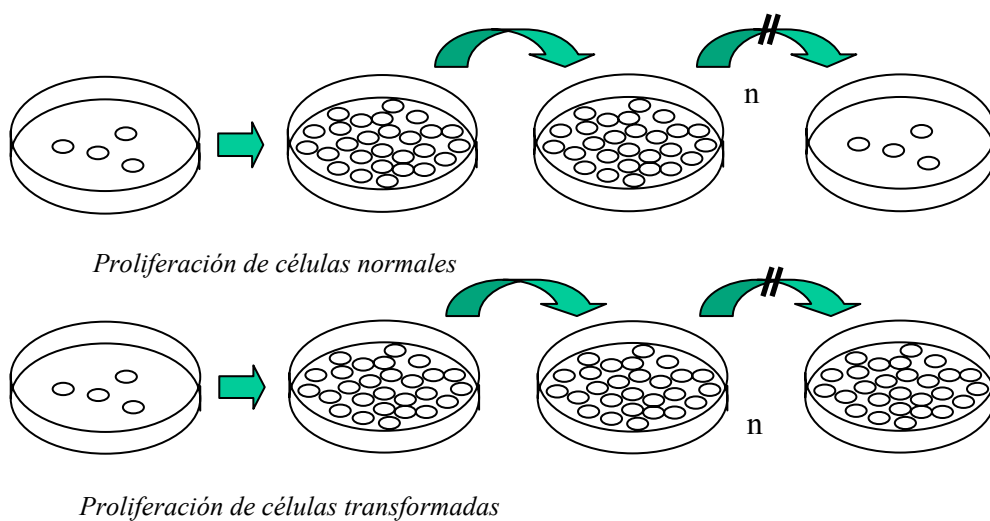
Como se ha comentado previamente, los telómeros se componen de ADN repetitivo y de las proteínas a las que se unen, la identidad y el mecanismo de acción de dichas proteínas, no se conoce en su totalidad. El descubrimiento y caracterización de las ADN-polimerasas condujo a Olkonikow y Watson a plantear el problema de la replicación de los extremos^{97,98}. Observaron que las ADN-polimerasas eran incapaces de copiar en su totalidad los extremos de los cromosomas lineales. La maquinaria de replicación dejaba sin copiar una pequeña región terminal del telómero. Si las células no compensasen esta pérdida de material genético, los cromosomas se acortarían con cada división celular, produciendo la eliminación completa de los telómeros e incluso de algunos genes adyacentes, lo que conduciría a la muerte celular.

La identificación del ADN telomérico y la posterior identificación de la enzima telomerasa que añade las secuencias nucleotídicas a los extremos de los cromosomas, proporcionó los medios para resolver el problema de replicación de los extremos⁸⁷.

En 1984, Carol W. Greider y Elizabeth H. Blackburn consiguieron demostrar la existencia de la telomerasa, una enzima capaz de añadir secuencias teloméricas a telómeros sintéticos⁸⁷ y que debería de ser capaz de elongar los telómeros sin el apoyo de un molde previo de ADN. Posteriormente se encontró telomerasa en otros ciliados, en levaduras, ranas y ratones. En 1989, Gregg B. Morin descubrió la enzima en una línea celular de un cáncer humano. En todos los casos, el componente mayoritario era proteico, y aunque la estructura parece diferir de una especie a otra, todas tienen en común la existencia de una molécula de ARN que contiene el molde nucleotídico (específico para cada especie) necesario para construir las subunidades teloméricas⁸⁷.

Hasta los años 60, se pensaba que las células humanas estaban capacitadas para dividirse indefinidamente, posteriormente, se demostró que no era así, hoy sabemos que las células somáticas procedentes de un recién nacido pueden dividirse en cultivo unas 80 o 90 veces, mientras que las de una persona de 70 años sólo se dividían 20 o 30 veces. Sin embargo, esta limitación no se observa en células tumorales (figura-14) que crecen de forma indefinida en el tiempo.

Figura 14. - Esquema de proliferación de células normales y neoplásicas.



En los años 70, A.M. Olkonikow relacionó el cese programado de la división celular con el problema de replicación de los extremos⁹⁸. Propuso que las células somáticas humanas eran incapaces de corregir el acortamiento cromosómico producido en la duplicación del ADN, la división celular acababa cuando las células advertían que sus telómeros se habían acortado demasiado. De la misma manera, estudios posteriores demostraron que los telómeros de algunos tejidos humanos normales se acortaban conforme el individuo envejecía. Un hecho tranquilizador era que los telómeros de las células de la línea germinal se mantenían intactos. Los resultados sugerían que las células eran capaces de contabilizar el número de divisiones en función del número de repeticiones teloméricas que perdían, y de detener su división cuando los telómeros alcanzaban una longitud mínima crítica. Por extensión se ha propuesto que la ausencia de la capacidad replicativa de las células carentes de telomerasa puede ser una ventaja adaptativa que nos ayuda a evitar el cáncer.

5.2. BIOLOGÍA DE LA TELOMERASA:

5.2.1. Actividad del enzima:

El DNA de las células eucariotas humanas ocupa en el interior del núcleo el espacio definido por una esfera de unas 5 micras de diámetro. Con independencia de la forma y los mecanismos por los cuales el DNA es empaquetado en el núcleo de la célula, la cromatina y/o su organización en forma de cromosomas define claramente dos regiones:

- **Centrómeros**, que son lugares especializados que desempeñan un papel crucial en la distribución correcta de los cromosomas en las células hermanas durante la mitosis.
- **Telómeros**, que son secuencias repetidas de DNA ubicadas en los extremos de los cromosomas y que juegan un papel crítico en la replicación y mantenimiento de su integridad estructural. Dichas secuencias son similares y contienen grupos de residuos guanina sobre una de las cadenas.

Los telómeros, debido a su ubicación en el extremo lineal de la molécula del DNA establecen ciertas limitaciones para realizar la copia final de estas regiones durante la división celular. En este sentido, la DNA-polimerasa es capaz de extender una cadena de DNA que se encuentra en fase de crecimiento pero no puede iniciar la síntesis del extremo terminal de la misma, por su incapacidad para incorporar el primer nucleótido de la nueva cadena de síntesis. Como consecuencia, el extremo de los cromosomas no puede ser replicado por la acción normal de la DNA-polimerasa. Este problema ha sido resuelto en la evolución mediante un mecanismo que implica la enzima telomerasa, cuya actividad reverso transcriptasa permite aplicar las secuencias teloméricas del DNA a partir de un molde de RNA.

El enzima consta básicamente de dos componentes:

1. Un RNA que sirve de molde para las secuencias repetidas.
2. Una subunidad catalítica que actúa como transcriptasa inversa sobre el molde de RNA^{87,99,100,101}.

Aunque su **estructura** se puede dividir en tres subunidades: hTERT, hTR y TP₁:

- La subunidad *hTERT* es la transcriptasa reversa, que permite la síntesis de DNA a partir del RNA contenido en la subunidad hTR. Esta subunidad se ha empleado como marcador del CCR, midiendo sus niveles en plasma¹⁰².
- *TP₁* es la proteína asociada a telomerasa. Consisten en un grupo de ribonucleoproteínas accesorias que están estrechamente involucradas en la regulación de la longitud del telómero¹⁰³.
- La subunidad *hTR* contiene una región de 11 nucleótidos (nucleótidos + 46 hasta + 56)¹⁰⁴ y actúa como plantilla para unión y extensión de los telómeros. Para realizar su función es necesario que sea de cadena única, lo que la hace una diana ideal para los oligonucleótidos.

plantilla de RNA, subunidad hTR
 5'-CTTCTCAGTTAGGGTTAG-3'
 3'-AGUCAAUCCCAAUC-5'

En la figura-15 se muestra la estructura secundaria de la subunidad hTR de la telomerasa humana.

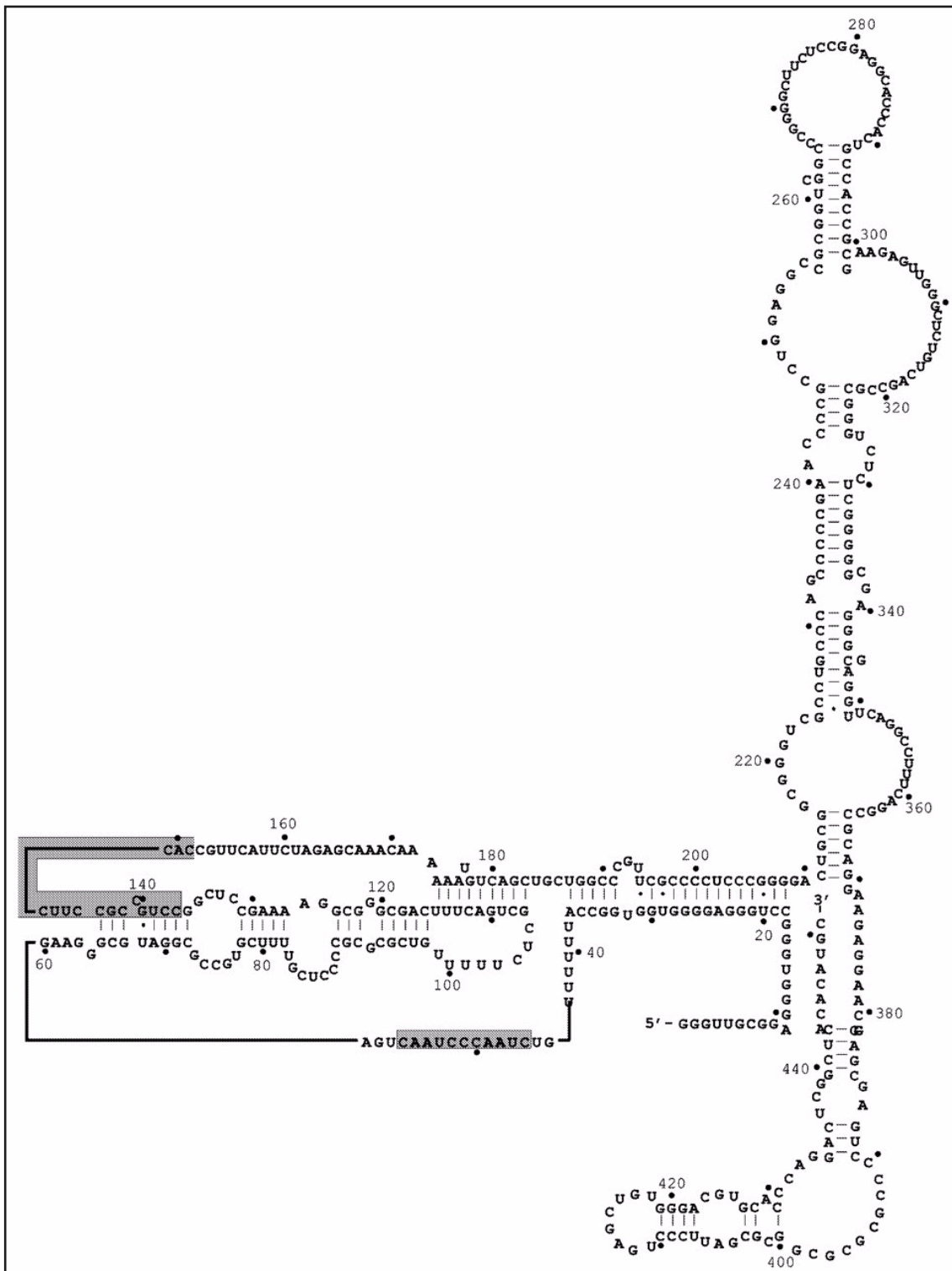


Figura 15.- Estructura secundaria de la hTR humana. La región plantilla (nucleótidos 46-56) está sombreada.

La telomerasa transporta su propio molde de RNA el cual es complementario de las secuencias repetidas del telómero que forma parte del complejo enzimático, constituido por una parte, por la región que transporta el molde del RNA, y por otra la subunidad proteica que dispone de la actividad catalítica enzimática. El uso de este RNA como molde permite a la telomerasa generar múltiples copias de las secuencias repetidas teloméricas gracias a su actividad enzimática, lo que permite mantener los telómeros en ausencia de un molde convencional de DNA que dirija esta síntesis.

La telomerasa humana se acompleja a una secuencia de nucleótidos de RNA que incluye la secuencia 3'-AAUCCCAAU-5'. Esta secuencia es complementaria de la región telomérica repetida (5'-TTAGGG-3') y sirve como molde para la síntesis de DNA telomérico. El uso de este RNA como un molde permite a la telomerasa extender en una unidad repetida, el extremo 3' del DNA cromosómico por encima de su longitud original. La cadena complementaria puede después ser sintetizada por la acción consecutiva de la RNA polimerasa, que sintetiza una corta secuencia de RNA (cebador) necesario para que la DNA polimerasa pueda alongar la cadena. La eliminación posterior del RNA cebador deja un extremo 3' sobresaliente en el DNA cromosómico el cual puede ser nuevamente extendido, por la acción de nuevo de la telomerasa y así sucesivamente.

Con la clonación y caracterización del RNA de la telomerasa¹⁰⁵ (hTR) y de la subunidad catalítica^{106,107} (hTERT) se ha demostrado utilizando líneas celulares, que existe una correlación entre la expresión del gen hTERT, (aunque no del hTR), y la actividad enzimática^{108,109,110}. Estos datos sugieren que hTERT puede ser el factor limitante en relación con la actividad telomerasa.

Actualmente, se propone que además de esta función, la telomerasa puede ser necesaria para proteger los extremos de los cromosomas de modo que no sean reconocidos como roturas de ADN que pondrían en marcha la maquinaria de parada del ciclo celular y/o apoptosis. Esta idea concuerda con recientes hallazgos que demuestran la expresión transitoria de telomerasa a niveles bajos durante la fase S del ciclo celular en células somáticas humanas no transformadas¹¹¹.

A modo de resumen, la DNA-polimerasa es capaz de extender una cadena de DNA que se encuentra en fase de crecimiento, en sentido 5'-3', pero no puede iniciar la síntesis de una nueva cadena en un extremo terminal de la cadena lineal de DNA

porque no puede incorporar el primer nucleótido de la nueva cadena de síntesis. Para ello, la telomerasa actúa como una DNA-polimerasa, pero es una transcriptasa reversa que puede sintetizar ese DNA a partir de un molde de RNA. La telomerasa transporta su propio molde de RNA, que es complementario de las secuencias repetidas del telómero. El mecanismo de acción de la telomerasa puede verse resumido en la figura-16.

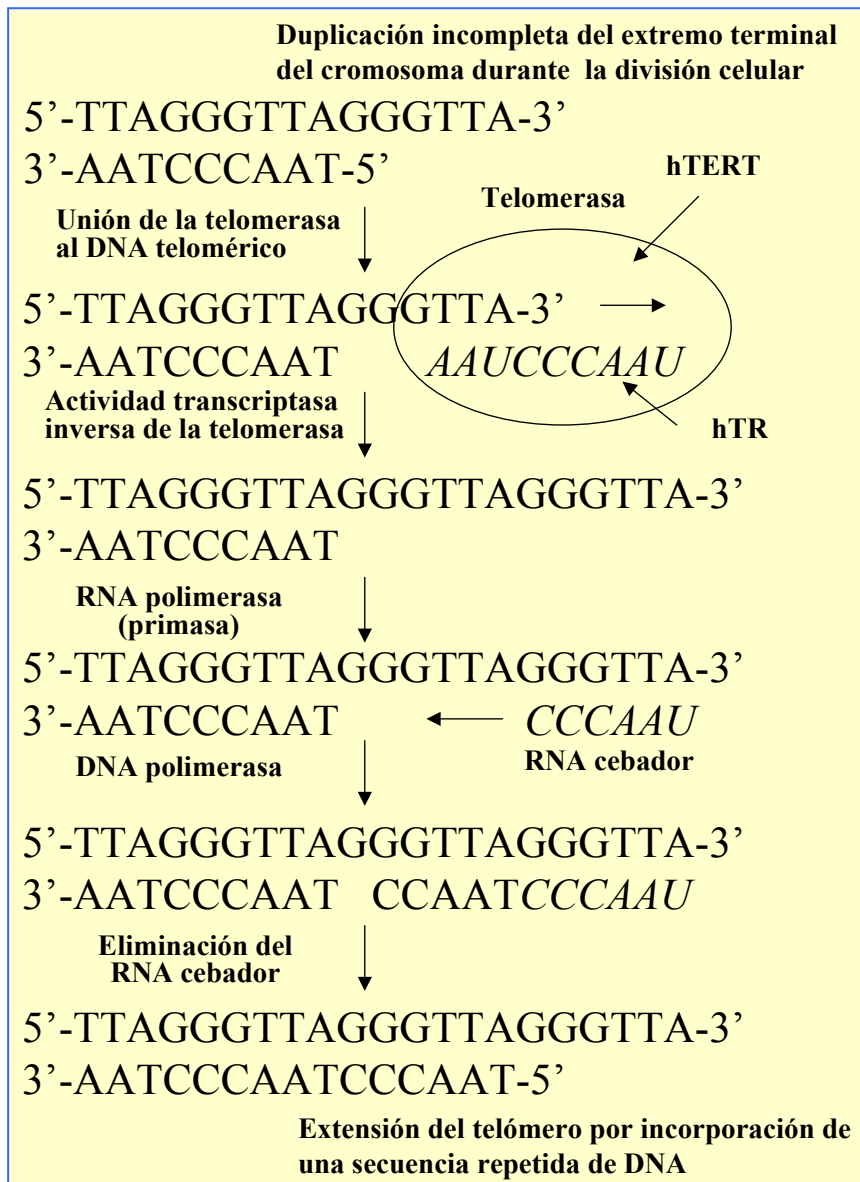


Figura 16. - Mecanismo de acción de la telomerasa.

5.2.2. Organización del gen hTERT:

El gen que codifica la subunidad catalítica responsable de la actividad transcriptasa inversa de la telomerasa, se encuentra en 5p15.33¹¹² y está constituido por 16 exones y 15 intrones y en su variante de longitud completa, origina una proteína de 1132 aminoácidos^{104,113,114,115}. El exón 1 contiene el codón de iniciación ATG mientras que el exón 16 contiene un codón de terminación TGA junto con una región 3'-terminal no transcrita. En la figura-17 se indica la localización de los exones implicados en la actividad transcriptasa inversa. El gen que codifica la subunidad hTR se encuentra en 3q26.3¹¹².

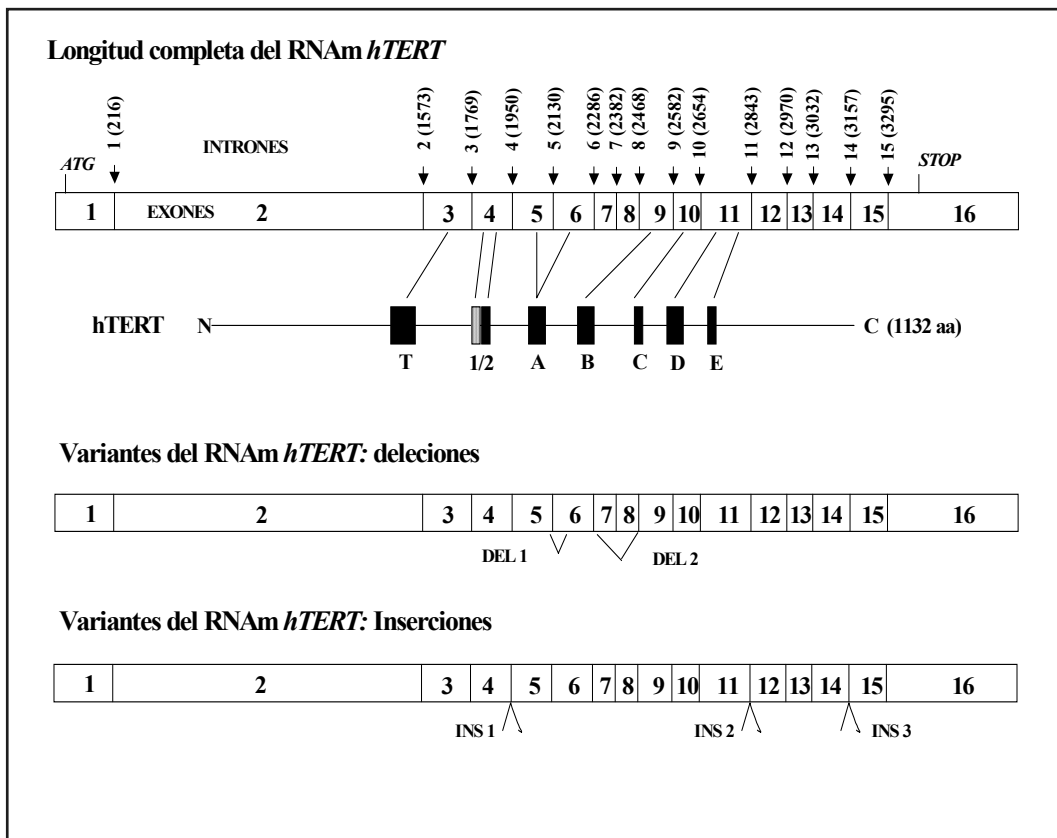


Figura 17. - Exones implicados en la actividad transcriptasa inversa.

Además del RNA mensajero de longitud completa del hTERT, se han descrito al menos seis variantes que pueden ser clasificadas en dos grupos:

1. El primer grupo se caracteriza por la delección de regiones de secuencias específicas (figura-17):
 - DEL1: Delección del exón 6.
 - DEL2: Fusión directa del exón 6 y el 9.
 - DEL1+2: Combinación de ambas.
2. El segundo grupo de variantes hTERT, se caracteriza por la inserción de secuencias intrónicas que conduce a la introducción prematura de codones de terminación de la transcripción (figura-17).

5.2.3. Regulación de la telomerasa:

La regulación de la enzima telomerasa es un mecanismo complejo y dinámico que implica muchas etapas. La capacidad del enzima para localizar, acceder y mediar sus funciones en el lugar específico del extremo distal de los cromosomas, implica tanto a los elementos propios del sistema enzimático tales como el RNA integral de la telomerasa humana (hTR) y la región responsable de la actividad transcriptasa inversa del enzima (hTERT), como otra serie de proteínas o ribonucleoproteínas que estabilizan estas estructuras para formar con posterioridad complejos que condicionan la actividad final del enzima.

Así pues, el ensamblamiento de la telomerasa para constituir el enzima funcionalmente activo, debemos entenderlo como un proceso con consumo de energía que implica la estabilización y regulación transcripcional de hTR así como su asociación funcional con la hTERT. Se han identificado muchos factores que se unen al hTR, algunos de los cuales parecen desempeñar un importante papel en la estabilización tanto de la hTR en su forma independiente o cuando se acompleja al hTERT. Un buen ejemplo de esto son las proteínas H/ACA (tales como la disquerina) que juegan un papel central en la estabilización de hTR, tanto en sistemas autólogos como heterólogos¹¹⁵. Los mecanismos de regulación se muestran gráficamente en la figura-18.

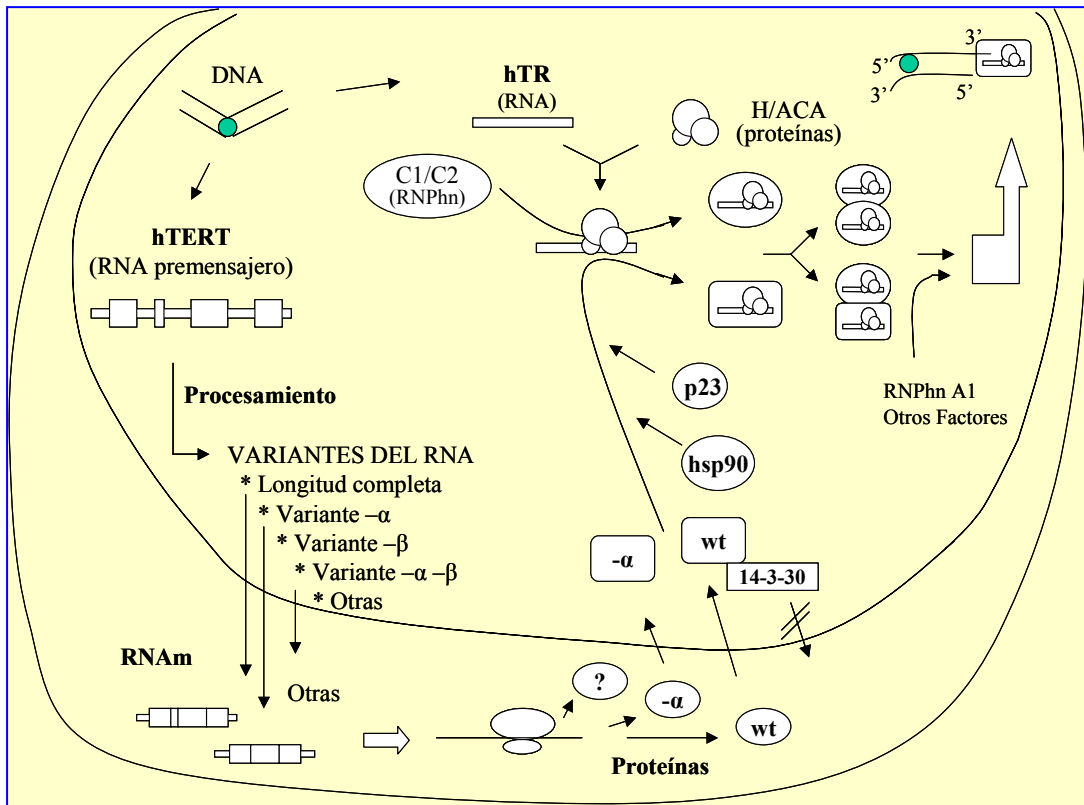


Figura 18. - Mecanismos de regulación de la telomerasa.

Básicamente, la transcripción del locus hTERT genera un RNA premensajero hTERT el cual será posteriormente procesado. El procesamiento y maduración del RNA conduce a la formación de diferentes variantes de RNA mensajero (en función de su secuencia final), el cual debe ser exportado al núcleo del citoplasma con el fin de poder ser traducido a proteína. La variante de RNA más revelante desde el punto de vista de la actividad del enzima, es la que contiene la longitud completa (wt) de la secuencia hTERT pero, también se producen otras variantes alternativas como son las variantes -α, -β, α-β, entre otras. Estas formas maduras del RNA son también exportadas hacia el citoplasma, aunque no de todas las variantes se conocen los productos finales de su expresión, ni tan siquiera es seguro que todas las variantes sean posteriormente traducidas a proteína. La observación de que algunas muestras con escasa o ausente actividad enzimática telomerasa tienen productos de ensamblaje alternativos, claramente indica que la transcripción activa del locus hTERT no necesariamente implica que se origine la variante de longitud completa, capaz de generar la actividad

telomerasa. Aunque las variantes de ensamblaje alternativas son inactivas, se ha observado que la variante hTERT alfa es un inhibidor negativo dominante de la telomerasa, poniendo de manifiesto que el ensamblaje final del RNA puede representar un procedimiento celular para regular el grado de expresión del enzima en su forma activa, modulando el balance entre las formas de hTERT alfa y la forma de longitud completa. Los productos de expresión de estas variantes del mensajero son transportadas al núcleo de una forma todavía inactiva y posteriormente ensambladas para dar lugar a la forma activa del enzima. Para ello, se requiere la presencia de factores que regulan de forma específica la entrada de hTERT y/o envían su salida hacia el citoplasma, tales como el 14-3-30 que bloquea la exportación citoplasmática de la forma hTERT de longitud completa (wt). Posteriormente, otras proteínas como p23 y hsp90 pueden asociarse también al hTERT para contribuir a constituir el enzima activo, cuando este se asocia a hTR que ha sido previamente estabilizado mediante proteínas H/ACA y formado complejos con ribonucleoproteínas (C1/C2). La actividad catalítica del sistema enzimático debe depender ahora de la adecuada dimerización del hTERT y de hTR, de la capacidad de estas moléculas para unirse al telómero y reclutar nuevos factores entre los que se incluyen las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares A1 (RNAhnA1) que faciliten la descondensación de la cromatina (enrollamientos, lazos, bucles) y permita el acceso a la telomerasa.

Muchos factores han sido implicados como factores de transcripción que regulan la expresión hTERT: C-myc, Sp1, Factor Nuclear κ B (NF kappa-B), factores estimulantes del crecimiento. La oncoproteína Bcl-2 implicada en la inhibición de la apoptosis celular también modula la actividad telomerasa. Algunos estudios han implicado a las hormonas esteroideas sexuales (estrógenos, progesterona y andrógenos) en la regulación de la transcripción hTERT. Algunos cromosomas humanos: 3, 4, 6, 7, 10 y 17, se consideran como represores de dicha transcripción. También se ha visto que el receptor C_K del colesterol es un mecanismo supresor de la transcripción del hTERT^{103,116}. Un número de señales extra o intracelulares tales como la radiación ultravioleta, Zn, interferón α y citoquinas, afectan también a la actividad telomerasa. Se ha reportado que el arsénico inhibe la transcripción del gen hTERT. Las proteínas quinasas la aumentan mediante la fosforilación de hTERT, e inversamente la proteína fosfatasa 2A inhibe su actividad, así como las radiaciones ionizantes¹⁰³.

Finalmente se puede concluir que la regulación de hTERT es compleja, la regulación de la transcripción hTERT, el transporte al núcleo, el ensamblamiento del holoenzima telomerasa, el reclutamiento de la telomerasa en los telómeros y el papel de las modificaciones postranscripcionales de la proteína hTERT, son en la actualidad áreas de intensa investigación. Debemos señalar que los nuevos conocimientos derivados de las diversas áreas de la regulación de la telomerasa, ayudarán en un futuro próximo, a encontrar procedimientos para la manipulación de la actividad de este enzima con un objetivo terapéutico.

5.3. MÉTODOS ANALÍTICOS DE LA TELOMERASA:

Hay dos métodos posibles para detectar la expresión de la telomerasa. El primero está relacionado con la actividad bioquímica del enzima (ensayo TRAP; Telomeric Repeat Amplification Protocol), mientras que el segundo consiste en la determinación de los niveles de expresión de los genes que codifican para sus diferentes subunidades: hTERT y hTR.

1. **Ensayo TRAP:** Desarrollado en 1989^{117,118}, en este método, las propiedades bioquímicas de la telomerasa, es decir, la capacidad que tiene la enzima para unirse a un oligonucleótido y añadir repeticiones teloméricas, se combinan con la técnica de la PCR. El ensayo utiliza una mezcla de detergentes y tampones para lisar las membranas plasmáticas y nucleares de las células, a la vez que mantiene intacta la integridad de la telomerasa. A continuación, se añade al sistema un cebador de ADN de secuencia telomérica y se deja que la telomerasa lo alargue. El proceso genera múltiples réplicas teloméricas en tandem, específicas de la especie. El producto final de la reacción de la telomerasa se amplifica mediante un segundo cebador inverso en una reacción de PCR. Los productos de amplificación se visualizan por electroforesis en geles de poliacrilamida teñidos en bromuro de etidio o sales de plata (Figuras-19a, 19b). Sin embargo, el sistema tiene algunos problemas, ya que como lo que mide es la actividad bioquímica de la enzima, esta es sensible a la desnaturalización por calor, a la degradación por RNAasas y proteasas, y en algunos tipos de muestras como las embebidas en parafina o fijadas no son adecuadas para la determinación. El método, requiere 5-7 días para obtener un resultado.

Figura 19.- Método TRAP; pasos.

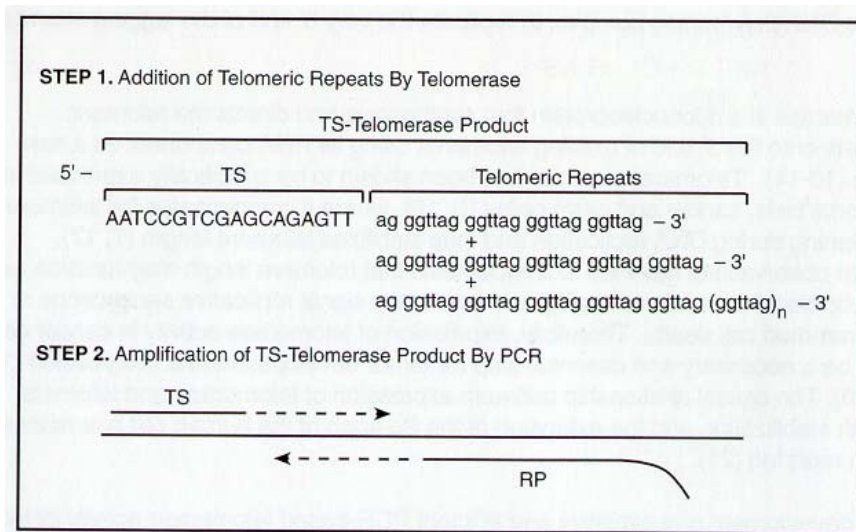
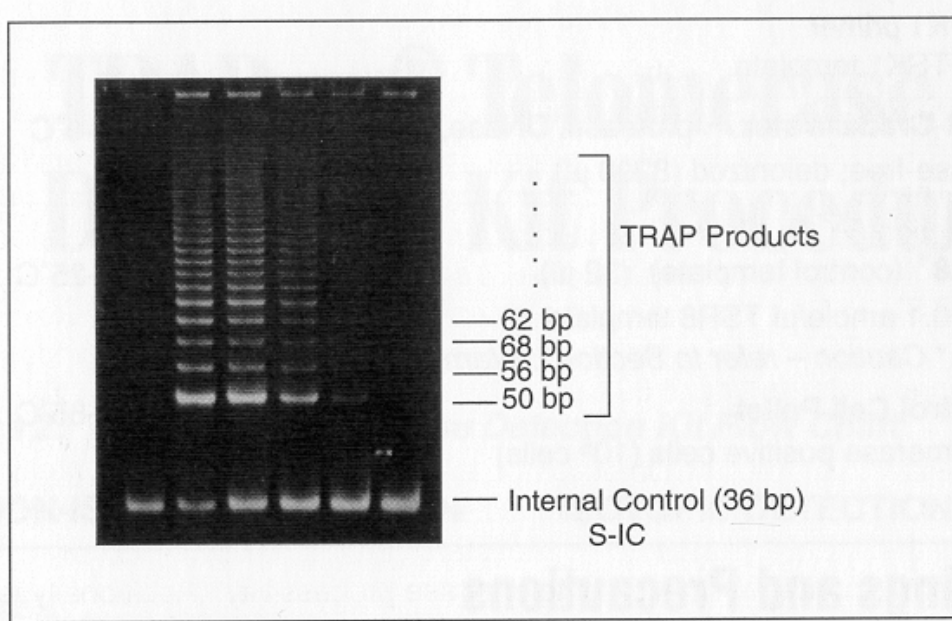


Figura 19b.- Método TRAP; pasos: Detección de los productos de PCR mediante electroforesis.



2. **Determinación de la expresión de los genes de la telomerasa:** Para evitar los problemas anteriores, y una vez se aislaron y clonaron los genes de la subunidad catalítica y del RNA de la telomerasa se diseñaron métodos, basados en el Northern blot y en la RT-PCR a tiempo real, para detectar y cuantificar la expresión de los diferentes componentes de la telomerasa. Estas técnicas se pueden utilizar en muestras fijadas o en parafina tal como se ha puesto de manifiesto últimamente en muestras procedentes de fluidos biológicos tales como plasma, orina, fluidos prostático y pancreático.

5.4. IMPLICACIONES CLÍNICAS DE LA TELOMERASA EN EL CÁNCER:

El cáncer es una enfermedad caracterizada por la proliferación incontrolada de cierta población celular, cuando una célula acumula una variedad de mutaciones genéticas que hacen que escape de los controles de duplicación y de movimientos migratorios. En un principio, el tratamiento del cáncer se centró en comprender los mecanismos que controlan el crecimiento y proliferación celulares. Estos estudios descubrieron que nuevos oncogenes y genes supresores tumorales estaban implicados en la tumorigénesis. Otra característica del cáncer que va ganando atención es la capacidad replicativa ilimitada o la naturaleza inmortal de las células malignas.

En ciertos aspectos, el potencial replicativo limitado de las células sanas, marcado por el acortamiento de los telómeros debido al problema de la replicación final, puede ser considerado como el último mecanismo supresor tumoral. La falta de telomerasa retardaría el crecimiento de los tumores, al hacer que las células que se dividen sin cesar pierdan sus telómeros y mueran antes de desencadenar la enfermedad.

En 1994, se demostró que la telomerasa permanecía activa no sólo en las células cancerosas mantenidas en cultivo sino también en tumores humanos¹¹⁹. Parece ser que la activación de la enzima telomerasa por parte de las células tumorales estaría relacionada con la inmortalidad celular. Estudios posteriores han proporcionado las pruebas necesarias para confirmar el papel directo de la telomerasa en la transformación oncogénica^{120,121}, se ha visto que mutaciones en el gen hTERT de la telomerasa, son

un factor de riesgo de padecer anemia aplásica¹²². Es por ello, que las aproximaciones tanto diagnósticas como terapéuticas que tienen por objetivo la naturaleza inmortal de las células malignas pueden proporcionar un medio más efectivo y universal en el diagnóstico y tratamiento del cáncer.

Investigaciones realizadas a continuación por Harley y Shay detectaron telomerasa en 90 muestras tumorales humanas de las 101 analizadas (que representaban 12 tipos distintos de tumores), y no detectaron en ninguna de las 50 muestras de tejido somático normal (de cuatro tipos distintos de tejidos)¹²³. Una de las hipótesis planteadas sobre la activación de la telomerasa en los estados normal y tumoral, es que las células de la línea germinal sintetizan continuamente la telomerasa durante el desarrollo embrionario¹²⁴. Una vez el organismo está totalmente formado, se bloquea la telomerasa en muchas células somáticas, y los telómeros se van acortando conforme se van dividiendo. Cuando el tamaño de los telómeros alcanza un valor crítico, se emite una señal que impide que las células sigan dividiéndose. Sin embargo, si las mutaciones genéticas que promueven el cáncer obstaculizan la emisión de esas señales o dejan que las células tumorales las ignoren, estas continuarían dividiéndose evitando la senescencia. Seguirían perdiendo secuencias teloméricas y sufrirían nuevas mutaciones. Cuando los telómeros se han reducido a un nivel crítico la célula morirá.

Ahora bien, si como consecuencia de los cambios genéticos se vuelve a sintetizar telomerasa, algunas células no pierden totalmente los telómeros, sino que los preservarán y mantendrán su tamaño. En efecto, como demostró Hayflick¹²³, los cultivos de células normales proliferan hasta que llegan a un punto a partir del cual el crecimiento de la población cesa, si por algún mecanismo (mutación) las células continúan dividiéndose, hasta que los telómeros se acortan de una manera crítica, en esta fase se produciría la activación de la telomerasa, evitando que se sigan acortando, estabilizando su longitud y contribuyendo de esta manera a la inmortalización.

Como se ha mencionado previamente una de las características más importantes de las células cancerosas es la capacidad para dividirse de una manera ilimitada. Dicha capacidad limitada de división que poseen las células somáticas, producida como consecuencia del acortamiento de los telómeros, sería un mecanismo evolutivo para impedir la acumulación de mutaciones genéticas y el desarrollo de cánceres. Así, limitando el número de veces que una célula se puede dividir, los organismos eucariotas

poseen un mecanismo para controlar la proliferación celular descontrolada. Sin embargo, las células cancerosas han encontrado la manera de solucionar este obstáculo: La activación de la telomerasa para conseguir la inmortalidad celular^{125,126,127,128}.

El reciente desarrollo del método TRAP para detectar y determinar la presencia y el nivel de la actividad de la telomerasa a partir de pequeñas muestras tisulares ha permitido la evaluación de su expresión en una amplia variedad de tejidos tanto sanos como tumorales. En el momento actual, numerosos estudios muestran la expresión de la telomerasa en la mayoría de tumores testados. Estos datos se resumen en la tabla-2, de la cual podemos obtener una estimación grosera de la sensibilidad y especificidad de la telomerasa. Las muestras de tejidos sanos premalignos y de los márgenes sanos peritumorales con telomerasa positiva son considerados como falsos positivos. Combinando los resultados de la expresión de la telomerasa en 895 muestras cancerosas y 646 no malignas (70 muestras de tejidos sanos, 310 muestras peritumorales y 266 muestras de lesiones benignas y premalignas) encontramos una especificidad del 91%, una sensibilidad del 85%, un valor predictivo positivo del 93% y un valor predictivo negativo del 81%.

Tabla 2.- Actividad telomerasa en muestras tisulares.

Tejidos Neoplásicos (N° positivos/N° analizados)	Tejidos Sanos (N° positivos/N° analizados)	<i>Tejidos Peritumorales</i> (N° positivos/N° analizados)	Tejidos benignos (N° positivos/N° analizados)
Neuroblastomas (99/105)	Línea germinal (4/4)	Cabeza y cuello (6/16)	Próstata (3/5)
Colon (53/56)	Tejidos somáticos (0/70)	Tumor de Wilm (2/6)	Adenoma Gástrico (1/2)
Piel (56/61)		Próstata (3/25)	Fibroadenoma mama (2/9)
Mama (117/125)	Leucocitos 10 ³ cel (0/124)	Mama (3/42)	Hepatitis (19/38)
Utero (18/20)	Leucocitos 10 ⁴ cel (55/124)	Pulmón (3/68)	Cirrosis (6/8)
Ovario (7/7)	Leucocitos 10 ⁵ cel (100/124)	Estómago (2/85)	Polipos colon (0/20)
Pulmón (120/147)		Renal (0/55)	Adenoma Colon (0/1)
Próstata (27/31)		Neuroblastomas (0/13)	HBP (1/20)
Estómago (72/85)			Metaplasia intestinal (1/13)
Hígado (28/33)			Astrocitoma anaplást (1/16)
Cerebro (43/59)			Meningioma Benigno (4/27)
Riñón (40/55)			Ganglioneuroma (0/4)
Hematológicos (78/111)			Mioma (0/103)
Total (758/859), 85 % positivos		Total (19/310), 6% positivos	Total (38/266), 14% positivos

Estos resultados son consistentes con el hecho de que la telomerasa es el marcador más ampliamente expresado y específico del cáncer hasta la fecha¹²⁹. Según datos publicados recientemente, 758 de 895 (85%) muestras de tumores malignos tienen actividad telomerasa y en concreto en el 90-100% de los cánceres colorrectales humanos, mientras que esta no se detectó en ninguno de los 70 tejidos sanos estudiados^{131,132}. Esta fuerte asociación de la actividad telomerasa con los tejidos malignizados es una buena evidencia de que la telomerasa puede ser un marcador importante para el diagnóstico del cáncer. Asimismo, los tejidos de la línea germinal analizados, y algunas células madre tienen actividad telomerasa, de hecho, se ha demostrado que la sobreexpresión de hTERT sobre células madre en regiones del folículo piloso favorece su crecimiento, promoviendo la reactivación de las Stem cells^{132,133}. Por otra parte, también se ha demostrado actividad telomerasa en los leucocitos, esto explicaría la observación de que algunos tejidos histológicamente normales adyacentes a la zona tumoral (19/310) (6%) presentan también actividad telomerasa, debido a la existencia de linfocitos infiltrantes tanto en el tumor como en los tejidos contiguos. Sin embargo, dicha actividad telomerasa en estos tejidos sanos, también podría ser debida a células tumorales infiltrantes. Estos resultados muestran que la detección de la telomerasa mediante el método TRAP puede ser el método más sensible para la detección de infiltración de los tejidos sanos de los márgenes tumorales y puede servir de ayuda para que los procedimientos quirúrgicos sean más efectivos.

También se ha encontrado actividad telomerasa en 38 de 266 (14%) muestras de lesiones benignas y premalignas. Esto parece deberse a la presencia previa de células malignas no detectadas, pudiendo utilizarse para el diagnóstico de cáncer en un estadio más inicial, además de predecir el resultado de la enfermedad.

A modo de resumen, podemos decir que a nivel quirúrgico, desde un punto de vista estrictamente técnico, difícilmente se podrá en los próximos 10 años mejorar los resultados tras adquirir y ejecutar correctamente los conceptos actuales de la escisión total del mesorrecto asociados a las medidas terapéuticas multidisciplinarias, por ello a la hora de involucrarse en estudios cuyo objetivo sea incrementar la supervivencia y por ello disminuir la mortalidad por este cáncer, los objetivos se basarán en los siguientes puntos:

1. Campo de la prevención: campañas de cribaje, despistaje e identificación de familias con síndromes hereditarios, además de la poliposis adenomatosa familiar, por su frecuencia, es quizá más importante la identificación de los pacientes con cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis.
2. Seguir con la búsqueda de marcadores tumorales que identifiquen de forma precoz esta enfermedad o sus recaídas y con elevado poder de discriminación con los sujetos sanos. Con este objetivo, hemos estudiado la cuantificación de la expresión del gen hTERT de la telomerasa a partir de mRNA circulante en el plasma de pacientes con CCR.
3. Ahondando en la etiopatogenia de estos tumores, algunas vías de aplicación práctica pueden ser:
 - Los estudios de microarrays que podrán definir las alteraciones específicas desde el punto de vista molecular y genético para cada tumor y su huésped.
 - Aplicación de vacunas antitumorales, con sus dos vertientes metodológicas, como son la utilización de vectores retrovirales, o la vehiculización liposomal.

Por consiguiente, la mayor utilidad clínica de la telomerasa podría ser en el diagnóstico a través de fluidos biológicos de fácil obtención: Orina, sangre, esputos y lavados broncoalveolares. En este sentido, a continuación se presenta una técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que ha permitido cuantificar transcritos de la telomerasa en el plasma de pacientes con cáncer colorrectal¹⁰².

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El cáncer colorrectal, es una de las neoplasias con una mayor incidencia y que hoy en día, aún es una de las causas de muerte más frecuente en nuestro medio, en relación a ello, el desarrollo de recidivas locales tras la intervención quirúrgica es uno de los factores más importantes implicados en la mortalidad por este tipo de tumor. Tales recidivas podrían ser debidas a células provenientes del tumor que se diseminen durante el proceso quirúrgico y que puedan establecerse en tejidos sanos cercanos y en el peritoneo^{9,134}.

En los últimos años, ha despertado gran interés la identificación de las alteraciones genéticas relacionadas en el desarrollo de este tipo de cáncer y su implicación como marcador tumoral en el diagnóstico precoz tanto del tumor primario como de su recidiva.

La actividad telomerasa se encuentra aumentada en el 90-100% de los cánceres colorrectales humanos. Este aumento de actividad es independiente del estado del gen TP53 (que codifica para la proteína p53) por lo que se ha propuesto como una vía de desarrollo tumoral alternativa a la de la activación del oncogén K-ras y la apoptosis¹³⁵.

Por lo tanto, en nuestro grupo nos hemos planteado como hipótesis de trabajo, el valor que puede tener la determinación del gen hTERT de la telomerasa en plasma de pacientes con cáncer colorrectal, como posible marcador tumoral y su utilización en un futuro como test analítico en el diagnóstico y seguimiento de estos pacientes. Con ello, los objetivos del presente trabajo son:

1. Cuantificar, en el RNA plasmático, mediante Transcripción Inversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa la subunidad hTERT del gen de la telomerasa en una serie consecutiva de 81 pacientes intervenidos de forma electiva de cáncer colorrectal.
2. Analizar el poder de discriminación de este marcador comparándolo con un grupo control formado por 50 sujetos sin patología neoplásica conocida, determinando dicho gen en plasma mediante el mismo procedimiento.
3. Determinar en el grupo de pacientes con cáncer colorrectal, la existencia o no de correlación entre los niveles de expresión del gen hTERT y determinadas variables:
 - La edad y el sexo.
 - Los niveles de CEA preoperatorio.
 - El estadio tumoral.
 - El grado de diferenciación tumoral.
4. Caracterización molecular en células neoplásicas procedentes del tumor primario en un subgrupo de los pacientes intervenidos, determinando la actividad telomerasa en dichas células, comparando la misma con células de mucosa sana del colon adyacente al tumor.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. - SELECCIÓN DE PACIENTES:

Hemos realizado un estudio prospectivo, en el que se incluyen 81 pacientes, todos ellos intervenidos de forma programada y con intención curativa de cáncer colorrectal en la unidad de Coloproctología, Servicio de Cirugía, del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Con respecto a la selección de pacientes, esta ha sido de forma consecutiva incluyendo los enfermos diagnosticados de cáncer de colon y/o recto y que se han intervenido con carácter electivo en el periodo de tiempo comprendido entre Junio del año 2000 y Noviembre del año 2002. La mediana de edad ha sido de 69 años (34-92) (media 67.93 años), de los cuales 51 (62.96%) fueron hombres y 30 (37.04%) mujeres (tabla-3). De acuerdo con los hallazgos quirúrgicos e histológicos, 1 paciente (1.23%) se encontraba en estadio TisN₀M₀ (estadio 0), 17 pacientes (20.99%) se encontraban en estadio T₁₋₂N₀M₀ (estadio I), 33 pacientes (40.74%) en estadio T₃₋₄N₀M₀ (estadio II), 20 pacientes (24.69%) en estadio T₂₋₄N₁₋₂M₀ (estadio III) y 10 pacientes (12.35%) en estadio T₁₋₄N₁₋₂M₁ (estadio IV) (tabla-3).

Se determinó la concentración preoperatoria de CEA en suero en los 81 pacientes mediante enzimoimmunoanálisis con kits comerciales (ES-300; Boehringer Mannheim). Las cifras consideradas normales fueron las que se encontraban entre 0-5ng/ml.

Por otro lado, como grupo control, se han seleccionado 50 voluntarios en los que se había descartado previamente cualquier tipo de patología neoplásica conocida. De ellos, 24 son sujetos voluntarios sanos, y 26 son sujetos ingresados en nuestro Servicio por patología benigna y sin antecedentes conocidos en su historial médico de patología neoplásica.

En este grupo la mediana de edad fue de 40 años (17-85) (media 46 años), de estos, 25 (50%) fueron hombres y 25 (50%) mujeres. Así mismo, a todos los sujetos incluidos en este grupo control se estableció como criterio absoluto de inclusión la ausencia de anemia (considerando como tal; hemoglobina < 10.7gr/dl y un hematocrito < 33%), y de igual manera la ausencia de alteración de otros parámetros analíticos tales como leucocitos, plaquetas, creatinina y iones. Los aspectos clínicos, en cuanto a características de sexo, edad y patología por la cual están ingresados se resumen en la tabla-4.

Sexo	
Varones	51 (62.96%)
Mujeres	30 (37.04%)
Edad <i>Mediana: 69 (34-92)</i>	
< 65 años	23 (28.4%)
65-74 años	25 (30.86%)
≥ 75 años	33 (40.74%)
Localización tumoral	
Colon derecho	19 (23.46%)
Colon izquierdo-sigma	23 (28.40%)
Recto	39 (48.15%)
Estadio TNM	
E-0	1 (1.23%)
E-I	17 (20.99%)
E-II	33 (40.74%)
E-III	20 (24.69%)
E-IV	10 (12.35%)
Metástasis ganglionar	
Ausente	54 (66.67%)
Presente	27 (33.33%)
Infiltración parietal	
Submucosa	5 (7.17%)
Muscular	15 (18.52%)
Serosa	55 (67.90%)
Estructuras vecinas	6 (7.41%)
Grado de diferenciación	
Bien	12 (14.81%)
Moderado	59 (72.84%)
Bajo	10 (12.35%)
CEA preoperatorio	
< 6ng/ml	61 (75.31%)
≥ 6ng/ml	20 (24.69%)

Tabla 3.- Pacientes; edad, sexo, localización y estadio tumoral.

Sexo	
Varones	25 (50%)
Mujeres	25 (50%)
Edad <i>Mediana: 40 (17-85)</i>	
< 65 años	42 (84%)
65-74 años	3 (6%)
≥ 75 años	5 (10%)
Patología asociada	
Voluntarios sanos	24
Patología hepatobiliar (no tumoral)	6
Proctología	5
Pulmón y pared torácica	3
Patología inflamatoria intestinal	3
Enfermedad diverticular del colon	3
Pared abdominal	2
Oclusión intestinal por bridas	1
Apendicitis	1
Ginecomastia	1
Obesidad mórbida	1
TOTAL	50

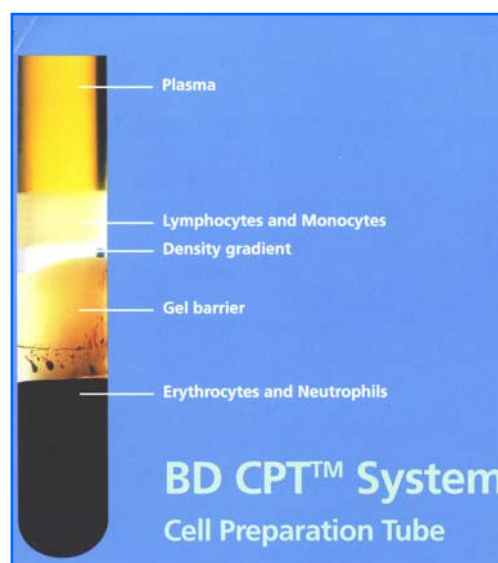
Tabla 4.- Sujetos control; edad, sexo y patología asociada.

2. - OBTENCIÓN DE MUESTRAS:

En todos los pacientes, momentos previos a la intervención quirúrgica, se tomaron muestras de 5-8ml de sangre venosa sistémica del antebrazo mediante la utilización de unos tubos especiales, los cuales contienen gel de citrato sódico, que al centrifugar, permite separar el contenido del tubo en plasma, células mononucleares de la sangre y hematíes por gradiente de densidades¹⁰² (VACUTAINER® CPT™ # 362761; Becton-Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) (Figuras 20 y 21).

Una vez finalizada la intervención se recogieron muestras de tejido tumoral y de mucosa sana del colon adyacente al tumor procedentes del espécimen quirúrgico en 10 de los 81 pacientes, con la finalidad de determinar la actividad telomerasa en dichas células y poder comprobar su correlación con la expresión del gen hTERT en sangre.

La obtención de muestras en los sujetos control se realizó también en sangre venosa periférica del antebrazo. En todos los casos, tanto en el grupo de sujetos control como en el grupo de pacientes, la conservación y traslado de las muestras hasta el laboratorio, antes de su procesamiento, duró un tiempo estimado entre 30-90 minutos, en este intervalo de tiempo las muestras permanecían en nevera a una temperatura de 4°C. Todo el procesamiento y análisis de muestras se realizó en el laboratorio del Departamento de Farmacología de la Universitat de València.

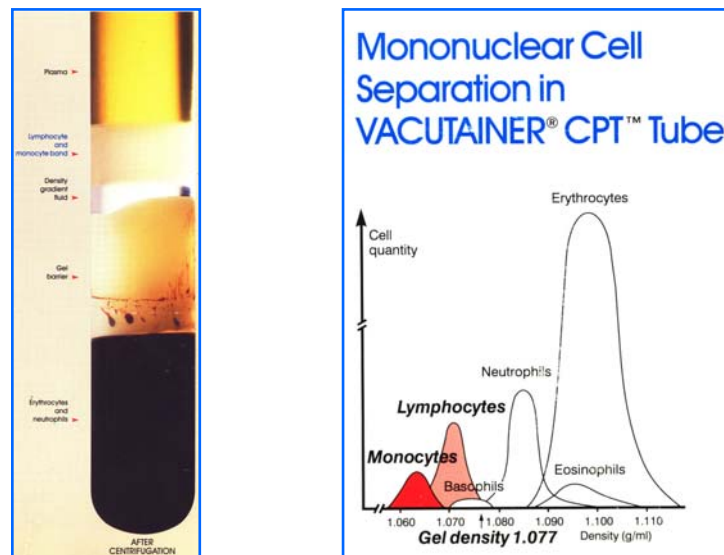


Figuras 20 y 21. - Tubo Vacutainer para la recogida de muestras de sangre.

3. - PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS:

La expresión del hTERT fue determinada en todas las muestras de plasma extraídas de la sangre periférica basada en la cuantificación a tiempo real de la subunidad hTERT de la telomerasa (RT-PCR), método normalizado mediante el referente de la expresión del gen GAPDH, a partir de plasma del grupo de pacientes con cáncer colorrectal y del grupo de sujetos control.

Una vez las muestras trasladadas al laboratorio, las células mononucleares de la sangre, el plasma y hematíes (figuras-22 y 23) fueron separados mediante centrifugación siguiendo las instrucciones de la casa comercial (figura-24).



Figuras 22 y 23.- Separación de elementos formes de la sangre y plasma.



Figura 24.- Centrífuga.

A continuación, se procede a la separación del plasma, del cual vamos a extraer el RNA circulante. Si su procesamiento no era llevado a cabo en ese momento, era congelado a -80°C .

Seguidamente, se extraían 250 microlitros de plasma, a los que se añadía 750 microlitros de trizol (agente que permite la separación de ácidos nucleicos y proteínas) (Invitrogen). Transcurridos 15 minutos, y una vez mezclados correctamente los productos, se añadía a la mezcla anterior 250 microlitros de cloroformo, con la finalidad de degradar los lípidos, para proceder a continuación, transcurridos 5 minutos, a su centrifugado a 15000rpm durante 20 minutos. Una vez centrifugada la mezcla, por diferencia de densidades de su contenido, esta era separada en tres fases:

1. Fase acuosa; cuyo contenido era RNA.
2. DNA.
3. Trizol, cloroformo y proteínas, en el fondo (Figura-25).

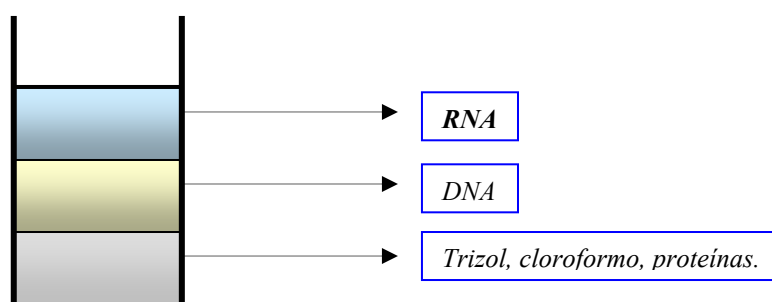


Figura 25.- Separación del RNA.

Se procedió a separar la fase acuosa que contiene el RNA del resto. Tanto el RNA como el DNA que están presentes en el plasma, provienen de pequeños fragmentos de restos celulares circulantes, (tanto tumorales, como de leucocitos, células inflamatorias...). A ello se le añadieron 5 microlitros de glicógeno y 500 microlitros de isopropanolol, agentes que favorecen y provocan la precipitación del RNA, ya que su concentración es muy baja. La anterior mezcla, se deja 10 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente proceder a un nuevo centrifugado a 15000rpm, durante 20 minutos, quedando los fragmentos de RNA precipitados, desechando el sobrenadante.

Sobre el RNA precipitado se añadió etanol al 75% cuya finalidad es eliminar restos de sales y de las soluciones previas. Posteriormente, la purificación del RNA se

llevó a cabo utilizando el Nucleospin RNA II Kit (Macherey-Nagel, Easton, Pennsylvania), el cual incluye DNAasa I para tratar la muestra. A continuación se realizó otro centrifugado de la solución a 15000rpm durante 5 minutos desechando seguidamente el etanol, quedando los fragmentos de RNA precipitado y purificado, procediendo a su secado con una campana de vacío (Figura-26).



Figura 26.- Secadora.

Seguidamente, se añadieron 40 microlitros de agua destilada, con el propósito de que el RNA se encuentre diluido y en suspensión. De la anterior solución, se extrajeron 15 microlitros para mezclarlos con otros 585 microlitros de agua destilada, pues es necesario un volumen total de 600 microlitros para la lectura por el espectrofotómetro en cubeta de cuarzo (Figura- 27).

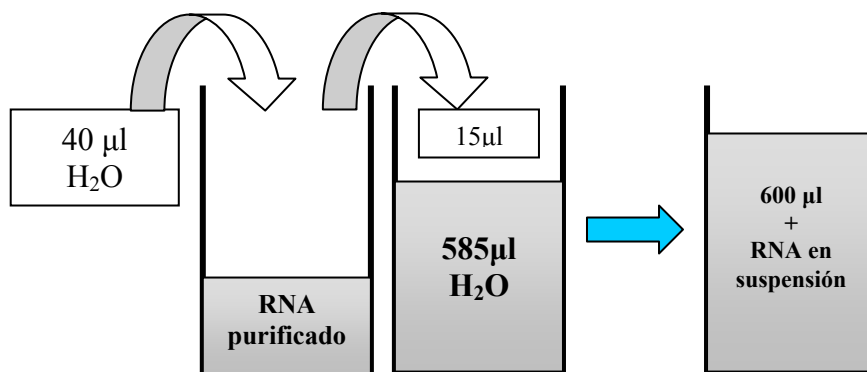


Figura 27. - Dilución del RNA para la lectura por el espectrofotómetro.

A continuación el RNA es cuantificado por espectrofotometría (figura-28), midiendo la absorbancia de la solución realizándose dos lecturas:

1. A 260nm de longitud de onda: Es la longitud de onda que absorben los ácidos nucleicos (cuantifica el RNA de la muestra).
2. A 280nm de longitud de onda: Es la longitud de onda que absorben las proteínas de la muestra.



Figura 28.- Espectrofotómetro.

Con la aplicación de la siguiente fórmula matemática, y una vez conocida la absorbancia de la muestra, se puede calcular la concentración de RNA total de cada muestra, ello permite utilizar la misma cantidad de RNA en todas las muestras analizadas:

$$[\text{RNA}] \text{ (microgramos / mililitro)} = \text{Absorbancia} \times 50^1 \times 40^2$$

1: Factor de transformación.

2: Número de veces que se diluye.

Como control endógeno para normalizar el RNA de la reacción, se utilizó un control del propio paciente, en concreto el gen GAPDH, que se expresa de forma constitutiva en las células humanas, es decir, independientemente de cualquier proceso patológico, ya que hay genes cuya expresión puede verse modificada por la presencia de algunas patologías o tumores. Además, este control endógeno permite corregir y normalizar parámetros como: La cantidad de RNA, degradación de RNA y la presencia de inhibidores de la transcriptasa inversa.

4. - DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN hTERT: TRANSCRIPCIÓN INVERSA. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA:

Se escogieron un diseño de olidos y sondas, es decir, secuencias de nucleótidos del gen que se quiere buscar:

1. Para hTERT.
2. Para GAPDH.

A este diseño, se añadieron 200ng de RNA purificado de cada paciente y/o sujeto control, utilizándose en la reacción de transcripción inversa, empleando “random hexamers” y el Kit “TaqMan transcription reagents-Applied Biosystems” en las siguientes condiciones:

- 10 min. a 20°C, para la unión de los cebadores al RNA.
- 45 min. a 42°C, para la síntesis del cDNA.
- 5 min. a 95°C, para la inactivación del enzima.

Con ello se ha transcrito el RNA a DNA, puesto que la reacción en cadena de la polimerasa solo es capaz de amplificar DNA, de manera que se han obtenido dos preparaciones:

- a) Oligos complementarios de hTERT (random hexamers), RNA total del paciente (200ng) y transcriptasa inversa (RT) (Kit TaqMan transcription reagents).
- b) Oligos complementarios de GAPDH, RNA total y RT.

Una vez obtenido el DNA, este se amplificó por la reacción en cadena de la polimerasa, técnica que permite la identificación de fragmentos de DNA que puedan estar presentes en muy pequeña cantidad en una muestra, mediante el uso de “primers” o iniciadores, que son pequeñas cadenas de 15-40 oligonucleótidos, a partir de los cuales pueden constituirse diferentes secuencias de DNA complementario. Por cambios de temperatura y la presencia de una polimerasa termoestable puede repetirse el ciclo dando lugar a una amplificación, que puede repetirse de modo sucesivo. Según los distintos “primers” utilizados a voluntad del investigador, se puede estudiar un fragmento diferente de DNA.

El método que hemos utilizado implica el aislamiento de ARNm de cada muestra, preparación del DNAc mediante transcriptasa inversa y amplificación del DNAc específico de la telomerasa. En este sentido, en el laboratorio se ha desarrollado un procedimiento para la cuantificación de la expresión génica de la subunidad hTERT de la telomerasa por RT-PCR a tiempo real, a partir de plasma de ambos grupos: Pacientes con cáncer colorrectal y el grupo de sujetos control.

Para el análisis de PCR, se mezclaron 5µl de la reacción de transcripción inversa con 45µl de TaqMan Universal PCR Master Mix, conteniendo 250nM de los cebadores tanto la secuencia FW (inicial) (hTERT-Fw: 5'- ACCGTCTGCGTGAGGAGATC-3'), como la secuencia reversa RV (hTERT-Rv: 5'- CCGGTAGAAAAAAGAGCCTGTTC-3'), junto con 125nM de la sonda TaqMan, específicos del gen hTERT (hTERT: 5'- FAM-TGTACGTCGTCGACTGCTCAGGTCTTT-TAMRA-3'). Los cebadores y sonda del gen GAPDH son suministrados por la casa comercial.

El método está basado en la propiedad 5'-exonucleasa que posee la Taq polimerasa. La sonda TaqMan, está marcada con un fluoróforo marcador en el extremo 5' y otro fluoróforo en el extremo 3' (quencher). Cuando la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el marcador es apantallada por el quencher de tal manera que no se observa fluorescencia alguna. Conforme se va produciendo la reacción PCR debido a la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa, se van liberando moléculas del fluoróforo marcador, lo que permite la emisión de fluorescencia (figuras-29 y 30). Dicha fluorescencia se mide con un aparato (figura-31), capaz de detectar los productos de PCR conforme se van acumulando durante la reacción, lo cual permite la cuantificación precisa y reproducible de DNA. Esta fluorescencia es proporcional al número de moléculas de DNA presentes en la muestra, es decir, a la expresión del gen de interés (la figura-32 resume de forma esquemática el proceso de RT-PCR).

Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

- 10 min a 95°C, para la activación del enzima.
- 40 ciclos de dos pasos:
 - 15seg. a 95°C.
 - 1min. a 60°C.

Todas las muestras se analizaron por duplicado. Para la preparación de la curva standard se utilizó la línea celular de carcinoma de colon HT-29, extrayendo su RNA con el mismo protocolo descrito para las muestra de los pacientes (Trizol) y a partir de

él se procede a la obtención del cDNA por RT (figura-33). Tras la síntesis del cDNA, se obtuvieron diluciones para generar una curva standard que cubriera un rango de concentraciones entre 0.016-250ng.

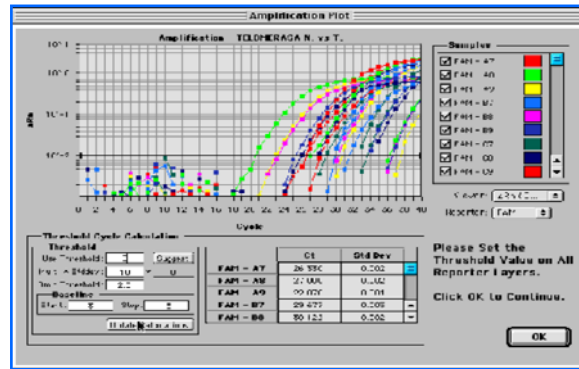


Figura 29.- Determinación de la expresión del gen hTERT en CCR.

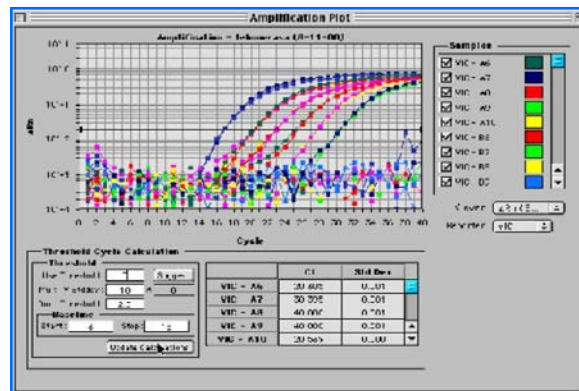


Figura 30.- Determinación de la expresión del gen GAPDH. Curva standard.

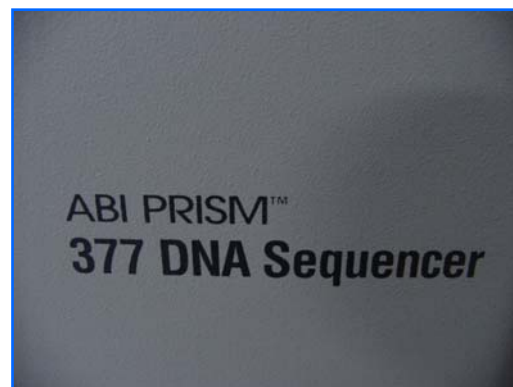
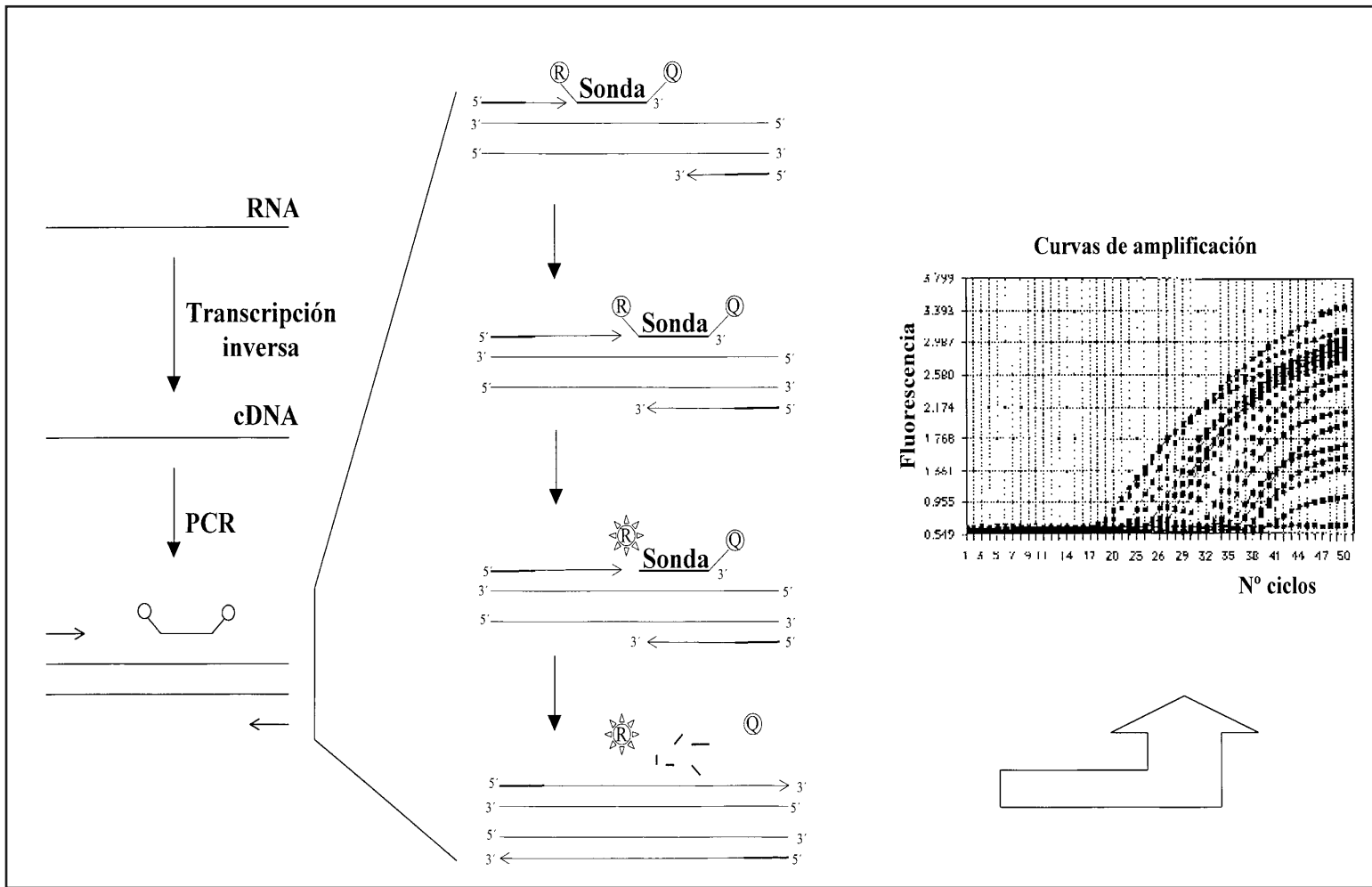


Figura 31.- Secuenciador de DNA para detectar los productos de PCR.

Figura 32.- Fundamento de la técnica RT-PCR cuantitativo.



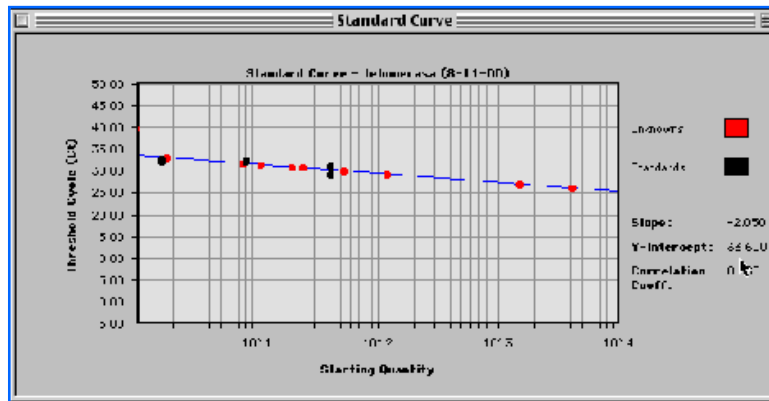


Figura 33.- HT-29: Línea celular de cáncer de colon con expresión elevada de hTERT.

Los valores para determinar el ciclo umbral (Ct) (porcentaje a partir del cual se obtiene respuesta) se midieron con el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700 (figura-34), y se transformaron en ng de HT-29 hTERT y ng de HT-29 GAPDH utilizando las curvas standard obtenidas el mismo día del experimento. La relación entre ng hTERT y ng GAPDH representa los valores normalizados (hTERT_N) de cada muestra, que pueden ser comparados con los obtenidos a partir de otras muestras.

$$\text{ng RNA-hTERT/ng RNA-GAPDH}$$

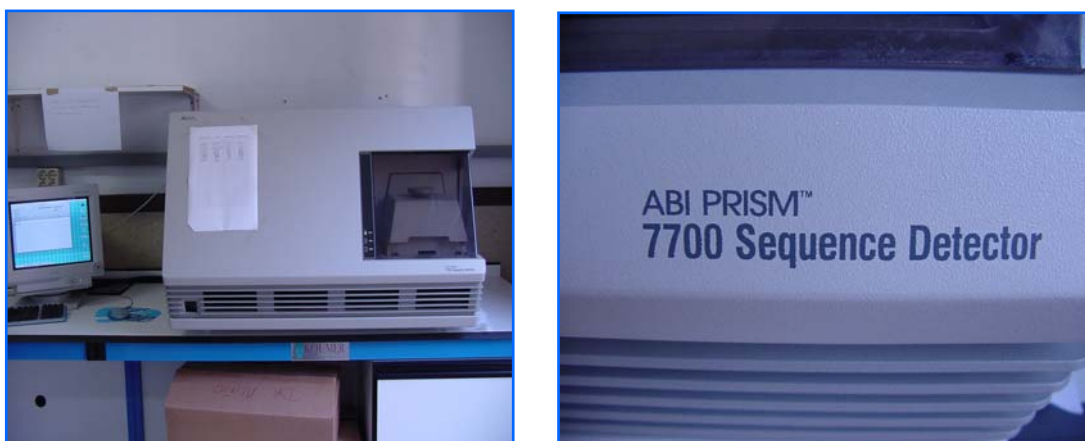


Figura 34.- Sistema de PCR cuantitativo a tiempo real (Applied Biosystem®) utilizado en este estudio.

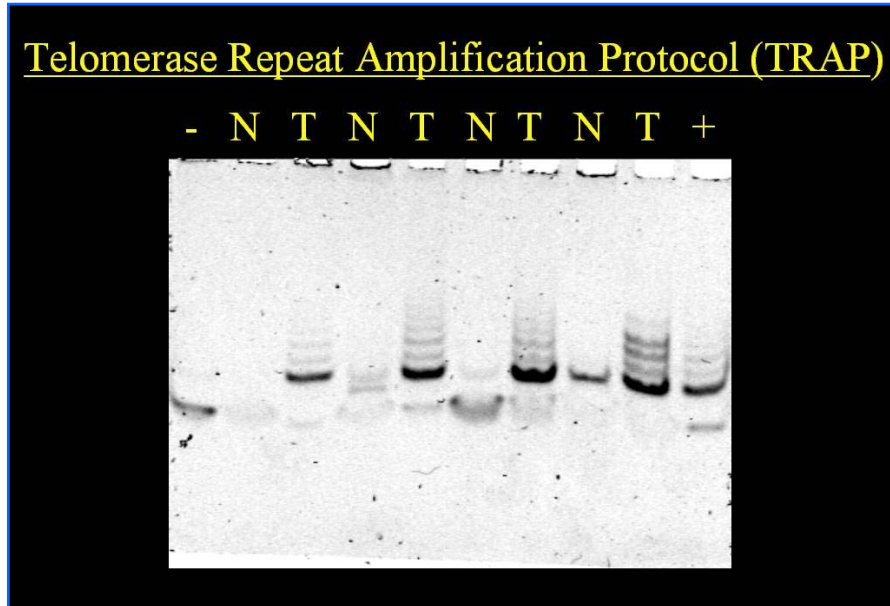
5. – DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD TELOMERASA EN TEJIDOS:

Se determinó la actividad telomerasa basada en el ensayo TRAP en tejidos tumorales y en mucosa cólica adyacente al tumor en 10 de los pacientes con cáncer colorrectal intervenidos. Se ha utilizado el kit de detección de telomerasa TRAP-eze (oncor) que es una versión mejorada del método original diseñado por Kim NW et al¹²⁸ (Science 266: 2011-2015, 1994). El ensayo consta de dos partes, en la primera fase de la reacción, la telomerasa (si está presente en las células) añade un número determinado de repeticiones teloméricas en el extremo 3' de un oligonucleótido sintético. En la segunda fase, los productos sintetizados se amplifican mediante PCR característica. La detección se realiza mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (12%) y tinción con bromuro de etidio o plata.

En la primera etapa, la telomerasa reconoce un oligonucleótido no telomérico (TS) como sustrato y extiende el oligonucleótido con secuencias teloméricas repetitivas de novo durante un periodo de 10 minutos a temperatura ambiente. Al inicio de la segunda etapa, la telomerasa se inactiva mediante exposición a altas temperaturas a medida que se inicia el ciclo de PCR y el “primer” de retorno (CX) complementario a la secuencia telomérica se une al producto de la telomerasa. En este momento, la Taq polimerasa de ADN sintetiza la segunda cadena de ADN. Los productos de dos cadenas (duplex) se amplifican posteriormente durante 25 a 35 ciclos de PCR, durante los cuales el oligonucleótido TS, que está presente en exceso, se utiliza como “primer” delantero. Dado que la telomerasa es una enzima progresiva, los productos de la posterior reacción de PCR aparecen en los geles como una escalera de bandas a intervalos de seis nucleótidos (1ª banda, -GGTTAG- x 1, 2ª banda, -GGTTAG- x 2, etc). Los productos de PCR pueden detectarse mediante la incorporación de nucleótidos radioactivos o tinción con colorantes alternantes (figura-35).

Los procedimientos anteriormente descritos, han sido ratificados por el Comité de Ética y de Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Asimismo, se ha obtenido un consentimiento escrito de cada uno de los pacientes y sujetos sanos del grupo control, previamente a la inclusión del estudio.

Figura 35.- Sistema TRAP: Bandas de detección de actividad telomerasa en tejidos normales y tumor.



6. - ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Los datos obtenidos a partir de los distintos estudios practicados fueron procesados utilizando el programa SPSS (Statistical Package for the Social Science), Chicago, versión 12.0 para Windows. El método estadístico utilizado, se ha estructurado de la siguiente forma:

6.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DESCRIPTIVO:

De cada variable obtenida, hemos realizado un análisis descriptivo, de manera que en los resultados se ha utilizado la mediana como medida de tendencia central y el rango o amplitud como medida de dispersión.

6.2. ANÁLISIS BIVARIANTE:

Engloba todos los contrastes estadísticos necesarios para evaluar la variable hTERT, comparando resultados en los distintos momentos del seguimiento y según los factores independientes:

- **Prueba de Kolmogorov-Smirnov:** Se ha utilizado para contrastar el ajuste a una distribución normal de las variables fundamentales hTERT y CEA. Dado que el resultado es negativo, la consecución de los objetivos en la investigación se aborda desde un enfoque no paramétrico.
- **Prueba de Wilcoxon:** Se trata de un procedimiento no paramétrico que se utiliza con dos muestras relacionadas para contrastar la hipótesis de que las dos variables tienen la misma distribución. Esta prueba tiene en cuenta la información sobre la magnitud de las diferencias dentro de los pares, dando más peso a los pares que presentan grandes diferencias que a los pares que presentan diferencias pequeñas. La hemos utilizado para contrastar la homogeneidad de distribuciones en dos muestras relacionadas, en concreto para contrastar la actividad telomerasa en tejidos tumorales y mucosa sana en un mismo paciente.
- **Prueba de Kruskal-Wallis;** para varias muestras independientes (más de dos): Se utiliza para contrastar si la distribución de un parámetro, cuando menos ordinal, es o no la misma en tres o más muestras independientes. Por ejemplo, para analizar el hTERT según el estadio o el grado de diferenciación tumoral.

- **Prueba de Mann-Whitney;** para dos muestras independientes: Se utiliza para contrastar si la distribución de un parámetro, cuando menos ordinal, es o no la misma en dos muestras independientes. Por ejemplo, para contrastar diferencias en la distribución del hTERT según el sexo. Es una prueba no paramétrica que contrasta dos muestras independientes.
- **Coefficientes de correlación:** Compara dos variables diferentes, verificando la hipótesis de si hay o no relación entre dos variables desde un punto de vista estadístico. Se ha utilizado el *test de Spearman* al realizarse un estudio no paramétrico (edad, CEA).

El nivel de *significatividad* empleado en todos los análisis bivariantes ha sido el 5% ($\alpha=0.05$)¹. Las relaciones estadísticamente significativas se visualizan en los gráficos más adecuados para su interpretación.

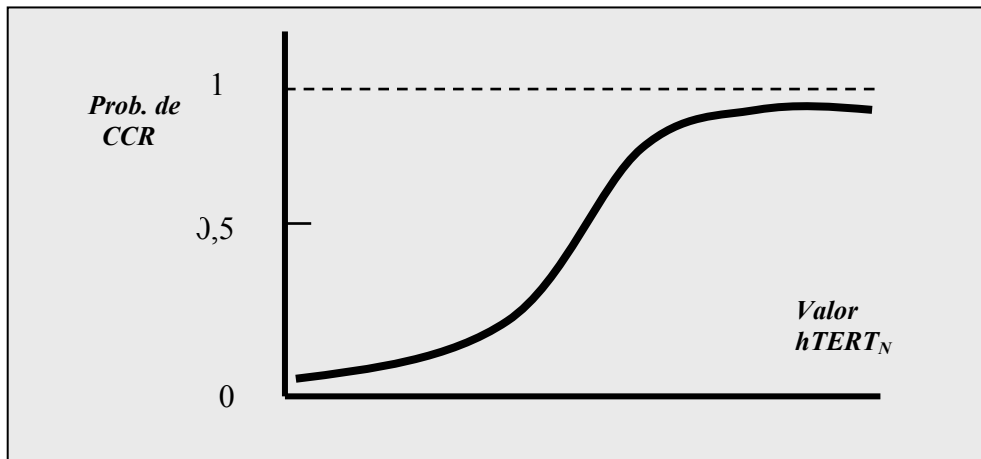
6.3. ANÁLISIS MULTIVARIANTE:

Hemos realizado un análisis multivariante con el objetivo de identificar los factores más significativos para explicar la presencia de cáncer colorrectal (en nuestro caso) entre todo el conjunto de variables de interés. Como técnica multivariante se han desarrollado modelos de regresión logística.

El modelo multivariante logístico expresa la probabilidad de emergencia en función de una serie de variables independientes. Constituye un planteamiento especial de Regresión Lineal Múltiple, en el que también se busca un modelo o ecuación capaz de predecir el valor que tomará una variable dependiente (Y) en función de los valores que presenten diversas variables independientes ($X_1...X_p$)^{136,137,138}.

La forma sigmoidea a la que se obliga matemáticamente el modelo constituye un acercamiento a la realidad biológica, ya que la influencia de un factor sobre la probabilidad de un hecho (valores de hTERT \rightarrow CCR) más que una recta, se asemeja a la curva habitual de respuesta a diferentes dosis de un estímulo.

¹ Cualquier p-valor menor a 0.05 es indicativo de una relación estadísticamente significativa. Por el contrario, un p-valor mayor o igual a 0.05 indica ausencia de relación.



El objetivo primordial que resuelve esta técnica es el de modelar cómo influye en la probabilidad de aparición de un suceso, habitualmente dicotómico, la presencia o no de diversos factores y el valor o nivel de los mismos.

Una de las características del modelo de regresión logística es la relación que guardan los coeficientes de un parámetro de cuantificación de riesgo conocido como “*odds ratio*”. El *odds* asociado a un suceso es el cociente entre la probabilidad de que ocurra frente a la probabilidad de que no ocurra¹³⁹.

$$odds = \frac{p}{1-p}$$

El modelo logístico expresa el *odds* como una función exponencial de las variables independientes:

$$\frac{p}{1-p} = e^{\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_n X_n}$$

Donde p es la probabilidad de aparición de CCR y X_i ($i=1\dots n$) son las variables independientes (sexo, edad, etc...). Los β_i son los coeficientes de regresión, a estimar en el análisis, de manera que una forma equivalente de escribir la ecuación es:

$$\frac{p}{1-p} = e^{\beta_0} e^{\beta_1 X_1} \dots e^{\beta_n X_n}$$

Es fácil ver que el aumento unitario de un determinado factor X_i , multiplica el *odds* por el valor e^{β_i} . Por tanto, la influencia significativa de un factor se va a medir en términos de variación producida en el *odds* de la emergencia.

Si en la ecuación de regresión tenemos un factor dicotómico como puede ser si el sujeto tiene o no CCR, el coeficiente β de la ecuación para ese factor está directamente relacionado con el *odds ratio* de tener CCR o no tenerlo:

$$OR = \exp(\beta)$$

Es decir, que $\exp(\beta)$ es una medida que cuantifica el riesgo que representa poseer el factor correspondiente respecto a no poseerlo, suponiendo que el resto de variables del modelo permanecen constantes. Cuando la variante es numérica, como la edad, es una medida que cuantifica el cambio en el riesgo cuando se pasa de un valor del factor a otro, permaneciendo constantes el resto de variables. Así, el *odds ratio* que supone pasar de la edad X_1 a la edad X_2 , siendo β el coeficiente correspondiente a la edad en el modelo logístico es:

$$OR = \exp[\beta \times (X_2 - X_1)]$$

El método de entrada de variables es una selección por pasos condicional hacia delante, con un p-valor de entrada de 0.05 y de salida 0.1 para las variables.

Los contrastes para las variables categóricas (en este caso todas) toman como referencia la primera categoría de cada variable con la que se compara la presencia o ausencia del resto.

Para la cuantificación de la bondad del ajuste proporcionada por el modelo se estudia como de probables son los resultados de la muestra, supuestos los parámetros estimados, cuánto es su verosimilitud, es decir, calcular la probabilidad de aparición del suceso, para todos los pacientes de la muestra. Para ello, se ha utilizado un estadístico definido como: menos dos veces el logaritmo de la verosimilitud (-2LL). Si -2LL es cero, el ajuste es perfecto.

Finalmente para la estimación del análisis de regresión logística para explicar la probabilidad de un diagnóstico de CCR, se han utilizado los 131 casos válidos en la muestra (81 pacientes + 50 controles). Las variables independientes consideradas inicialmente son todas aquellas que aparecen en la base de datos para la totalidad de la muestra. El modelo ha incluido tres variables: *EDAD*, *SEXO* y *hTERT*.

6.3.1. Sensibilidad, especificidad y curva ROC:

Muchas veces, en un test diagnóstico, tanto el patrón como el test presentarán un resultado dicotómico, positivo o negativo, con lo cual su enfrentamiento se podrá resumir en una tabla de contingencia 2x2 (2 filas y 2 columnas).

Los índices más característicos de un test son, pues, su sensibilidad y especificidad, siendo la sensibilidad como la probabilidad condicionada de que habiendo una enfermedad el test sea positivo. La especificidad es la proporción de verdaderos negativos o la probabilidad de que, no habiendo enfermedad, el test sea negativo.

Muchas pruebas producen resultados continuos (nivel de glucosa en sangre, hTERT...). El comportamiento de dichas pruebas depende de donde se ponga el punto de corte. Según se desplace el punto de corte, disminuyen los falsos positivos, pero aumentan los falsos negativos o, en otros términos, aumenta la sensibilidad y disminuye la especificidad o viceversa. Para ello se utilizan las curvas ROC (Response Operating Characteristic): son curvas en las que se presenta la sensibilidad en función de los falsos positivos (complementario de la especificidad) para distintos puntos de corte^{140,141} (Figura-36).

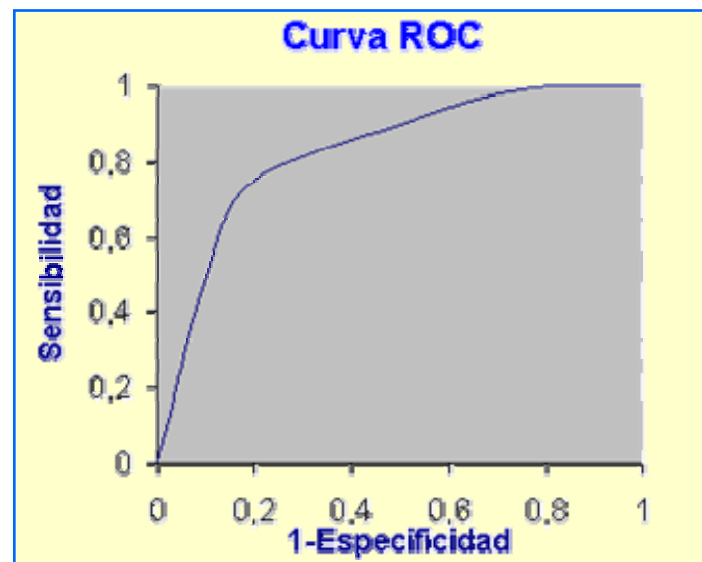


Figura 36.- Ejemplo de curva ROC.

Las fracciones de verdaderos y falsos positivos se calculan por separado para cada subgrupo, por tanto, la curva ROC es independiente de la prevalencia de la enfermedad en la muestra. Cada punto en la figura representa un par de sensibilidad/especificidad correspondiente a un umbral de decisión particular. Una prueba diagnóstica con una discriminación perfecta tiene una curva que pasa a través de la esquina superior izquierda, donde la fracción de verdaderos positivos es 1 o 100% (sensibilidad perfecta) y la fracción de falsos positivos es 0 (especificidad perfecta). Una figura teórica para una prueba que no discrimina (distribución idéntica de los resultados para ambos grupos) es una línea diagonal de 45° o desde la esquina inferior izquierda hasta la superior derecha. La mayoría de las representaciones caen entre estos extremos. Cuanto más cerca esté la línea de la esquina superior izquierda, mayor será la precisión de la prueba¹⁴² (Figura-37).

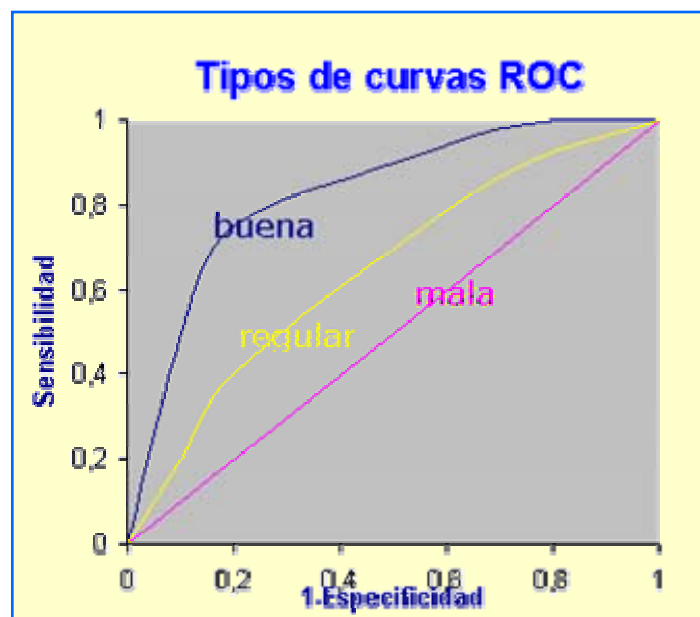


Figura 37.- Tipos de curva ROC.

La figura de la curva ROC proporciona un cuadro completo de la capacidad de una prueba para discriminar, se examinan todos los posibles umbrales de decisión; representa los pares de sensibilidad/especificidad para todo el rango de resultados observados. En el eje “Y” se representa la sensibilidad o la proporción de verdaderos positivos (VP/VP+FN). En el eje “X” está representada la fracción de falsos positivos o 1- especificidad (FP/FP+VN).

El área bajo la curva es el mejor indicador global de la precisión de una prueba diagnóstica, este área es siempre mayor o igual a 0.5, de manera que cuanto mayor sea el área que quede bajo la curva, mejor es el test. El rango de los valores se mueve entre 1 (prueba perfecta) y 0.5 (prueba inútil), la interpretación del valor del área sería del modo siguiente: un área de 0.8, sería la probabilidad de que ante un par de individuos, uno enfermo y el otro sano, la prueba los clasifique correctamente en el 80% de las veces.

Generalmente, cualquier índice diagnóstico se expresa en forma de porcentaje, a excepción de los *odds ratio*. Todos ellos, incluso el porcentaje de superficie bajo la curva ROC, se deben acompañar de un intervalo de confianza, habitualmente con el 95% de seguridad. En el caso de los porcentajes, y en este terreno de las pruebas diagnósticas, nunca se debe olvidar que el valor nulo o cero de la escala es el 50%. En efecto, un índice cuya estimación puntual sea el 50%, o cuyo intervalo de confianza contenga ese 50%, equivale a una utilidad diagnóstica 0.

En consecuencia, las curvas ROC son útiles para:

- Conocer el rendimiento global de una prueba. Área bajo la curva.
- Comparar dos pruebas o dos puntos de corte.
- Elegir el punto de corte apropiado para un determinado paciente.

Las limitaciones de su uso son que sólo contemplan dos estados clínicos posibles (sano y enfermo) y no sirven para situaciones en que se trata de discernir entre más de dos enfermedades.

La elección del punto de corte de la curva viene determinada por la tangente de la curva que en ese punto tiene una pendiente calculada con la siguiente fórmula:

$$PEN = \frac{C}{B} \times \frac{1-P}{P}$$

Donde C es el coste neto de tratar pacientes no enfermos (coste de falsos positivos), siendo B el beneficio de tratar sujetos enfermos (coste de verdaderos positivos), P la prevalencia de la enfermedad, y PEN la pendiente de la tangente¹⁴³.

RESULTADOS

1. – NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD hTERT DEL GEN DE LA TELOMERASA EN PLASMA:

1.1. EXPRESIÓN DEL GEN hTERT_N EN EL GRUPO DE PACIENTES CON CCR:

La expresión del gen hTERT_N de la telomerasa se detectó en los 81 pacientes con cáncer colorrectal. La mediana de la expresión en este grupo fue de 10.94. El valor mínimo detectado ha sido de 0.93, siendo el valor máximo de 54.72. En tan sólo 2 pacientes se ha obtenido un valor inferior a 1 (2.47%). En el siguiente cuadro se resumen estos resultados.

N = 81	
<i>Mediana:</i>	<i>10.94</i>
<i>Rango:</i>	<i>0.93-54.72</i>
<i>Media:</i>	<i>15.61</i>
<i>Desviación standard:</i>	<i>13.36</i>
<i>Pacientes con hTERT < 1:</i>	<i>2(2.47%)</i>

En la tabla-5, se reflejan los valores obtenidos del gen de forma individualizada en cada paciente, así como la edad, sexo y localización del tumor.

Tabla 5.- Pacientes: Sexo, edad, localización tumoral y expresión hTERT_N.

	SEXO	EDAD	LOCALIZACIÓN	hTERT_N
1	H	75	Colon-sigma	0.93
2	H	46	Colon	0.99
3	M	75	Colon-sigma	1.88
4	H	82	Colon	10.76
5	H	68	Colon	11.52
6	H	77	Colon-sigma	12.56
7	H	50	Recto	13.95
8	M	88	Colon	14.82
9	H	78	Recto	15.8
10	H	92	Colon	15.89
11	H	79	Colon	19
12	H	59	Recto	19.69
13	H	64	Recto	22.58
14	M	77	Colon	23.73
15	M	79	Colon	26.91
16	H	79	Recto	27.87
17	M	79	Colon-sigma	31.53
18	M	50	Recto	32.87
19	M	67	Recto	33.98
20	H	77	Recto	43.86
21	M	77	Colon	45.11
22	M	65	Colon-sigma	46.37
23	H	73	Recto	47.67
24	M	65	Recto	7.19
25	H	78	Recto	8.91
26	M	68	Colon	17.27
27	M	77	Colon	2.75
28	M	60	Recto	5.98
29	M	86	Colon	7.37
30	H	55	Colon-sigma	19.9
31	H	48	Recto	8.47
32	H	68	Colon-sigma	3.56
33	M	66	Recto	7.33
34	M	78	Recto	4.32
35	H	84	Colon	3.05
36	H	52	Recto	11.73
37	M	83	Recto	18.81
38	M	79	Colon-sigma	8.61
39	H	80	Recto	6.86
40	H	66	Colon-sigma	5.3
41	H	34	Recto	17.37
42	H	71	Recto	13.21
43	M	66	Colon-sigma	19
44	M	83	Recto	11.39
45	H	35	Recto	1.22

	SEXO	EDAD	LOCALIZACIÓN	<i>hTERT_N</i>
46	H	78	Colon-sigma	<i>5.14</i>
47	H	72	Recto	<i>5.36</i>
48	M	81	Colon	<i>4.23</i>
49	H	40	Recto	<i>8.64</i>
50	H	45	Colon-sigma	<i>11.39</i>
51	M	76	Recto	<i>10.94</i>
52	H	60	Colon-sigma	<i>10.53</i>
53	H	64	Recto	<i>5.31</i>
54	H	72	Recto	<i>5.93</i>
55	H	74	Colon	<i>17.27</i>
56	M	80	Colon-sigma	<i>8.26</i>
57	H	61	Recto	<i>8.5</i>
58	H	78	Recto	<i>12.21</i>
59	H	77	Recto	<i>21.67</i>
60	H	68	Colon-sigma	<i>54.72</i>
61	H	68	Colon	<i>5.6</i>
62	H	66	Colon	<i>11.84</i>
63	M	62	Colon	<i>5.05</i>
64	M	68	Colon-sigma	<i>15.7</i>
65	M	78	Colon	<i>37.19</i>
66	H	83	Recto	<i>1.45</i>
67	H	69	Colon-sigma	<i>5.31</i>
68	H	78	Recto	<i>1.97</i>
69	H	56	Colon-sigma	<i>5.21</i>
70	M	68	Colon-sigma	<i>15.05</i>
71	H	71	Colon-sigma	<i>3.14</i>
72	H	44	Recto	<i>44.97</i>
73	H	39	Colon	<i>5.06</i>
74	M	83	Colon	<i>23.08</i>
75	H	57	Recto	<i>3.24</i>
76	M	73	Recto	<i>14.59</i>
77	H	66	Recto	<i>39.65</i>
78	H	39	Colon	<i>6.23</i>
79	H	38	Recto	<i>5.33</i>
80	H	67	Recto	<i>24.71</i>
81	M	66	Recto	<i>5.02</i>

Tabla 5 (continuación).- Pacientes: Sexo, edad, localización tumoral y expresión $hTERT_N$.

1.2. EXPRESIÓN DEL GEN $hTERT_N$ EN EL GRUPO CONTROL:

La expresión del gen $hTERT_N$ de la telomerasa fue detectada en el grupo de 50 sujetos control. La mediana de expresión fue de 0.29. El valor mínimo ha sido de 0.00 (en 13 personas), mientras que el valor máximo de expresión es de 4.63. Se obtuvieron unos valores inferiores a 1 en 34 sujetos (68%). A continuación se resumen los resultados:

N= 50	
Mediana:	0.29
Rango:	0.00-4.63
Media:	0.84
Desviación standard:	1.178
Controles con $hTERT < 1$:	34(68%)
Controles con $hTERT = 0.00$:	13(26%)

En la tabla-6, se muestran los valores obtenidos del gen de forma individual, así como la edad, sexo y patología asociada en el grupo control.

Tabla 6.- Grupo control: Sexo, edad, patología asociada y expresión $hTERT_N$.

	SEXO	EDAD	PATOLOGÍA	$hTERT_N$
1	H	75	COLELITIASIS	0.00
2	H	33	VOLUNTARIO	0.00
3	M	21	COLELITIASIS	0.00
4	H	20	GINECOMASTIA	0.00
5	M	73	FÍSTULA PERINEAL	0.00
6	M	30	SINUS PERINEAL PERSISTENTE	0.00
7	H	43	COLITIS ULCEROSA	0.00
8	H	85	BRONQUITIS CRÓNICA	0.00
9	H	23	NEUMOTÓRAX	0.00
10	M	77	ESTENOSIS DE SIGMA DIVERTICULAR	0.00
11	M	24	APENDICITIS	0.00
12	M	39	OCLUSIÓN POR BRIDAS	0.00
13	M	64	VOLUNTARIO	0.00
14	H	34	RECONSTRUCCIÓN HARTMANN	0.01
15	H	35	VOLUNTARIO	0.02
16	M	70	VOLUNTARIO	0.04
17	H	50	VOLUNTARIO	0.04
18	M	30	VOLUNTARIO	0.08
19	H	53	HIDROSADENITIS PERIANAL	0.13
20	H	29	VOLUNTARIO	0.13
21	H	34	VOLUNTARIO	0.16
22	M	29	VOLUNTARIO	0.19
23	M	75	EVENTRACIÓN	0.23
24	H	56	VOLUNTARIO	0.27
25	M	32	CIERRE ILEOSTOMÍA	0.28
26	H	35	VOLUNTARIO	0.30
27	H	56	VOLUNTARIO	0.35
28	M	35	VOLUNTARIO	0.38
29	M	36	OBESIDAD MÓRBIDA	0.38

	SEXO	EDAD	PATOLOGÍA	$hTERT_N$
30	M	39	FÍSTULA ANO-VAGINAL	0.42
31	H	80	COLECISTITIS	0.66
32	M	47	QUISTE HIDATÍDICO	0.71
33	H	17	ABSCESO ISQUIORRECTAL	0.85
34	H	34	COLELITIASIS	0.99
35	H	32	VOLUNTARIO	1.08
36	H	20	VOLUNTARIO	1.08
37	M	45	VOLUNTARIO	1.12
38	H	20	VOLUNTARIO	1.13
39	M	41	VOLUNTARIO	1.14
40	M	83	COLECISTITIS	1.47
41	M	36	VOLUNTARIO	1.63
42	H	45	COLITIS ULCEROSA	1.63
43	M	85	VOLUNTARIO	1.78
44	M	84	FRACTURAS COSTALES	2.42
45	M	62	VOLUNTARIO	2.44
46	H	57	SIGMOIDITIS	3.03
47	M	27	VOLUNTARIO	3.1
48	H	65	HERNIA INGUINAL DERECHA	3.23
49	M	54	VOLUNTARIO	4.53
50	H	59	VOLUNTARIO	4.63

Tabla 6 (Continuación).- Grupo control: Sexo, edad, patología asociada y expresión $hTERT_N$.

1.3. COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL $hTERT_N$ ENTRE LOS DOS GRUPOS:

La mediana de la expresión del gen $hTERT_N$ en el grupo de pacientes con CCR ha sido significativamente más elevada ($p < 0.001$) (10.94), que el valor de la mediana del grupo control (0.29).

Cuando hemos analizado los datos de forma individualizada, el 100% de los pacientes obtuvieron un valor más elevado de expresión del gen que la mediana del grupo control (es decir, todos los pacientes han obtenido una expresión $hTERT_N$ superior a 0.29). Cabe destacar que 67 de los 81 pacientes (82.72%) han mostrado niveles de expresión superiores al valor máximo observado en el grupo control, es decir, superior a 4.63 (Figuras-38a y 38b).

Figura 38a.- Comparación entre los valores de la expresión del gen $hTERT_N$ entre el grupo control y el grupo con CCR (Se representan las medianas y rangos).

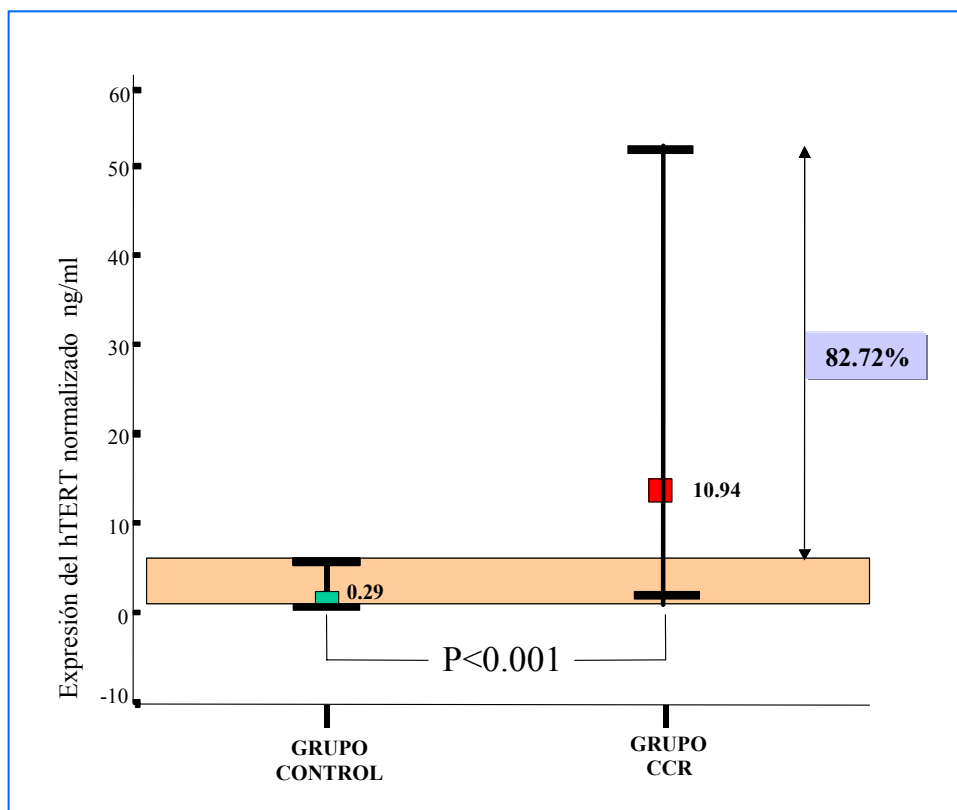
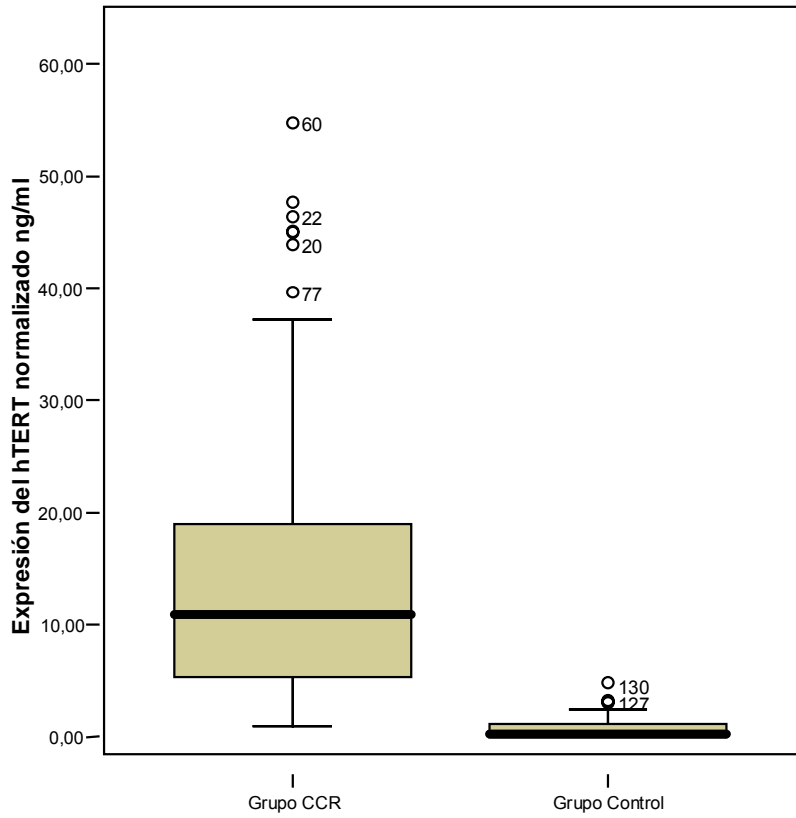


Figura 38b.- Comparación entre los valores de la expresión del gen $hTERT_N$ entre el grupo control y el grupo con CCR (Representación con diagramas de cajas).



Valores inusualmente elevados



Mediana



Representa el 50% de la muestra

En la siguiente tabla, se resumen y comparan los datos obtenidos en ambos grupos (tabla-7).

Tabla 7.- Resultados obtenidos de la cuantificación del gen $hTERT_N$ en ambos grupos.

	<i>N</i>	<i>hTERT_N</i> *
Grupo CCR	81	10.94 (0.93-54.72)
Grupo control	50	0.29 (0.00-4.63)
Test estadístico	-9.175**	
Valor P	<0.001	
Pacientes con $hTERT_N$ con valor superior a la mediana del grupo control	> 0.29 =	81 (100%)
Pacientes con $hTERT_N$ con valor superior al valor máximo del grupo control	> 4.63 =	67 (82.72%)

* Valor medianas (rango)

** Test U de Mann-Whitney

2. – VARIACIONES DE LA EXPRESIÓN DEL hTERT CON RESPECTO AL SEXO EN AMBOS GRUPOS:

Se han estudiado los valores de la expresión hTERT en función del sexo en cada uno de los dos grupos. En el grupo con CCR, de los 81 pacientes, 51 fueron hombres (62.96%) y 30 mujeres (37.04%). En este grupo, los niveles de hTERT en el sexo femenino fueron de (mediana y rango) 14.70 (1.88-46.37), discretamente superiores que en los varones que obtuvieron unos valores de 10.53 (0.93-54.72). La diferencia no ha sido significativa ($p=0.214$).

En el grupo control, de los 50 sujetos estudiados, 25 fueron hombres (50%) y 25 mujeres (50%). En este grupo, los valores de hTERT también fueron ligeramente superiores en mujeres: 0.38 (0-4.53) que en hombres: 0.27 (0-4.63), sin significación estadística ($p=0.688$). Los resultados anteriores se resumen en la tabla-8.

Tabla 8.- Comparación de la expresión del hTERT_N entre ambos sexos en los dos grupos.

Grupo CCR				
	HOMBRES	MUJERES	TEST. EST^{**}.	P
n	51 (62.96%)	30 (37.04%)		
hTERT_N[*]	10.53 (0.93-54.72)	14.70 (1.88-46.37)	-1.242	0.214
Grupo control				
	HOMBRES	MUJERES	TEST. EST^{**}.	P
n	25 (50%)	25 (50%)		
hTERT_N[*]	0.27 (0.00-4.63)	0.38 (0.00-4.53)	-0.401	0.688

* Mediana (rango)

** Test U Mann Whitney

3. - RELACIÓN DE LAS CIFRAS DEL hTERT CON LOS VALORES PREOPERATORIOS DEL ANTÍGENO CARCINOEMBRIÓNARIO (CEA) EN LOS PACIENTES:

En todos los pacientes, formando parte del estudio preoperatorio, se realizó la determinación del CEA, tomando como valores dentro de la normalidad los comprendidos entre 0 y 5ng/ml. Solamente 20 de los 81 pacientes (24.69%) han obtenido un CEA preoperatorio elevado. En la tabla-9, se reflejan los valores de CEA y expresión hTERT de forma individualizada en cada paciente.

El valor del CEA (mediana y rango) en los 81 pacientes ha sido de 2.83 (0.1-600). Los niveles de CEA preoperatorio fueron en las mujeres de 4.15 (0.1-500), discretamente superiores que en los hombres: 2.00 (0.1-600), al igual como sucedió con la determinación del hTERT_N, pero en este caso la diferencia presenta significación estadística (p=0.047).

Hemos comparado los niveles de CEA con los valores de expresión del hTERT_N, para ello se han dividido a los pacientes en dos grupos; por un lado los pacientes que presentaban un CEA preoperatorio dentro de los límites de la normalidad y por otro lado, los pacientes que obtuvieron un CEA elevado. En el primer grupo, 61 pacientes (75.31%) tenían un CEA normal, con una mediana de 2.00 (0.1-5), este grupo de pacientes ha obtenido una expresión hTERT_N de 8.91 (0.93-47.67) muy inferior a la alcanzada en el grupo de 20 pacientes con un CEA elevado: 23.50 (6-600), el cual ha presentado una expresión hTERT_N de 16.48 (2.75-54.72) aunque sin ser significativa esta diferencia (p=0.191). En la tabla-10, se resumen los niveles de CEA y valores hTERT_N en cada grupo.

Hemos subdividido los dos grupos también por sexos, de tal manera que se han analizado los valores de hTERT_N en hombres con un CEA elevado comparándolos con los valores hTERT_N en el grupo de hombres con un CEA normal. De igual forma, se ha procedido a comparar los valores hTERT_N de las mujeres con un CEA elevado, con los del grupo de mujeres con CEA normal.

Los niveles de hTERT_N en el subgrupo de hombres con CEA elevado ha sido superior: 13.95 (3.56-54.72) a los valores obtenidos en el subgrupo de hombres con CEA normal: 9.72 (0.93-47.67), aunque sin significación estadística (p=0.481).

Resultados similares se han obtenido en mujeres, duplicando los valores $hTERT_N$ en el subgrupo de mujeres con CEA elevado: 17.27 (2.75-32.87), frente a los valores $hTERT_N$ alcanzados en el subgrupo de mujeres con CEA normal: 8.61 (1.88-46.37), tampoco ha habido significación estadística en estos resultados ($p=0.451$).

Tabla 9.- Valores de CEA y $hTERT_N$ en cada paciente.

	CEA	$hTERT_N$
1	2	0.93
2	2	0.99
3	1	1.88
4	2	10.76
5	1	11.52
6	2	12.56
7	10	13.95
8	6	14.82
9	1.2	15.8
10	5	15.89
11	3	19
12	10	19.69
13	1	22.58
14	1	23.73
15	371	26.91
16	4	27.87
17	3	31.53
18	500	32.87
19	5	33.98
20	1	43.86
21	1	45.11
22	3	46.37
23	4	47.67
24	1	7.19
25	1	8.91
26	600	17.27
27	23	2.75
28	1	5.98
29	4	7.37
30	0.74	19.9
31	0.1	8.47
32	600	3.56
33	0.1	7.33
34	7	4.32
35	4	3.05
36	3	11.73
37	210	18.81
38	5	8.61

	CEA	<i>hTERT_N</i>
39	2	6.86
40	5	5.3
41	1	17.37
42	4	13.21
43	3	19
44	80.6	8.62
45	0.81	1.22
46	24	5.14
47	0.96	5.36
48	3	4.23
49	1	8.64
50	2	11.39
51	1	10.94
52	1	10.53
53	16	5.31
54	2	5.93
55	19	17.27
56	2.84	8.26
57	1.87	8.5
58	3.17	12.21
59	1.6	21.67
60	53	54.72
61	8.61	5.6
62	2.3	11.84
63	4.3	5.05
64	21.3	15.7
65	0.8	37.19
66	1.66	1.45
67	2.58	5.31
68	2.54	1.97
69	1.03	5.21
70	31	15.05
71	1.37	3.14
72	1.2	44.97
73	4	5.06
74	500	23.08
75	1.2	3.24
76	1.7	14.59
77	1.34	39.65
78	2.83	6.23
79	2	5.33
80	20.2	24.71
81	1.01	5.02

Tabla 9 (continuación).- Valores de CEA y $hTERT_N$ en cada paciente.

La tabla-10 y la figura-39, muestran la correlación entre los valores de hTERT_N y los valores de CEA (test de Spearman).

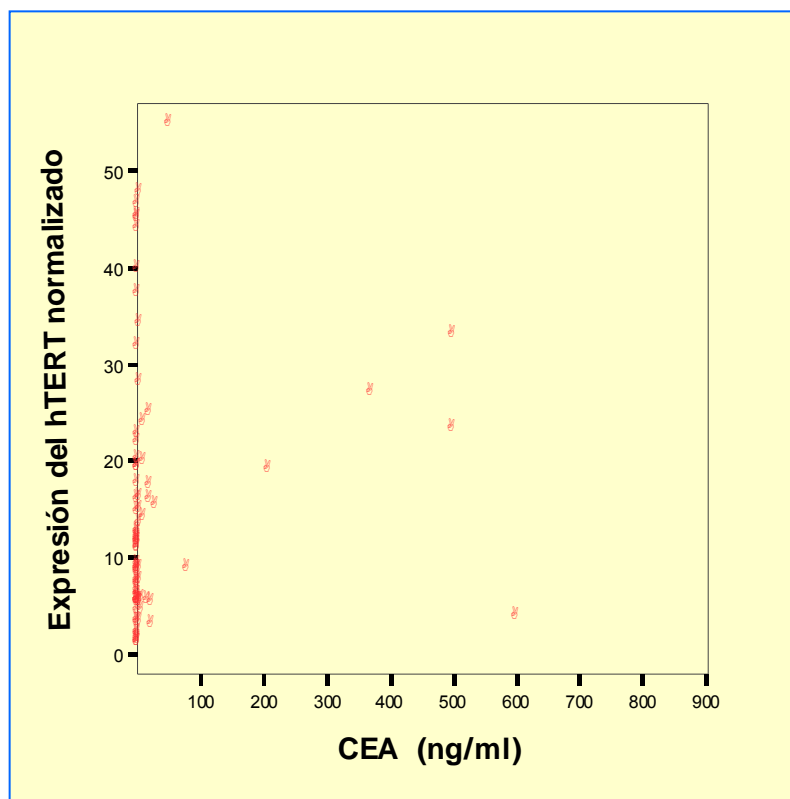
Tabla 10.- Correlación entre los valores de CEA y hTERT_N.

	N	CEA*	hTERT _N *	Test estad**	Valor P
CEA pacientes	81	2.83 (0.1-600)	10.94 (0.93-54.72)	0.138	0.218
Pac. con CEA normal	61	2.00 (0.1-5)	8.91 (0.93-47.67)	0.036	0.785
Pac. con CEA ↑	20	23.5 (6-600)	16.16 (2.75-54.72)	0.249	0.289

* Mediana (rango)

** Correlación de Spearman

Figura 39.- Gráfica de dispersión entre el CEA y la expresión del hTERT_N en el grupo de CCR. (Correlación no significativa. Spearman test=0.138, p=0.218).



En la tabla y figura anteriores, al correlacionar los valores de CEA y hTERT_N (Test de Spearman), para valorar si una mayor expresión de hTERT_N se corresponde a una mayor elevación del CEA, vemos que no es significativo. Hay un pequeño grupo de pacientes que presentan un CEA muy elevado, pero la mayoría de ellos se agrupan con un valor de CEA más bajo (p=0.218).

En la tabla-11, se presentan de forma detallada los niveles de CEA y hTERT_N divididos por sexos.

En la tabla-12 se resumen y comparan los valores entre ambas variables.

Tabla 11.- Comparación entre los valores de CEA y hTERT_N dividido por sexos.

	HOMBRES	MUJERES	TOTAL	Test estad **	Valor P
n	51	30	81(100%)		
CEA*	2.00 (0.1-600)	4.15 (0.1-500)		-1.986	0.047
hTERT_N*	10.53 (0.93-54.72)	14.59 (1.88-46.37)		-1.242	0.214
CEA N (0-5)					
n	42	19	61(75.3%)		
CEA*	2 (0.1-5)	2.84 (0.1-5)		-0.572	0.567
hTERT_N*	9.72 (0.93-47.67)	8.61 (1.88-46.37)		-0.677	0.498
CEA ↑ (≥6)					
n	9	11	20(24.7%)		
CEA*	19 (8.61-600)	80.58 (6-500)		-1.560	0.131
hTERT_N*	13.95 (3.56-54.72)	17.27 (2.75-32.87)		-0.532	0.603

* Valor mediana (rango)

** Test U Mann Whitney

En la anterior tabla, llama la atención que la diferencia de los valores de CEA entre hombres y mujeres, tanto en el grupo de pacientes con CEA normal como en el de CEA elevado no es significativa, a pesar de la considerable diferencia establecida sobretodo en este último grupo (19 en hombres frente a 80.58 en mujeres), ello es debido a que el número de pacientes con CEA elevado (n) es bajo. Sin embargo, al comparar los valores de CEA entre hombres y mujeres de forma global en el grupo de pacientes (valores de 2 frente a 4.15 respectivamente), la diferencia es significativa al aumentar considerablemente el tamaño de la muestra (p=0.047).

Tabla 12.- Resumen de los resultados obtenidos de la correlación entre los valores de CEA y hTERT_N.

CEA		GRUPO PACIENTES		
	CEA N	CEA ↑	Test estad ^{**} .	Valor P
hTERT _N [*]	8.91 (0.93-47.67)	16.48 (2.75-54.72)	-1.309	0.191
CEA		HOMBRES		
	CEA N	CEA ↑	Test estad ^{**} .	Valor P
hTERT _N [*]	9.72 (0.93-47.67)	13.95 (3.56-54.72)	-0.704	0.481
CEA		MUJERES		
	CEA N	CEA ↑	Test estad ^{**} .	Valor P
hTERT _N [*]	8.61 (1.88-46.37)	17.27 (2.75-32.87)	-0.753	0.451

* valor mediana (rango)

** Test U Mann Whitney

4. – VARIACIONES DE LA EXPRESIÓN DEL hTERT CON RESPECTO A LA EDAD EN AMBOS GRUPOS:

Se han analizado los valores de la expresión hTERT_N en función de la edad en ambos grupos, de manera que al comparar las medianas de edad del grupo con CCR con respecto al grupo control, vemos que hay una gran diferencia significativa ($p < 0.001$), siendo la mediana de edad en el grupo con CCR de 69 años (34-92), muy superior a la mediana del grupo control, siendo esta de 40 años (17-85). Es por ello que hemos creído oportuno, con el fin de evitar posibles sesgos, el comparar dos subgrupos de edades similares.

Con esta finalidad hemos dividido a ambos grupos en dos subgrupos: a) edad inferior o igual a 50 años, y b) los sujetos de edad superior a 50 años, de manera que hemos comparado la expresión hTERT_N de forma aislada en cada grupo, es decir; si han habido diferencias dentro del grupo con CCR entre los pacientes de más de 50 años y los de menos de 50 años. De igual forma se ha procedido en el grupo control.

Por otro lado, hemos comparado también la expresión hTERT_N entre los sujetos de menos de 50 años del grupo con CCR con los del mismo intervalo de edad del grupo control. De forma similar se ha procedido con los sujetos de más de 50 años en los dos grupos.

En el grupo con CCR, tan sólo 12 pacientes (14.81%) tenían una edad igual o inferior a 50 años, mientras que 69 pacientes (85.19%) tenían una edad superior a 50 (Tabla-13b). No se han obtenido diferencias significativas ($p = 0.473$) en los valores de hTERT_N entre ambos grupos de edad (mediana; 8.56 frente a 11.52 respectivamente) (Tabla-13a).

Por otra parte, en el grupo control, son 31 sujetos (62%) los que tenían una edad inferior a 50 años y 19 (38%) los que la tenían superior (Tabla-13b). Tampoco han habido diferencias significativas entre los valores de hTERT_N en estos dos grupos ($p = 0.255$) (mediana; 0.28 frente a 0.35 respectivamente) (Tabla-13a).

Al comparar los dos grupos de edad: inferior y superior a 50 años, vemos que sigue habiendo una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la expresión hTERT_N del grupo con CCR con respecto al grupo control, de forma que en los pacientes con edad inferior a 50 años, los valores hTERT_N han sido de 8.56 con respecto

a 0.28 del grupo control ($p < 0.001$). Sin embargo, debido al reducido número de enfermos con CCR y edad inferior a 50 años, pensamos que hay que tener cierta cautela al interpretar estos resultados, aunque creemos que con un número más amplio de pacientes, los niveles de $hTERT_N$ en este grupo serían incluso mayores con una tendencia a igualarse con los valores $hTERT_N$ del grupo de pacientes con edad superior a 50 años. La expresión del gen en dicho grupo ha sido de 11.52 muy superior a 0.35 de los sujetos control del mismo grupo de edad ($p < 0.001$). En la tabla-13b, pueden verse con mayor claridad estos resultados.

Finalmente, en las figuras-40a y 40b, se muestra la gráfica de dispersión entre la edad y la expresión $hTERT_N$ tanto en el grupo con CCR como en el grupo control, en la que no se evidencia correlación significativa ($p = 0.577$ y $p = 0.248$ respectivamente), es decir, la expresión $hTERT$ es independiente (no guarda relación) de la edad en ambos grupos (correlación de Spearman).

Tabla 13a.- Comparación de la expresión $hTERT_N$ entre sujetos por encima y por debajo de 50 años en un mismo grupo.

	$\leq 50^*$	$> 50^*$	Test estadístico ^{***}	Valor P
$hTERT_N^{**}$	8.56	11.52	-0.718	0.473
CCR	(0.99-44.97)	(0.93-54.72)		
$hTERT_N^{**}$	0.28	0.35	-1.139	0.255
CONTROL	(0.00-3.1)	(0.00-4.63)		

* Edad (años)

** Valor mediana (rango)

*** Test U Mann Whitney

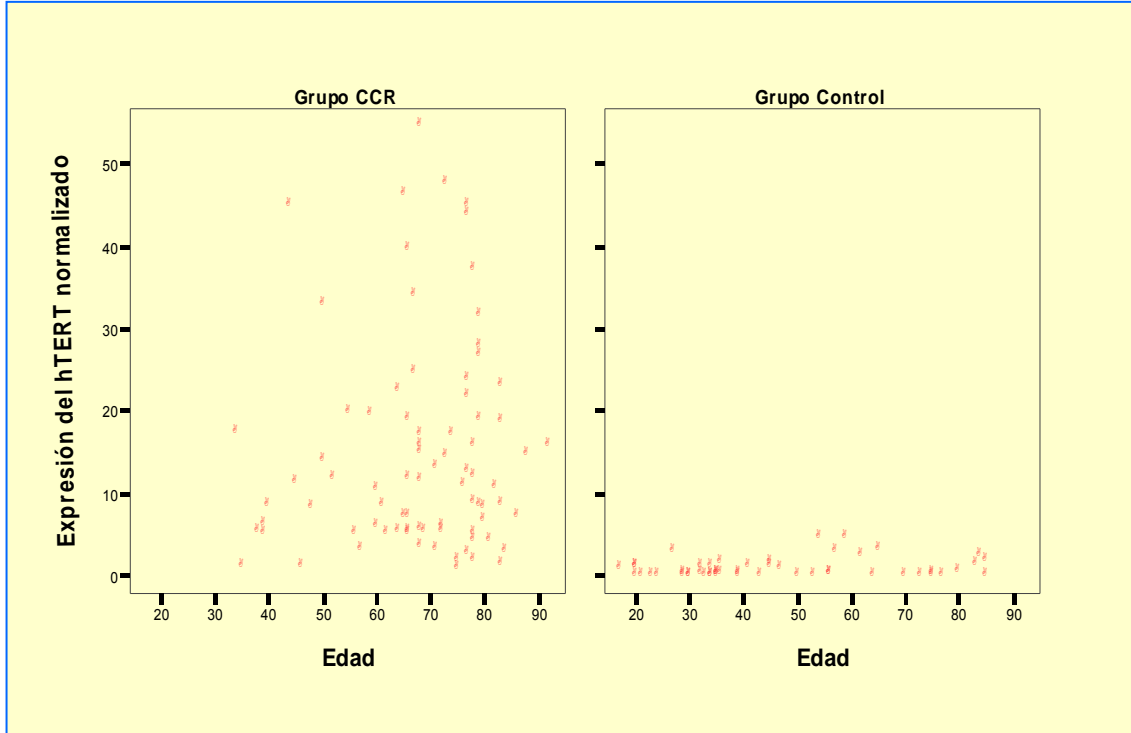
Tabla 13b.- Comparación de la edad y los valores de expresión hTERT_N entre el grupo con CCR y el grupo control en sujetos por encima y por debajo de 50 años.

EDAD				
	Grupo CCR	Grupo control	Test estad**.	Valor P
Global*	69 (34-92) n= 81 (100%)	40 (17-85) n= 50 (100%)	-5.636	<0.001
≤ 50*	42 (34-50) n= 12 (14.81%)	34 (17-50) n= 31 (62%)		
> 50*	73 (52-92) n= 69 (85.19%)	70 (53-85) n= 19 (38%)		
hTERT_N*				
	Grupo CCR	Grupo control	Test estad**.	Valor P
Global	10.94 (0.93-54.72)	0.29 (0.00-4.63)	-9.175	<0.001
≤ 50	8.56 (0.99-44.97)	0.28 (0.00-3.1)	-4.741	<0.001
> 50	11.52 (0.93-54.72)	0.35 (0.00-4.63)	-6.182	<0.001

* Valor mediana (rango)

** Test U Mann Whitney

Figuras 40a y 40b.- Gráfica de dispersión entre la edad y la expresión del hTERT_N en el grupo de CCR y el control (correlación no significativa, p-valor Spearman's rank test= 0.577 y 0.248 respectivamente).



5. - CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DEL hTERT Y EL ESTADIO TUMORAL DE LOS PACIENTES:

Hemos intentado correlacionar la expresión hTERT_N en función del estadio tumoral de los pacientes, para ello, se ha utilizado la clasificación de la “American Joint Comite on Cancer-AJCC-TNM”. De esta forma, en función del estudio histológico de los especímenes quirúrgicos, 1 paciente (1.23%) se encontraba en estadio TisN₀M₀ (estadio 0) en el momento de la intervención, 17 pacientes (20.99%) se encontraban en estadio T₁₋₂N₀M₀ (estadio I), 33 pacientes (40.74%) en estadio T₃₋₄N₀M₀ (estadio II), 20 pacientes (24.69%) en estadio T₂₋₄N₁₋₂M₀ (estadio III) y 10 pacientes (12.35%) en estadio T₁₋₄N₁₋₂M₁ (estadio IV). En la tabla-14, se refleja de forma individualizada el estadio de cada paciente con su expresión hTERT_N.

Las diferencias han sido estadísticamente significativas entre la expresión del hTERT_N y cada estadio tumoral. De manera que, el único paciente con estadio 0, tenía un hTERT_N de 45.11⁽¹⁾. Los pacientes con estadio I, han obtenido una expresión hTERT_N (mediana+rango) de 5.36 (1.22-43.86). Los pacientes con estadio II, la expresión hTERT_N fue de 8.91 (0.93-46.37), mientras que en los pacientes con estadio III han presentado una expresión hTERT_N de 10.24 (0.99-47.67), siendo de 20.18 (8.62-54.72) en los 10 pacientes con estadio IV (p=0.032). Vemos que en líneas generales ha habido un incremento progresivo de los valores hTERT_N a medida que el estadio tumoral de la enfermedad era mayor, siendo este incremento significativo. En la tabla-15, se resumen estos resultados. La figura-41, compara la mediana y el rango del CEA y hTERT_N para cada estadio tumoral.

¹ A la hora de comparar los valores hTERT_N en función del estadio tumoral, hemos considerado obviar el único paciente con estadio-0, al presentar este un valor muy disperso e inusualmente elevado y ser un solo paciente, por lo que se han comparado los estadios I, II, III y IV.

Tabla 15.- Mediana y rango de la expresión de hTERT_N y CEA para cada estadio tumoral.

	n (%)	hTERT_N[*]	CEA[*]
ESTADIO-0^{**}	1 (1.23%)	45.11	1
ESTADIO-1	17 (20.99%)	5.36 (1.22-43.86)	2.54 (0.74-16)
ESTADIO-2	33 (40.74%)	8.91 (0.93-46.37)	2.58 (0.1-500)
ESTADIO-3	20 (24.69%)	10.24 (0.99-47.67)	2.15 (0.8-600)
ESTADIO-4	10 (12.35%)	20.18 (8.62-54.72)	42.00 (1.2-500)
Kruskall-Wallis		8.771	12.332
P		0.032	0.006

* Valor mediana (rango)

** Se ha excluido este valor

Según la tabla anterior, se evidencia que existe una correlación entre el estadio tumoral y los valores de hTERT_N y CEA. De manera que cuanto más avanzado es el estadio tumoral mayores son los niveles de CEA y la expresión hTERT_N. Ahora bien, mientras que en los valores de hTERT_N el incremento es progresivo en función del estadio, los niveles de CEA, en cambio, presentan un aumento brusco en el estadio-4.

Figura 41.- Comparación entre la expresión de hTERT_N y CEA para cada estadio tumoral (Kruskall-Wallis test, p= 0.032 y 0.006 respectivamente) (representación con diagrama de cajas).

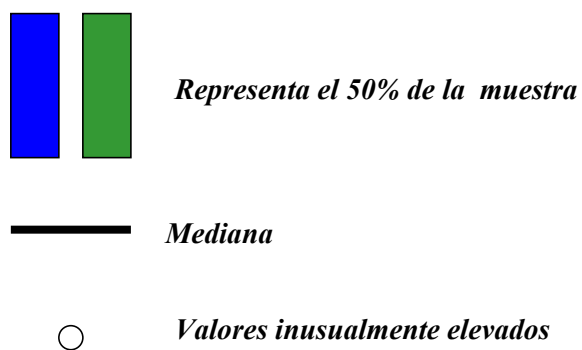
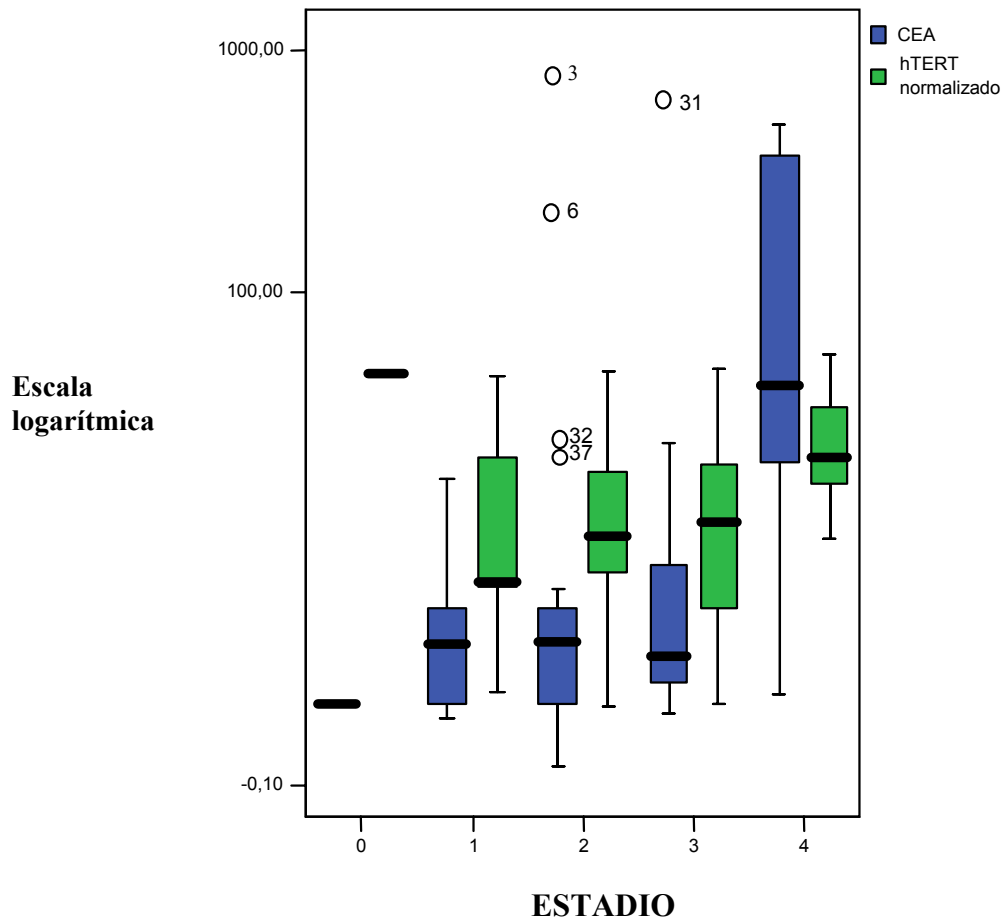


Tabla 14.- Estadío TNM y expresión $hTERT_N$ de los pacientes.

	TNM	$hTERT_N$
1	T3N0M0	0.93
2	T3N1M0	0.99
3	T3N0M0	1.88
4	T3N0M0	10.76
5	T4N0M0	11.52
6	T3N0M0	12.56
7	T2N0M0	13.95
8	T3N1M0	14.82
9	T3N1M0	15.8
10	T3N0M0	15.89
11	T3N0M0	19
12	T2N0M0	19.69
13	T2N0M0	22.58
14	T3N1M0	23.73
15	T3N1M1	26.91
16	T3N0M0	27.87
17	T2N0M0	31.53
18	T3N1M1	32.87
19	T3N0M0	33.98
20	T2N0M0	43.86
21	TisN0M0	45.11
22	T3N0M0	46.37
23	T3N2M0	47.67
24	T1N0M0	7.19
25	T3N0M0	8.91
26	T3N0M0	17.27
27	T3N2M0	2.75
28	T3N0M0	5.98
29	T4N0M0	7.37
30	T2N0M0	19.9
31	T3N0M0	8.47
32	T4N1M0	3.56
33	T3N0M0	7.33
34	T3N2M0	4.32
35	T3N0M0	3.05
36	T3N0M0	11.73
37	T3N0M0	18.81
38	T3N0M0	8.61
39	T3N0M0	6.86
40	T3N0M0	5.3
41	T3N0M0	17.37
42	T1N0M0	13.21
43	T3N0M0	19
44	T3N0M1	8.62

	TNM	<i>hTERT_N</i>
45	T1N0M0	1.22
46	T3N0M0	5.14
47	T2N0M0	5.36
48	T1N0M0	4.23
49	T3N2M0	8.64
50	T3N2M1	11.39
51	T3N0M0	10.94
52	T3N0M0	10.53
53	T2N0M0	5.31
54	T3N0M0	5.93
55	T4N2M1	17.27
56	T3N0M0	8.26
57	T2N1M0	8.5
58	T3N1M0	12.21
59	T3N2M0	21.67
60	T3N0M1	54.72
61	T3N1M0	5.6
62	T3N1M0	11.84
63	T2N0M0	5.05
64	T4N0M1	15.7
65	T3N1M0	37.19
66	T3N1M0	1.45
67	T3N0M0	5.31
68	T2N0M0	1.97
69	T2N0M0	5.21
70	T3N2M1	15.05
71	T2N0M0	3.14
72	T3N1M1	44.97
73	T2N0M0	5.06
74	T3N1M1	23.08
75	T3N1M0	3.24
76	T2N1M0	14.59
77	T3N1M0	39.65
78	T3N1M0	6.23
79	T3N0M0	5.33
80	T4N0M0	24.71
81	T3N0M0	5.02

Tabla 14 (continuación).- Estadio TNM y expresión hTERT_N de los pacientes.

5.1. COMPARACIÓN DE LOS VALORES DE LA EXPRESIÓN DEL hTERT_N Y DEL CEA ENTRE LOS PACIENTES CON O SIN METÁSTASIS TANTO LINFÁTICAS COMO A DISTANCIA (hepáticas):

De igual forma, hemos analizado los niveles de hTERT_N en los pacientes que presentaban metástasis hepáticas en el momento de la intervención (estadio IV), comparándolos con los que no las presentaban. Se ha procedido de la misma manera valorando la presencia o ausencia de metástasis ganglionares del espécimen quirúrgico, analizando el hTERT_N en ambos grupos. Se han encontrado diferencias significativas entre los pacientes con y sin metástasis, siendo en este último grupo, el hTERT_N superior con respecto a los pacientes sin metástasis hepáticas (20.18 frente a 8.64) (p=0.005). Sin embargo, no hemos encontrado diferencias en la expresión hTERT_N entre los pacientes con y sin invasión ganglionar aunque éste, ha sido discretamente superior en el grupo de pacientes con afectación linfática (14.59 frente a 8.77) (p=0.304).

Al analizar los valores de CEA preoperatorio, las diferencias también han sido significativas entre los pacientes con y sin metástasis hepáticas (42.00 frente a 2.30) (p=0.001), en cambio, al comparar estos valores entre el grupo de pacientes con y sin invasión ganglionar, éstas diferencias tampoco han presentado significación (2.83 frente a 2.71) (p=0.175). La tabla-16, resume todos éstos resultados.

Tabla 16.- Comparación de la expresión hTERT_N en pacientes con y sin metástasis hepáticas y ganglionares. Se presentan los valores de CEA para los mismos grupos.

	n (%)	hTERT_N[*]	CEA[*]
N₀	54 (66.67%)	8.77 (0.93-54.72)	2.71 (0.10-500)
N₁	27 (33.33%)	14.59 (0.99-47.67)	2.83 (0.8-600)
U Mann Whitney		-1.027	-1.356
P		0.304	0.175
	n (%)	hTERT_N[*]	CEA[*]
M₀	71 (87.65%)	8.64 (0.93-47.67)	2.30 (0.1-600)
M₁	10 (12.35%)	20.18 (8.62-54.72)	42.00 (1.2-500)
U Mann Whitney		-2.792	-3.447
P		0.005	0.001

* Valor mediana (rango)

6. – RELACIÓN ENTRE LAS CIFRAS DEL hTERT Y EL GRADO DE DIFERENCIACIÓN TUMORAL:

Otra de las variables que hemos intentado correlacionar son las cifras de expresión del hTERT_N en función del grado de diferenciación tumoral determinado por el estudio histológico del espécimen quirúrgico. En 12 casos (14.81%) eran tumores bien diferenciados, 59 casos (72.64%) fueron tumores moderadamente diferenciados, de los cuales 5 pertenecían a la variante mucinosa, y 10 casos (12.35%) han sido tumores pobremente diferenciados. En la tabla-17 se describen las características histológicas de los tumores en el grupo de pacientes.

Los pacientes con tumores bien diferenciados, han obtenido una expresión hTERT_N (valor mediana + rango) de 5.65 (1.22-31.53). El grupo de pacientes con tumores moderadamente diferenciados los niveles del hTERT_N han sido de 11.52 (0.93-54.72), mientras que los 10 pacientes con tumores de bajo grado de diferenciación sus valores fueron de 15.15 (5.33-44.97). Tampoco se han encontrado diferencias estadísticamente significativas ($p=0.104$) entre los diferentes grados de diferenciación tumoral, aunque se observa cierta tendencia a obtener niveles más elevados de hTERT_N en los pacientes con tumores peor diferenciados, de hecho si comparamos tan sólo los pacientes con tumores bien y mal diferenciados la diferencia si presenta significación estadística ($p=0.048$). Los resultados descritos se resumen en la tabla-18.

Tabla 18.- Comparación de la expresión hTERT_N según los grados de diferenciación tumoral.

Diferenciación	n (%)	hTERT _N *
<i>Ac. Bien dif.¹</i>	12 (14.81%)	5.65 (1.22-31.53)
<i>Ac. Mod. Dif.²</i>	59 (72.84%)	11.52 (0.93-54.72)
<i>Ac. Pobre. Dif.³</i>	10 (12.35%)	15.15 (5.33-44.97)
<i>Kruskall-Wallis</i>		4.530
<i>P</i>		0.104
<i>P entre 1 y 3</i>		0.048

* Valor mediana (rango)

Tabla 17.- Características anatomopatológicas del tumor y expresión hTERT_N de los pacientes.

	Diferenciación Tumoral	Inv. neural y vasc.	hTERT_N
1	Ac. Mod. Dif.	ausente	0.93
2	Ac. Mod. Dif.	ausente	0.99
3	Ac. Bien Dif.	ausente	1.88
4	Ac. Mod. Dif.	ausente	10.76
5	Ac. Mod. Dif. mucinoso	ausente	11.52
6	Ac. Mod. Dif.	ausente	12.56
7	Ac. Bien Dif.	vascular	13.95
8	Ac. Bien Dif.	ausente	14.82
9	Ac. Mod. Dif.	ausente	15.8
10	Ac. Mod. Dif.	vascular y neural	15.89
11	Ac. Mod. Dif.	ausente	19
12	Ac. Bien Dif.	ausente	19.69
13	Ac. Mod. Dif. mucinoso	ausente	22.58
14	Ac. Mod. Dif.	vascular y neural	23.73
15	Ac. Mod. Dif.	ausente	26.91
16	Ac. Mod. Dif.	ausente	27.87
17	Ac. Bien Dif.	ausente	31.53
18	Ac. Mod. Dif.	ausente	32.87
19	Ac. Mod. Dif.	neural	33.98
20	Ac. Mod. Dif.	ausente	43.86
21	Ac. Mod. Dif.	ausente	45.11
22	Ac. Mod. Dif. infiltrante	ausente	46.37
23	Ac. Mod. Dif.	ausente	47.67
24	Ac. Bien Dif.	ausente	7.19
25	Ac. Mod. Dif.	vascular	8.91
26	Ac. Mod. Dif.	ausente	17.27
27	Ac. Mod. Dif.	ausente	2.75
28	Ac. Mod. Dif.	ausente	5.98
29	Ac. Mod. Dif. Ulcerado	ausente	7.37
30	Ac. Mod. Dif.	ausente	19.9
31	Ac. Mod. Dif.	vascular y neural	8.47
32	Ac. Mod. Dif.	ausente	3.56
33	Ac. Mod. Dif.	ausente	7.33
34	Ac. Mod. Dif.	neural	4.32
35	Ac. Mod. Dif.	ausente	3.05
36	Ac. Mod. Dif.	ausente	11.73
37	Ac. Mod. Dif.	ausente	18.81
38	Ac. Mod. Dif.	ausente	8.61
39	Ac. Mod. Dif.	vascular	6.86
40	Ac. Mod. Dif.	ausente	5.3
41	Ac. Mod. Dif. Ulcer. Fun.	ausente	17.37
42	Ac. Mod. Dif.	ausente	13.21
43	Ac. Mod. Dif.	neural	19
44	Ac. Pob. Dif.	ausente	8.62
45	Ac. Bien Dif.	ausente	1.22

	Diferenciación Tumoral	Inv. neural y vasc.	<i>hTERT_N</i>
46	Ac. Mod. Dif.	neural	5.14
47	Ac. Mod. Dif.	ausente	5.36
48	Ac. Bien Dif.	ausente	4.23
49	Ac. Mod. Dif.	ausente	8.64
50	Ac. Mod. Dif.	vascular y neural	11.39
51	Ac. Mod. Dif.	ausente	10.94
52	Ac. Mod. Dif.	ausente	10.53
53	Ac. Mod. Dif.	ausente	5.31
54	Ac. Mod. Dif.	ausente	5.93
55	Ac. Mod. Dif.	ausente	17.27
56	Ac. Pob. Dif.	ausente	8.26
57	Ac. Mod. Dif.	ausente	8.5
58	Ac. Mod. Dif. Mucinoso	ausente	12.21
59	Ac. Pob. Dif.	ausente	21.67
60	Ac. Mod. Dif.	neural	54.72
61	Ac. Pob. Dif.	ausente	5.6
62	Ac. Mod. Dif. Mucinoso	vascular	11.84
63	Ac. Mod. Dif.	ausente	5.05
64	Ac. Mod. Dif.	ausente	15.7
65	Ac. Mod. Dif.	ausente	37.19
66	Ac. Mod. Dif.	ausente	1.45
67	Ac. Mod. Dif.	ausente	5.31
68	Ac. Bien Dif.	ausente	1.97
69	Ac. Mod. Dif.	ausente	5.21
70	Ac. Mod. Dif.	ausente	15.05
71	Ac. Bien Dif.	vascular	3.14
72	Ac. Pob. Dif.	ausente	44.97
73	Ac. Bien Dif.	ausente	5.06
74	Ac. Pob. Dif.	vascular y neural	23.08
75	Ac. Mod. Dif.	ausente	3.24
76	Ac. Mod. Dif.	ausente	14.59
77	Ac. Pob. Dif.	ausente	39.65
78	Ac. Bien Dif.	ausente	6.23
79	Ac. Pob. Dif.	ausente	5.33
80	Ac. Pob. Dif.	vascular y neural	24.71
81	Ac. Pob. Dif.	vascular	5.02

*Tabla (continuación) 17.- Características anatomopatológicas del tumor y expresión *hTERT_N* de los pacientes.*

7. - RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD TELOMERASA EN TEJIDOS: TUMORALES Y DE MUCOSA SANA DE COLON.

Finalmente, se han analizado muestras de tejido tumoral y de mucosa sana de colon adyacente al tumor, determinándose la actividad telomerasa en 10 de los pacientes del grupo con cáncer colorrectal (se escogieron los 10 primeros pacientes estudiados), permitiendo conocer de esta forma si dicha actividad se encuentra incrementada en tejido tumoral y si estos resultados se correlacionan con los niveles de expresión de la subunidad del gen de la telomerasa ($hTERT_N$) obtenidos en plasma en el mismo individuo.

En los 10 casos analizados, se ha observado una mayor actividad telomerasa en los tejidos tumorales con una mediana de 17.46 (4.74-58.71) con respecto a los obtenidos en la mucosa sana en los mismos pacientes: 3.88 (1.36-12.56). Esta correlación ha sido estadísticamente significativa ($p=0.005$). La mediana de expresión $hTERT_N$ plasmático en estos pacientes fue de 14.27 (0.93-46.67). La tabla-19, resume estos resultados y en la tabla-20 se pueden comparar los resultados de forma individual.

Tabla 19.- Actividad telomerasa en tejidos y mucosa. Expresión $hTERT_N$.

	N	$hTERT_N^{* (a)}$/Actividad Telomerasa $^{* (b)}$
Plasma¹	10	<i>(a) 14.27 (0.93-46.67)</i>
Tumor²		<i>(b) 17.46 (4.74-58.71)</i>
Mucosa sana³		<i>(b) 3.88 (1.36-12.56)</i>
Wilcoxon		-2.803
P entre 2 y 3		0.005

* Valor mediana (rango)

Tabla 20.- Actividad telomerasa en tejidos y mucosa de colon. Expresión hTERT_N en plasma en los 10 pacientes estudiados.

	hTERT_N PLASMA	ACTIVIDAD TELOMERASA Mucosa colon	ACTIVIDAD TELOMERASA Tumor
1	0.93	1.36	15.72
2	7.19	2.00	9.00
3	10.76	2.51	19.20
4	11.52	3.67	4.74
5	12.56	3.75	5.90
6	15.98	4.01	31.00
7	32.98	4.27	5.41
8	33.98	10.41	32.32
9	45.11	10.50	58.71
10	47.67	12.56	26.13
<u>Mediana</u>	<u>14.27</u>	<u>3.88</u>	<u>17.46</u>

8. – SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL hTERT_N COMO PRUEBA DIAGNÓSTICA:

Se ha realizado un análisis de regresión logística para explicar la probabilidad de un diagnóstico de cáncer si se conoce el valor de hTERT_N, es decir, cuantas veces es más probable que ante un determinado valor del hTERT_N un sujeto presente CCR. Para la estimación se han utilizado los 131 casos válidos en la muestra (81 pacientes con CCR y 50 controles). Las variables independientes consideradas inicialmente son todas aquellas que aparecen en la base de datos para la totalidad de la muestra (en nuestro caso sexo y edad).

El modelo ha incluido tres variables: **EDAD**, **SEXO** y **hTERT**. La tabla de estimaciones obtenida es:

<i>Factor</i> ↓	<i>Categoría</i> ↓	<i>Beta</i> ↓	<i>p-valor</i> ↓	<i>Exp(Beta)</i> ↓
SEXO	Varón (referencia)			
	Mujer	<i>-1.765</i>	<i>0.046</i>	<i>0.171</i>
EDAD		<i>0.054</i>	<i>0.025</i>	<i>1.056</i>
hTERT		<i>1.070</i>	<i><0.001</i>	<i>2.916</i>
Constante		<i>-5.577</i>	<i>0.001</i>	<i>0.004</i>

El Exp(Beta) representa el riesgo en la categoría indicada respecto a la de referencia (odds ratio).

El sexo, como variable de control, influye en el riesgo de presentar cáncer. En concreto, las mujeres tienen menos probabilidad de presentar cáncer, con una disminución del *odds* respecto de los varones del 83% (1-0.171).

La edad es otra variable de control que afecta significativamente a la probabilidad de tener cáncer de colon. A medida que aumenta la edad, mayor es la probabilidad de cáncer. Así, cada año aumenta el *odds* de cáncer en un 5.6% (1-1.056).

☑ El $hTERT_N$ es la variable del estudio que más determina la presencia de cáncer. La elevación de sus valores es indicador de un alto riesgo de padecer cáncer. Un incremento de una unidad en la variable $hTERT$ incrementa el *odds* de cáncer en casi el 200% (1-2.916).

El modelo obtenido permite predecir la probabilidad de diagnóstico de cáncer y compararlo con el diagnóstico real para evaluar la bondad del mismo. Para ello, se ha determinado como punto de corte la probabilidad de 0.7, por ser ésta en la que mayores valores de sensibilidad y especificidad se alcanzan (es decir, si un sujeto tiene una probabilidad pronosticada de cáncer de 0.7 o superior es diagnosticado de cáncer):

	Modelo total
% casos correctamente pronosticados por el modelo	93.1%
% falsos positivos	2.6%
% falsos negativos	12.7%
Sensibilidad	91.4%
Especificidad	96.0%
Valor predictivo de test positivo	97.4%
Valor predictivo de test negativo	87.3%

La curva ROC muestra que el valor umbral de $p=0.7$ utilizado para pronosticar es adecuado, no encontrándose otro que pueda mejorar sustancialmente el equilibrio entre sensibilidad y especificidad. Además, el área bajo la curva es de 0.985 (figura-42).

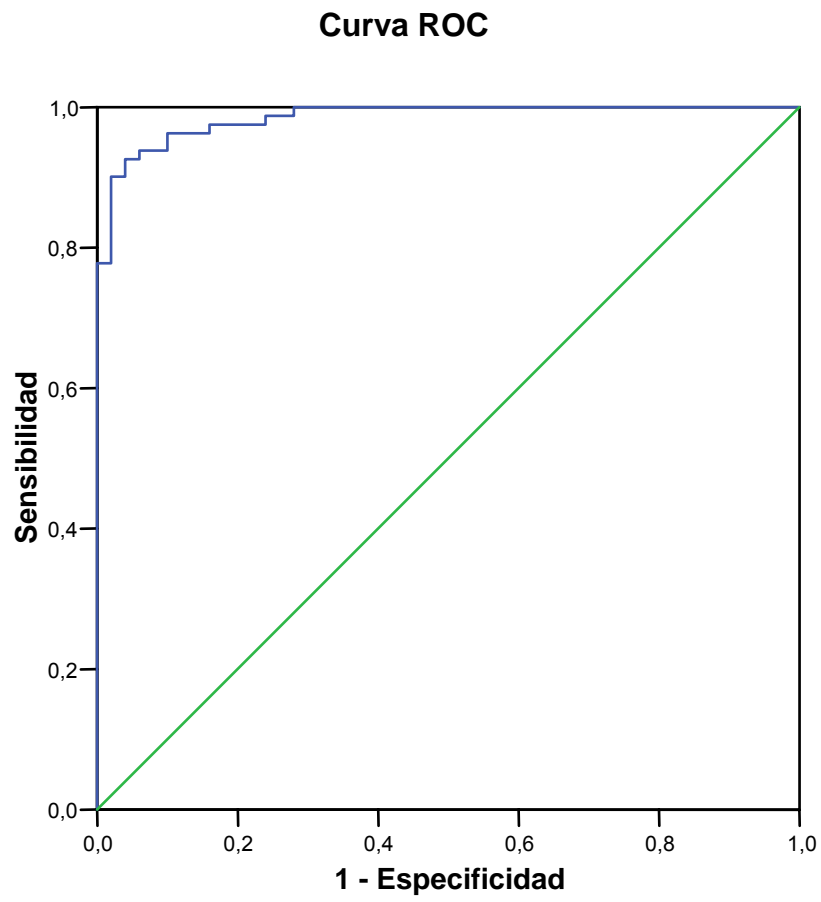


Figura 42.- Curva ROC del estudio de sensibilidad y especificidad.

DISCUSIÓN

En los últimos años se han abierto distintas líneas de investigación que guardan relación con la biología molecular del cáncer colorrectal, abarcando una amplísima variedad de aspectos que van desde la carcinogénesis del tumor hasta la aplicación de nuevas modalidades de tratamiento de esta neoplasia. Es de sobra conocida la teoría de las etapas múltiples del desarrollo del tumor desde el pólipo hasta el cáncer invasivo debido a la acumulación de alteraciones genéticas, metilaciones, mutaciones o deleciones, que se inician en la mutación del gen APC de la poliposis adenomatosa familiar, tanto en el cáncer hereditario ligado a la poliposis, como en el cáncer de colon y recto esporádico. En estos casos el responsable es un gen supresor, mientras que en el caso de los otros síndromes hereditarios como es el cáncer de colon hereditario no asociado a poliposis, están relacionados con genes reparadores (siendo los más frecuentes el MSH2, MSH6 y MLH1). Otro gen de gran interés es el oncogen K-ras, cuyas mutaciones son de relevante importancia en el desarrollo del CCR invasivo e imprimen además distintos grados de agresividad al tumor que tienen valor pronóstico. El estudio RASCA (1998)¹⁴⁴, resume que hay un mayor riesgo de recurrencia y muerte significativamente más elevado para los pacientes que presentan mutaciones de dicho gen.

Cuando revisamos los marcadores tumorales preoperatorios encontramos que en una gran cantidad de estudios la elevación del CEA aumentaba la probabilidad de recidiva^{145,146,147,148,149,150,151}. Si bien, algunos autores no confirman esta relación^{152,153,154}.

Por otra parte, se sabe también según diversas publicaciones, que la determinación de la proteína p53 ofrece información sobre el pronóstico en pacientes con cáncer colorrectal^{155,156,157,158}. Parece que la acumulación intracelular de dicha proteína (sobrexpresión) se asocia con una evolución postoperatoria desfavorable. Sin embargo, también se han publicado estudios con resultados contrapuestos^{159,160,161} por lo que, por desgracia, no hay acuerdo sobre la utilidad clínica de este marcador. Aunque en el estudio de Díez M et al¹⁶², concluyen que la proteína p53 no posee el mismo valor como factor pronóstico en todos los estadios tumorales. Esta proteína únicamente posee valor predictivo indicativo de riesgo elevado de recidiva en el grupo de pacientes con tumores con estadio III. Se ha estudiado también la proteína PCNA (proliferative cell nuclear antigen), se trata de una proteína accesoria de la ADN polimerasa, sintetizada por las células durante la fase de actividad de replicación del ADN. Su determinación puede cuantificar la proporción de células tumorales que se encuentran en fase de división y para cuantificar el grado de proliferación celular de un tumor^{163,164}. Aunque se ha publicado que los tumores con elevada reactividad PCNA muestran un comportamiento más agresivo, también hay observaciones que muestran lo contrario, presentando una mayor supervivencia libre de recidiva en pacientes con hiperreactividad PCNA.

En los últimos 15 años se ha producido un gran avance en el tratamiento del cáncer colorrectal, debido fundamentalmente a tres puntos clave en el desarrollo de la quimioterapia en este tumor: La inducción de la modulación bioquímica, la infusión continua de altas dosis de 5-FU y la demostración de su superioridad frente al bolo, y sobretodo, la introducción de nuevos agentes activos en este tumor (básicamente el oxaliplatino y el CPT-11), que han permitido la introducción de la poliquimioterapia y de la segunda línea de tratamiento¹⁶⁵. De forma paralela se han abierto distintas líneas de investigación con el objetivo de identificar los factores que pueden predecir la evolución de los pacientes con cáncer colorrectal y ayudar a seleccionar a los grupos con un alto riesgo de presentar recidiva tumoral. Numerosos estudios se han ocupado de determinar el valor pronóstico de factores clínicos e histológicos del tumor, pero los resultados obtenidos han sido a menudo contradictorios. El estadio tumoral es un sistema válido para predicciones globales, pero no para predecir individualmente la evolución postoperatoria^{166,167}.

1. – RELACIÓN DE LA ENZIMA TELOMERASA EN EL DESARROLLO DE CÁNCER:

Los avances en genética y biología molecular han permitido la comprensión de algunos mecanismos responsables de los procesos malignos, principalmente en lo que se refiere al papel del complejo funcional telómero/telomerasa. Esto ha permitido evaluar su utilidad como marcador de progresión tumoral en varios tipos de cánceres, lo cual puede ser útil como herramienta diagnóstica temprana ya que su presencia en lesiones precancerosas son la evidencia objetiva de clones celulares inmortales con mayor riesgo de progresión a cáncer, pues lesiones como metaplasia o displasia son consideradas desde el punto de vista histopatológico mecanismos de adaptación celular que no necesariamente progresan a neoplasia. Además, dado que la telomerasa no se expresa en tejidos normales adyacentes al tejido tumoral, su presencia puede permitir en algunos casos la detección de células tumorales en los márgenes de resección¹⁶⁸.

Aunque la telomerasa parece ser un marcador específico de cáncer, el establecimiento de la utilidad clínica de este enzima como marcador tumoral depende de otros criterios. En general, la histopatología es la mejor técnica para el diagnóstico de cáncer y proporciona en la mayoría de los casos unos resultados adecuados en la biopsia analizada. Por lo tanto, la mayor utilidad clínica de la telomerasa podría ser en el diagnóstico a través de fluidos biológicos de fácil obtención: Orina, sangre, esputos y lavados broncoalveolares.

Recientemente, Takagi et al¹⁶⁹, han identificado una relación entre la inestabilidad de los microsatélites y el acortamiento de los telómeros, a consecuencia, sugirieron que podría haber una asociación entre el sistema de reparación del DNA y el mecanismo de mantenimiento de los telómeros. Los diferentes estudios sugieren que un telómero corto y una telomerasa activa forman una poderosa fuerza directriz para que las células cancerosas continúen su evolución clonal, ya que un telómero reducido y una telomerasa activa, permiten generar cromosomas aberrantes y amplificar los efectos deletéreos de los mismos respectivamente. De esta forma, sólo aquellas lesiones precancerosas que exhiban telómeros cortos y actividad telomerasa son probablemente de mayor riesgo, pues son la evidencia objetiva de la presencia de clones celulares inmortales con gran potencial de malignidad.

La identificación de posibles marcadores moleculares que mejoren los rendimientos de los marcadores anatómicos y citológicos son líneas de investigación muy actuales. Los estudios sobre la posible utilización de la actividad telomerasa como prueba de cribaje ha sido un hecho^{170,171}. Sin embargo, la principal limitación de estos estudios, reside en el método para cuantificar la actividad telomerasa, ya que ésta ha venido determinándose en las células de los tejidos tumorales. Por ello, su utilidad como marcador tumoral^{172,173} puede estar limitada. Recientemente, MS Kopresky et al¹⁷⁵ demostraron que el mRNA humano se puede extraer y amplificar utilizando RT-PCR a partir de suero. Algunas RNAsas como la tirosinasa RNA, no se detectan en los sueros de sujetos normales y por el contrario se detectó en el suero de los pacientes con melanoma maligno. Basándose en estos hallazgos, Xu Gi Chen et al¹³¹, determinaron la expresión hTERT en el suero en 17 de 18 (94%) pacientes con cáncer de mama. La técnica de RT-PCR, se ha aplicado recientemente también para la detección del mRNA de Tg en sangre periférica en pacientes con cáncer de tiroides. Ditkoff y cols.¹⁷⁶ observaron ARNm de Tg en el epitelio tiroideo, esto indica la presencia de células cancerosas tiroideas circulantes. Más tarde, Tallini y cols¹⁷⁷, detectaron Tg, peroxidasa y ARNm de ret/PTC-1 en sangre periférica también en sujetos con cáncer de tiroides. Ringel y cols.¹⁷⁸, utilizaron también la técnica de RT-PCR y comprobaron que el 94% de los pacientes con enfermedad metastásica tenían elevación del ARNm de Tg. La técnica de RT-PCR cuantitativa de Tg tuvo una mayor sensibilidad y una especificidad similar que la Tg plasmática durante la supresión con hormona tiroidea. Además, la técnica puede detectar el aumento del ARNm de Tg después de la supresión con hormona tiroidea, sin verse afectado dicho aumento por la presencia de anticuerpos antitiroglobulina¹⁷⁸. Todo ello demuestra que el método de determinación del hTERT empleado en nuestro estudio, es una técnica ya ampliamente utilizada y contrastada en otras patologías con resultados fiables y prometedores y que pueden encontrar su uso más extendido en el futuro. El análisis del ADN genómico, puede realizarse a partir de una muestra de sangre con extracción de ADN de los linfocitos, lo que simplifica muchísimo la metodología de obtención de las muestras y se desprende de la necesidad de realizar biopsias. En la mayoría de los casos se correlaciona con la expresión del gen y sobretodo con la conservación de la función o no de la proteína.

En los procesos malignos la sobreexpresión genética de la telomerasa induce altos niveles de su actividad, lo que permite la reconstitución de las secuencias teloméricas haciendo a la célula maligna inmortal. Sin embargo, la actividad telomerasa aumentada de forma aislada no es por sí sola suficiente para generar cáncer, como se observa en células germinales que tienen actividad telomerasa elevada durante toda la vida sin generar procesos malignos, ya que para que se induzca una neoplasia es necesario sumar otras alteraciones del genoma que afecten por ejemplo al ciclo celular, apoptosis, adquirir capacidad de invasión sobre los tejidos adyacentes o pérdida de la capacidad de adhesión a su tejido de origen (metástasis)¹⁷⁹.

Como hemos mencionado, la actividad telomerasa se ha visto incrementada en multitud de tumores, así, el 88% de los cánceres cervicouterinos presentaron actividad elevada con falsos positivos en el 9% de muestras normales. En los cánceres de hígado, colon, próstata, mama, piel y pulmón (en este último se ha estudiado además su actividad en estados premalignos), en aproximadamente un 90% de los mismos se han encontrado altos niveles de actividad telomerasa, como así también en el 70-100% de pacientes portadores de leucemias y linfomas¹⁸⁰. El 90-95% de los casos iniciales de carcinoma de tiroides, páncreas, próstata y colon presentan actividad telomerasa. En el cáncer de vejiga incipiente se detecta en orina o lavado vesical actividad telomerasa en el 90% de los casos estudiados, si se compara con el 50% de cáncer incipiente vesical que en la actualidad no se detecta por falta de marcadores citológicos¹⁸¹. Se ha analizado también la telomerasa como potencial marcador en el cáncer de pulmón. Hiyama y cols.¹⁸² detectaron actividad telomerasa en un 78.4% de cánceres de pulmón de célula no pequeña y en un 100% de los cánceres de pulmón de célula pequeña examinados. Otros trabajos, han mostrado que el aumento del hTERT representa un acontecimiento temprano en el inicio de la hepatocarcinogénesis, habiendo correlación entre los niveles hTERT y el grado de malignidad de la lesión hepática¹⁹⁴.

En el caso de enfermedad maligna residual o recidiva, también se ha demostrado ser importante la determinación de la telomerasa como es en el caso de biopsias en las cuales se puede detectar áreas de tejido con cáncer residual. Se presupone que la activación o sobreexpresión de la telomerasa en células humanas viene dada por un mecanismo multifactorial complejo que regula sus componentes estructurales, y cuyas vías de regulación varían según el tipo de línea celular¹⁸³.

Una vía por la cual la telomerasa se activa, es la expresión eficiente de la oncoproteína E6 de algunos virus como el VPH (virus papiloma humano) de alto riesgo en los queratinocitos humanos durante los periodos previos de inmortalización. Este hecho sugiere una interacción molecular favorecedora en el desarrollo y mantenimiento de la malignidad celular^{184,185,186,187,188}. Es por ello, que se ha relacionado también la actividad telomerasa con el cáncer cervicouterino, ya que se ha observado que aunque los tipos oncogénicos de VPH pueden transformar e inmortalizar los queratinocitos cervicales humanos, la infección persistente por sí sola no constituye una causa suficiente para conferir tumorigenicidad, por lo que factores adicionales al huésped, son requeridos para que un porcentaje de estas infecciones logren, en algún momento, progresar y dar lugar al cáncer¹⁸⁹. De esta forma, Pinto-Tang J y cols.¹⁹⁰ determinaron la actividad telomerasa mediante el protocolo de amplificación de repeticiones teloméricas (TRAP), así como el DNA de los VPH tipo 16 y 18 en una muestra de 32 mujeres entre 25 y 60 años. De las 32 mujeres, 15 tenían citología normal, 9 presentaban lesión intraepitelial escamosa (LIE) y 8 cáncer cervical. Se detectó actividad telomerasa en 7/8 (88%) casos de cáncer cervical, y en 1/9 (11%) casos de LIE. En ninguna de las 15 muestras de exfoliado cervical normal se evidenció dicha actividad. El único caso de LIE con actividad telomerasa reveló una neoplasia intraepitelial cervical por estudio de biopsia cervicouterina. Con respecto a la presencia de ADN de VPH tipo 16, 18 o ambos, se detectó en 6/8 (75%) casos de cáncer cervical, en 2/9 (22%) casos de LIE y 2/15 (13%) de casos con citología cervical normal. Al comparar con los resultados de la actividad telomerasa, de los 8 pacientes con actividad, 6 (75%) presentaron amplificadores de ADN de uno o ambos tipos virales, de manera que 5 casos (63%) se trataba de cáncer cervical y uno (12%) de una LIE. En cambio se detectó ADN viral en el 31% sin actividad enzimática y citología normal. Este resultado coincide con reportes que señalan una estrecha relación entre los VPH oncogénicos 16 y 18 y la presencia de actividad telomerasa en los queratinocitos humanos^{191,192,129}. Este estudio corrobora el hecho de que la actividad telomerasa es detectada excepcionalmente en cérvix uterino normal, moderadamente o poco frecuente en lesiones del epitelio cervical y casi universalmente detectada en todos los carcinomas cervicales, quedando evidenciado el rol crucial que desempeña la enzima en los procesos tumorales tal y como lo señala Urquidi y cols¹⁹³.

En la actualidad, la mayoría de los trabajos publicados intentan sobretodo relacionar el incremento de la actividad de la telomerasa con el pronóstico del tumor. Se ha visto que niveles altos de telomerasa se asocian con pronóstico malo en los meningiomas, neuroblastomas, leucemia aguda, cáncer de mama y gastrointestinal¹⁹⁵.

Con respecto a los métodos de detección de la telomerasa, actualmente existen dos blancos conocidos para determinar su expresión; por un lado está la actividad bioquímica de la enzima y por otro lado el componente RNA de la misma. El primer método combina las propiedades bioquímicas con un método de amplificación del ácido nucleico como la PCR (método TRAP), siendo capaz de detectar la actividad de la telomerasa a partir de una sola célula. Aunque este método proporciona la información más valiosa, esto es, la actividad bioquímica, y es, teóricamente, el método más sensible en su detección, hay ocasiones en las que son preferibles otros métodos de evaluación de la expresión de la telomerasa. Esto se debe a que al detectar la actividad bioquímica enzimática, esta es sensible al calor, a la contaminación con RNAasas y proteasas, además de que los especímenes calentados o fijados no son óptimos para el análisis con el método TRAP. La clonación del componente RNA de la telomerasa proporciona otra forma de medir su expresión, junto con los métodos de transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa, detecta y cuantifica la expresión de los diferentes componentes de la telomerasa, con lo que se puede utilizar en muestras fijadas, congeladas, calentadas y procedentes de fluidos biológicos. Estos métodos pueden ser usados para mejorar la sensibilidad, especificidad, fiabilidad y la facilidad de uso en la detección y determinación de su expresión.

Se han planteado estudios para determinar la contribución relativa de las células neoplásicas, que coexisten en proporciones variables en los tumores, sobre la determinación de telomerasa¹³¹. En dicho estudio, se ha analizado la actividad telomerasa en 10 pacientes con sarcoma, 11 con cáncer colorrectal y 30 con cáncer de próstata. Se detectó actividad telomerasa en todos los tumores colorrectales y sarcomas. En los cánceres de próstata, en cambio, se detectó con menor frecuencia dicha actividad (47%). La intensidad de la actividad telomerasa, fue también menor en cáncer de próstata en comparación con los sarcomas y tumores colorrectales analizados. Se constató una correlación significativa entre infiltración por células neoplásicas y actividad telomerasa determinada por método TRAP.

2.- COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DEL hTERT EN PLASMA ENTRE EL GRUPO CON CCR Y EL GRUPO CONTROL:

Hemos presentado una técnica basada en la transcripción inversa y posterior reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), que ha permitido cuantificar transcritos del gen que sintetiza la telomerasa (hTERT_N) en plasma en un grupo de pacientes con cáncer colorrectal. En el estudio se ha encontrado una clara diferencia en la expresión del hTERT_N entre los pacientes con CCR y el grupo control (10.94 frente a 0.29) ($p < 0.001$). Por lo tanto, el método permite discriminar claramente entre sujetos sanos y pacientes con CCR, por lo que abre expectativas de futuro para utilizarse como marcador en el diagnóstico y seguimiento de estos pacientes.

De igual forma, otros grupos han detectado transcritos de telomerasa en el suero de pacientes con cáncer de mama¹⁷⁵, así como la actividad de la enzima en células obtenidas a partir de lavados de vejiga y orina en pacientes con cáncer de vejiga^{196,197,198,199}. Se han encontrado resultados similares en el esputo de pacientes con cáncer de pulmón, de cabeza y cuello²⁰⁰.

Como hemos mencionado, la mayoría de los estudios publicados hasta la fecha, determinan si hay o no incremento de la actividad telomerasa en el tumor. El principal problema de estos trabajos reside en la utilización del método para la determinación y cuantificación de dicha actividad, ya que ésta debe realizarse en células tumorales. Valoran si hay o no presencia de actividad enzimática en el tumor en relación con los tejidos adyacentes. Una de las ideas que nos ha impulsado a la elaboración del presente trabajo, es la posibilidad de analizar la expresión del mRNA de la telomerasa en plasma humano como potencial marcador tumoral. El método, constituye un test no invasivo permitiendo cuantificar y detectar mRNA de la subunidad hTERT del gen de la telomerasa en pacientes con CCR a partir de una muestra de sangre extraída del paciente minutos antes de la resección del tumor.

Como se ha comentado previamente, se ha detectado telomerasa en cánceres de cabeza y cuello en muestras obtenidas a partir de lavados bucales²⁰⁰ y de cánceres de vejiga y colon a partir de orina y lavados colorrectales respectivamente^{201,118,196}. En el cáncer de próstata, donde los marcadores actuales no distinguen entre hiperplasia benigna y cáncer de próstata, la telomerasa es capaz de hacerlo^{201,202,203,204}. En un

reciente estudio realizado por P. Dasí y cols.²⁰⁶ en el que se determina el mRNA del hTERT en plasma de pacientes con cáncer de próstata, utilizando el mismo procedimiento que en el presente trabajo, obtuvo valores superiores de forma significativa a los del grupo control, concluyendo que en combinación con la determinación del PSA es un buen marcador para diferenciar el cáncer de próstata de la patología benigna con una sensibilidad del 84% y una especificidad del 60%.

Boldrini y cols.²⁰⁷ determinaron la expresión hTERT mRNA mediante el mismo procedimiento utilizado en nuestro trabajo en pacientes con cáncer colorrectal, pero con la diferencia de que se realizó en los propios tejidos, analizando los niveles de hTERT en pólipos adenomatosos, pólipos displásicos, cánceres y mucosa sana de colon. Los valores de hTERT se incrementaron de forma progresiva, de manera que en el epitelio normal adyacente al tumor son prácticamente indetectables, en los pólipos adenomatosos se detectó en el 45% de las muestras, el 62.5% de los pólipos displásicos y en el 100% de las células cancerosas con niveles mucho más elevados y de manera significativa.

Asimismo, las células obtenidas de la punción con aguja fina pueden ser utilizadas para detectar la actividad telomerasa^{208,209,210}. En tumores como los meningiomas en los que actualmente no se dispone de ningún marcador, la telomerasa podría proporcionar a los clínicos una herramienta para el seguimiento de la progresión de la enfermedad²¹¹.

En algunos cánceres, donde la tradicional histopatología o citología (especialmente en los casos de PAAF) muestra un alto porcentaje de resultados indeterminados, marcadores más sensibles y específicos, como la telomerasa, pueden ser muy útiles en la identificación de las células malignas. También al ser un método de detección simple, reproducible y fácil de usar, es otra característica de todo marcador diagnóstico útil. Un ejemplo de lo anterior, es el cáncer de próstata. En un estudio realizado por Engelhardt y cols.¹³¹ en el que se analizan los niveles de telomerasa en las secreciones de próstata en 20 sujetos con cáncer de próstata, en cerca del 90% de ellos tenían actividad enzimática, tras comparar los resultados con los de las biopsias prostáticas, se vió que en 18 de los 20 casos había correlación de los resultados. Este hecho es interesante si tenemos en cuenta de que sólo el 30% de los pacientes sometidos a biopsia prostática por presentar niveles elevados de antígeno prostático específico son

positivos para cáncer de próstata. Actualmente se está realizando un estudio con un número más elevado de pacientes. También se ha demostrado expresión de RNAm de hTERT en el 97% de células de cáncer renal²⁰⁵.

Igualmente se ha visto que una pequeña proporción de tumores humanos no presentan actividad detectable de telomerasa^{130,212}. Albanell J y cols.²¹³ han estudiado un total de 105 pacientes con cáncer de pulmón, se detectó en 89 casos (84.8%) actividad telomerasa en niveles variables, en cambio, en 16 pacientes (15.2%) no se detectó actividad alguna. En un estudio con retinoblastoma, un tumor pediátrico que precisa sólo un número de mutaciones asociadas, la actividad telomerasa estuvo ausente en un 50% de tumores²¹⁴. Por ello, es razonable pensar que el requerimiento de la activación de la telomerasa en la tumorigénesis dependa de la longitud de los telómeros de la célula precursora y del número de expansiones clonales necesarios para la formación de un tumor avanzado macroscópico²¹⁵. Otras explicaciones sobre la existencia de tumores con ausencia de actividad telomerasa incluyen la activación de este enzima seguido de represión tras alcanzar la elongación telomérica, inhibición de telomerasa asociada a quiescencia celular, actividad por debajo del límite de detección con los ensayos utilizados, o la presencia de mecanismos alternativos de elongación de los telómeros. La existencia de una vía alternativa se ha descrito en líneas celulares inmortalizadas y en algunos tumores humanos, y se caracterizan por la asociación de ausencia de telomerasa con telómeros muy largos^{216,217,218}. Sin embargo, en la serie descrita por Albanell y cols.²¹³, en los 16 cánceres de pulmón con ausencia de telomerasa, no se detectaron telómeros largos en ninguno de ellos.

En otro estudio realizado por Dikmen G y cols.²¹⁹ se ha determinado la presencia de telomerasa en derrames pleurales con la finalidad de diferenciar los derrames malignos de los benignos, en el estudio se analizan 109 pacientes con derrame pleural. De ellos, 63 eran malignos (mesoteliomas malignos, cáncer de pulmón, cáncer de mama metastásico, cáncer de ovario metastásico, cáncer de páncreas y linfoma maligno), en este grupo el diagnóstico se confirmó por biopsia pleural. 46 pacientes presentaban derrame pleural benigno, cuyo diagnóstico se realiza basándose en las manifestaciones clínicas y radiológicas, la respuesta terapéutica y el examen citológico del derrame pleural, de ellos en 24 pacientes el diagnóstico se confirmó con biopsia pleural. En los pacientes con derrame pleural benigno el examen citológico lo confirmó en el 100% de

los casos (46), en cambio en los derrames de naturaleza maligna, solamente en el 53.9% (34/63). Sin embargo, al analizar la actividad telomerasa, ésta fue positiva en el 82.5% (52/63) de los derrames malignos, mientras que en los benignos fue del 19.6% (9/46), siendo la diferencia significativa ($p < 0.0001$). De los 29 derrames pleurales sin diagnóstico citológico definitivo en el grupo maligno, el 82.8% (24) mostraron actividad telomerasa positiva. El estudio concluye que la presencia de actividad telomerasa en los derrames pleurales es un marcador diagnóstico considerablemente sensible de malignidad. De los nueve casos de derrame pleural benigno que mostraron actividad telomerasa positiva se atribuyó al intenso infiltrado inflamatorio de linfocitos y leucocitos de las muestras, pues todos ellos pertenecían a derrames tuberculosos y empiemas, lo cual explicaría la actividad falsamente positiva en las muestras²²⁰. La sensibilidad de la actividad telomerasa fue del 80.4% en el estudio, con lo que se concluye que el determinar la actividad telomerasa en los derrames pleurales aumentará significativamente la posibilidad de diferenciar derrames pleurales malignos de los benignos, aunque deben realizarse más estudios que precisen a partir de que niveles de telomerasa y que valores de referencia permitan determinar dicha diferencia. Otros estudios han demostrado que la determinación de telomerasa en los derrames pleurales incrementa la rentabilidad de la citología en un 31% pasando del 54% al 92% combinando ambas pruebas²²¹.

Todos estos trabajos, corroboran nuestros resultados, abriendo nuevas expectativas sobre la utilización de la telomerasa como marcador diagnóstico. Cabe destacar también en el estudio presentado en esta tesis doctoral, además de la significativa diferencia de la expresión hTERT entre los dos grupos, llama poderosamente la atención tres circunstancias:

- En 13 sujetos del grupo control no se han detectado transcritos de hTERT en plasma, ello supone poco más de la cuarta parte de la población control de estudio. En cambio, todos los pacientes del grupo con CCR han presentado en mayor o menor medida transcritos hTERT. Por otro lado, el 97.5% de pacientes con CCR han presentado un valor hTERT superior a 1, en comparación con el 32% del grupo control.

- Otro dato de interés, es que los 81 pacientes han obtenido un valor hTERT superior a la mediana del grupo control (es decir, de forma individual el valor hTERT de cada paciente ha sido superior a 0.29).
- Una gran proporción de pacientes (82.72%), han mostrado valores hTERT superiores al valor máximo obtenido en el grupo control (es decir, superior a 4.63).

3.- ANÁLISIS DE LOS VALORES DEL hTERT EN FUNCIÓN DE VARIABLES DEMOGRÁFICAS: SEXO Y EDAD.

3.1. Sexo:

Con respecto al sexo, el estudio refleja una diferencia de expresión hTERT ligeramente más alta en el sexo femenino en ambos grupos, sin ser esta significativa. En el grupo con CCR los niveles hTERT en el sexo femenino fueron de 14.70 frente a 10.53 en varones ($p=0.214$). Un dato que llama la atención es que aunque es conocido que el CCR se distribuye de forma más o menos equitativa en ambos sexos, en nuestro estudio la proporción entre varones y mujeres es de 1.7/1. En el grupo control, la expresión hTERT en mujeres fue de 0.38 frente a 0.27 en hombres ($p=0.688$). Estos datos, son equiparables con otros trabajos, así, en el estudio de Albanell y cols.²¹³ sobre la actividad telomerasa en la serie de tumores de pulmón, tampoco encontró asociación entre la actividad telomerasa y el sexo. De la misma forma, Maestro et al, en un estudio en el que determinan la actividad telomerasa en 103 pacientes con cáncer colorrectal, no hay relación de la misma con el sexo de los pacientes²²².

3.2. Edad:

Al comparar la expresión hTERT con respecto a la edad, vemos que el estudio no presenta grupos homogéneos, ya que en el grupo con cáncer la mayoría de pacientes sobrepasan los 60-65 años, invirtiéndose esta proporción en el grupo control, es por ello que hemos considerado, a fin de evitar posibles sesgos, comparar subgrupos de edades similares por debajo y por encima de 50 años, aunque el número de sujetos en cada subgrupo no era homogéneo. No hemos encontrado correlación de los niveles hTERT en el grupo con CCR entre los pacientes de menos de 50 años y los de más de 50 años, 8.56 frente a 11.52 respectivamente ($p=0.473$). Lo mismo ha sucedido en el grupo control, 0.28 frente a 0.35 ($p=0.225$). En cambio, las diferencias de expresión hTERT siguen siendo significativas al comparar los dos grupos de menos de 50 años; 8.56 en CCR, frente a 0.28 en el grupo control ($p<0.001$); y los dos grupos de más de 50 años, 11.52 en CCR, frente a 0.35 en el grupo control ($p<0.001$). Podemos observar que los niveles hTERT tienen cierta tenencia a ser más bajos en los grupos de menos de 50 años, aunque la gráfica de dispersión, tanto en el grupo con CCR como en el grupo

control (test de Spearman) no muestra evidencia de correlación significativa ($p=0.577$ y 0.248 respectivamente). El grupo de Maestro et al²²², tampoco encontraron correlación entre la actividad telomerasa y la edad de los pacientes, en cambio, el trabajo de Albanell²¹³ si observa una correlación inversa significativa entre la edad y la actividad telomerasa en pacientes con cáncer de pulmón, aunque el estudio no entra en más detalles sobre este aspecto. Del mismo modo, en estudios realizados en cáncer de mama en los que se determina la expresión hTERT en el tumor^{112,223}, observan relación estadística entre pacientes de más de 40 años y las de menos de 40 años, detectando expresión hTERT en el 60% y 100% de pacientes respectivamente¹¹².

Nosotros pensamos, que pese al reducido número de pacientes con CCR y edad inferior a 50 años, y que hay que analizar con cierta cautela la comparación de estos resultados, creemos que con un número más amplio de pacientes, los niveles hTERT en este grupo tendrían tendencia a ser más altos llegando a igualarse con los del grupo de edad superior a 50 años.

4.- CORRELACIÓN ENTRE LAS CIFRAS ELEVADAS DE CEA PREOPERATORIO Y VALORES AUMENTADOS DEL hTERT DE LOS PACIENTES:

El 24.69% de los pacientes objeto del estudio, ha obtenido un valor de CEA preoperatorio elevado (n=20). Estas cifras coinciden con los estudios publicados en la literatura en los que el 20-30% de los pacientes con CCR presentan elevación de los niveles de CEA antes de la intervención. Otros estudios demuestran que en tumores colorrectales inferiores a 4cm, el CEA tan sólo se encuentra elevado en el 10-15%. En el estudio de Garcia-Anguiano et al²²⁴, relacionan esta elevación con la recidiva tumoral. Algunas series, han encontrado un índice de recidivas del 64.5% en los pacientes con CEA preoperatorio elevado que no se normaliza tras la cirugía, siendo del 25.9% entre aquellos en los que sí se constata una normalización de dichos valores. Por tanto, las cifras preoperatorias de CEA pueden identificar pacientes con mayor riesgo de recidiva⁷⁹. De la misma forma, dicha elevación parece guardar relación con un estadio más avanzado de la enfermedad.

En el estudio, al igual que ha ocurrido con los valores del hTERT, las cifras de CEA preoperatorio han sido en las mujeres superiores que en los hombres, aunque en este caso, la diferencia presenta, un tanto en el límite, significación estadística (p=0.047). Este hecho, pensamos que no debe llevarnos a ninguna conclusión que se pueda extrapolar a nivel clínico y representa un dato puntual irrelevante.

Con respecto al estadio tumoral, el nivel de CEA, ha sido más alto en los pacientes con metástasis hepáticas de forma significativa (p=0.001), aunque este resultado debe interpretarse con precaución ya que el grupo con metástasis consiste en 10 pacientes y el rango de resultados era muy amplio. Como se resume en la tabla-21, el 40% de los pacientes con CEA elevado presentaban un estadio IV, en cambio, sólo el 3.28% de pacientes con CEA normal tenían un estadio IV.

En la tabla-21, se refleja la proporción de pacientes con CEA elevado y normal en función del estadio tumoral.

Tabla 21.- Estadío tumoral y CEA.

	CEA ↑	CEA N
E-I	3 (15%)	15 (24.59%)
E-II	4 (20%)	29 (47.54%)
E-III	5 (25%)	15 (24.59%)
E-IV	8 (40%)	2 (3.28%)
TOTAL	20 (100%)	61 (100%)

La expresión hTERT ha sido mucho más elevada en el grupo de pacientes con CEA aumentado, en comparación con el grupo de pacientes con CEA normal; 16.48 frente a 8.91. Sin embargo, la diferencia no ha sido significativa ($p=0.191$). De todas formas, interpretamos, que si se hubiesen comparado grupos más homogéneos con un número similar de pacientes, quizá las diferencias habrían obtenido significación estadística. Al comparar los sexos por separado, vemos que tanto varones como mujeres que tenían un CEA elevado, presentaban también una expresión hTERT más elevada en comparación con el grupo de varones y mujeres con CEA normal. La correlación tampoco ha sido significativa, ($p=0.481$ y 0.451 para hombres y mujeres respectivamente) teniendo también en cuenta que el número de varones con CEA elevado era tan solo de 9, por 11 el de mujeres, cabe suponer que ello se debe a un tamaño muestral pequeño.

Al realizar la correlación entre los valores de CEA y hTERT mediante el test de Spearman, hemos obtenido una correlación no significativa ($p=0.218$). Hay un pequeño grupo de pacientes que presentan un CEA elevado que corresponde a un hTERT también elevado, pero en la gráfica de correlación la mayoría de pacientes se agrupan con un valor de CEA más bajo, por lo tanto podemos concluir que una mayor expresión hTERT no se corresponde a unos valores de CEA más altos, aunque nos queda la duda de que si el tamaño muestral hubiese sido mayor, podría haber significación estadística. Tampoco hemos encontrado trabajos que determinen esta correlación que puedan corroborar nuestros resultados.

5.- ANÁLISIS Y CORRELACIÓN DEL hTERT EN FUNCIÓN DE VARIABLES ANATOMOPATOLÓGICAS: ESTADIO Y DIFERENCIACIÓN TUMORAL:

5.1. Estadio tumoral:

Una de las variables que más interés puede suscitar en el estudio, es ver si los niveles plasmáticos del hTERT, se relacionan con el estadio del tumor, y con ello tener la posibilidad de predecir de alguna forma el pronóstico de los pacientes en virtud de las cifras del hTERT. Evidentemente, los subgrupos de pacientes no son homogéneos, puesto que más del 40% de ellos, presentaban un estadio II de la enfermedad en el momento de la resección quirúrgica. Uno de los puntos que llama la atención, es que sólo hay un paciente con estadio-0 (TisN0M0), y que dicho paciente presentaba un valor muy aumentado del hTERT, por lo que al realizar el estudio estadístico hemos considerado omitir este paciente al presentar un valor tan disperso e inusualmente elevado, con la finalidad de no sesgar los resultados, y poder comparar los estadios I, II, III y IV que presentan un tamaño muestral más homogéneo. Vemos que los valores hTERT aumentan en estadios más avanzados de la enfermedad, de manera que para los estadios I, II, III y IV, los valores hTERT han sido de 5.36, 8.91, 10.24 y 20.18 respectivamente, siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p=0.032$). Podemos observar que los valores hTERT son mucho más altos de forma global en pacientes con metástasis hepáticas en relación a los que no las presentan; 20.18 frente a 8.64 ($p=0.005$). Queda el interrogante si ante un mayor número de pacientes con estadio-0, que nos hubiera permitido comparar con el resto de estadios, estas diferencias seguirían siendo significativas, aunque mantenemos que los valores hTERT seguirían con la tendencia creciente demostrada en el estudio.

Al comparar las cifras de hTERT en función de la afectación ganglionar del estudio anatomopatológico, vemos que estas han sido discretamente superiores en los pacientes con infiltración linfática con respecto al grupo de pacientes sin dicha afectación; 14.59 frente a 8.77, aunque la diferencia no ha llegado a ser significativa ($p=0.304$).

Estudios realizados en cáncer de colon¹¹⁷, vejiga¹¹⁸ y tiroides²²⁵, sugieren que la telomerasa puede ser útil para diferenciar los diferentes estadios de la enfermedad. La asociación entre actividad telomerasa y el estadio tumoral se ha detectado también en

neuroblastoma²²⁶, cáncer de mama²¹⁹, cáncer gástrico²²⁷ y leucemia²²⁸. Hiyama y cols.¹⁸² detectaron una mayor actividad telomerasa en lesiones metastásicas de pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña. Esta observación sugirió que la expresión de telomerasa podría contribuir al desarrollo de metástasis. Sin embargo, en otros estudios en cáncer de células renales²²⁹, cáncer de mama^{230,231,112,223}, tumores ginecológicos²³² o carcinoma hepatocelular²³³, no se observó esta relación. En la serie analizada de cáncer de pulmón de célula no pequeña de Albanell y cols.²¹³ se detectó actividad telomerasa en un 95% de los tumores T1, un 80.3% de los T2 y en un 92.3% de los tumores T3. El nivel de actividad telomerasa promedio fue significativamente superior en los tumores T3 comparado con los tumores T1/T2. En este estudio en cambio, se observó también una asociación significativa entre actividad telomerasa y metástasis ganglionares, detectándose actividad en un 79.3% de los N0, en un 95% de los N1 y en un 93.7% de los N2. La actividad telomerasa promedio fue superior en los casos con afectación ganglionar más avanzada (N2). En los tumores con ausencia de actividad telomerasa (15.2% del total), fue infrecuente la presencia de metástasis ganglionares en el momento del diagnóstico. La actividad telomerasa se asoció en este estudio significativamente al estadio tumoral, que combina la clasificación del tumor primario y de las metástasis ganglionares. Los niveles de actividad aumentaron progresivamente en tumores estadio I<II<III A. Otros estudios en cáncer de pulmón obtienen resultados parecidos^{236,237,238}. Es por ello, que la alta expresión de telomerasa en el cáncer de pulmón ha motivado también su estudio en lavados bronquiales y como método diagnóstico auxiliar en este tipo de cáncer^{234,235}.

Maestro y cols.²²², aunque no encontraron diferencias significativas en la actividad telomerasa en función del estadio tumoral de los pacientes con CCR, ésta, si fue mayor en los estadios C y D con respecto a los estadios A y B. En cambio, al comparar los pacientes que presentaban metástasis hepáticas con los que no las presentaban, si había una actividad más elevada de forma significativa ($p=0.0002$). En el estudio de Boldrini y cols.²⁰⁷ en la determinación de RNA del hTERT en células de cáncer colorrectal, observó también una mayor expresión hTERT en los estadios 3-4 con respecto a los estadios 1-2, siendo la diferencia significativa. En este trabajo, se obtienen mayores niveles de expresión en aquellos tumores con afectación linfática con respecto a aquellos que no la tenían ($p=0.02$).

5.2. Diferenciación tumoral:

Con respecto a la diferenciación tumoral, se observa que las cifras de hTERT aumentan de forma progresiva a medida que los tumores son peor diferenciados, de manera que para el grupo de pacientes con tumores bien, moderadamente y pobremente diferenciados, se ha obtenido una expresión hTERT de 5.65, 11.52 y 15.15 respectivamente, sin presentar significación estadística ($p=0.104$). Ahora bien, hay que tener en cuenta que prácticamente el 73% de los pacientes han presentado tumores moderadamente diferenciados y los grupos que se comparan no son homogéneos. Sin embargo, al comparar los grupos de tumores bien y pobremente diferenciados (que representan el 15% y 12.5% de la muestra) la diferencia si ha sido en este caso significativa ($p=0.048$).

En cambio, el grupo de Albanell y cols.²¹³, no ha encontrado significación estadística entre la actividad telomerasa y el grado de diferenciación de los tumores en los pacientes con cáncer de pulmón. De igual forma el grupo de Maestro et al²²², también en pacientes con CCR, tampoco obtuvieron diferencias significativas con respecto a la diferenciación tumoral. Harían falta nuevos estudios con series mayores de casos para poder corroborar estos resultados.

Todo ello, nos lleva a reflexionar sobre las implicaciones clínicas que puede tener la telomerasa en el pronóstico del cáncer. Hay varios estudios que han demostrado la correlación entre la expresión de la telomerasa y el resultado clínico en ciertos tumores²³⁹. La presencia de telomerasa se ha correlacionado con un mal pronóstico en cáncer gástrico. Así mismo, Hiyama E y cols.²²⁶ determinaron que los pacientes con neuroblastoma metastásico que presentan niveles elevados de telomerasa tienen un peor pronóstico que aquellos cuyos tumores que carecen de su expresión, los cuales llegan incluso a experimentar regresiones espontáneas del tumor, en este estudio, un nivel alto de RNA de telomerasa humana (hTR) presentó una correlación estadísticamente significativa con un resultado desfavorable en 159 pacientes con este tipo de tumor. Hawkins y cols.²⁴⁰ concluyen que la expresión hTERT predice la progresión y supervivencia en pacientes pediátricos con ependimomas intracraneales, de manera que la supervivencia a los 5 años de los pacientes con expresión tumoral de hTERT fue en la serie del 21%, en relación al 57% de los tumores que no la expresaron. Estos datos demuestran que la telomerasa puede ser un marcador pronóstico muy útil y puede

proporcionar información complementaria para ofrecer a un determinado paciente un tratamiento más adecuado. Así, varios indicadores pronósticos del cáncer de mama muestran una correlación estadísticamente significativa con el nivel de actividad telomerasa, de hecho, la medición de los niveles de telomerasa en pacientes con cáncer de mama sin afectación ganglionar, de acuerdo a la histología, podría identificar un subgrupo de pacientes que tuvieran un mayor riesgo de experimentar recaídas y que se beneficiaría de un tratamiento más agresivo¹⁷⁵.

Estos datos demuestran que la telomerasa puede ser un marcador útil para predecir el pronóstico de la enfermedad. Este se puede determinar con la medición del nivel de expresión de la misma y puede proporcionar información para un tratamiento más adecuado en todos estos cánceres. Estudios definitivos que aporten más información sobre la utilidad pronóstica de la telomerasa serán el próximo paso importante en este campo. Estudios recientes indican que el nivel de actividad de la telomerasa en muestras de biopsia es directamente proporcional al porcentaje de células cancerosas que hay en el tumor. Así, la cantidad de telomerasa en un tumor puede ser determinada mediante la cuantificación del porcentaje de células cancerosas de la muestra determinada por el estudio histológico o bien mediante marcadores celulares como el contenido de RNA. En relación a ello, se ha estudiado la asociación entre la actividad telomerasa y la proliferación celular, de hecho, en el estudio de Albanell en cáncer de pulmón, ha mostrado una asociación significativa entre mayor actividad telomerasa y mayor índice proliferativo tumoral²¹³. Esta asociación ha sido confirmada por otros autores²⁴¹. Otros estudios^{242,243}, pero no todos²³⁰, muestran una asociación in vivo entre actividad telomerasa y proliferación en otros tumores humanos, como células germinales, teratomas y cáncer de mama.

Además de las aplicaciones clínicas en el diagnóstico de cáncer, la telomerasa se podría utilizar como marcador de respuesta a la terapia antineoplásica. Al ser un marcador específico de cáncer, sus niveles se podrían utilizar para determinar la presencia de células tumorales en pacientes que están siendo sometidos a un determinado tratamiento, con lo que puede ser útil para monitorizar el estado de diferenciación celular durante la terapia tradicional antineoplásica.

6.- ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD TELOMERASA EN TEJIDOS: TUMOR Y MUCOSA DE COLON.

Como ensayo preliminar al trabajo presentado, hemos analizado muestras de tejido tumoral y de mucosa sana de colon en 10 pacientes, determinando la actividad telomerasa en todos ellos. El 100% de las muestras presentaron actividad telomerasa. El nivel de actividad fue mucho mayor de forma significativa ($p=0.005$) en las muestras de tejido tumoral con respecto a las de mucosa sana (17.46 frente a 3.88).

Un estudio de similares características con el que se pueden comparar estos resultados es el de Maestro et al²²², corroborando los obtenidos en nuestro trabajo. En dicho estudio, se analizan 103 muestras de tumores colorrectales, determinando la actividad telomerasa. Esta se detectó en el 90% de las muestras, de ellas, en un 31% se detectaron niveles bajos de actividad, en el 30% niveles intermedios y en el 29% niveles elevados. El estudio realiza el seguimiento de los pacientes una mediana de 12 meses, concluyendo que el riesgo relativo de fallecer de los pacientes con actividad telomerasa positiva es 25.2 veces mayor, y que el nivel de actividad no influye con el riesgo de fallecimiento. Pensamos por un lado que comparar el 10% de los pacientes telomerasa negativos con el 90%, que son los que presentaron actividad, no son grupos homogéneos, y por tanto, los resultados pueden verse de algún modo sesgados. Por otro lado, llama la atención que el mismo estudio concluye que los pacientes con metástasis hepáticas presentan de forma significativa actividad telomerasa más elevada, en cambio paradójicamente en el mismo trabajo se afirma que el nivel de actividad no influye en el riesgo de fallecer.

Para finalizar, hay que tener presente que todos estos resultados confirman el hecho de que la telomerasa se encuentra activada en el 90-100% de los tumores colorrectales.

7.- SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL hTERT EN EL ESTUDIO. IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LA INHIBICIÓN DE LA TELOMERASA:

Toda investigación sobre pruebas diagnósticas parte del conocimiento de que una enfermedad existe o no en un grupo de individuos de una muestra, precisándose de una prueba suficientemente acreditada en ese momento que puntualice la existencia real de enfermedad. Para definir el resultado de un test es preciso aplicar un criterio diagnóstico, cuya menor o mayor claridad y facilidad de interpretación sean también cruciales para el resultado de la evaluación.

La precisión es la principal característica de un proceder diagnóstico como recurso de clasificación, esta mide la habilidad de la prueba para distinguir entre estados alternativos de salud, lo cual incluye la distinción entre enfermedad y salud, entre enfermedad benigna y maligna, entre sujetos que responden o no a una determinada terapia y predecir quién enfermará o no. Esta habilidad de discriminar es el punto de comienzo cuando estimamos que contribución puede tener una prueba diagnóstica en el proceso de atención del paciente. Otro aspecto que debemos considerar al evaluar una prueba diagnóstica es su utilidad, el valor práctico de la información que obtendremos. Una prueba puede tener una habilidad considerable para discriminar y, sin embargo, poco valor práctico para la atención a los pacientes, por su elevado coste y carácter invasivo, entre otros aspectos^{244,245}.

En el estudio presentado hemos confeccionado la curva ROC con la sensibilidad y especificidad (la cual será complementaria en este caso), que se obtienen sucesivamente moviendo la línea de corte de las determinaciones de un parámetro. Esta curva ROC, en concreto la proporción de la superficie total o área que determina por debajo (area under-curve) define la eficacia discriminatoria del test, igual que la exactitud o la seguridad en el caso de un test de resultado dicotómico¹⁴⁰.

Solo observamos en el estudio un 12.7% de falsos negativos, y un 2.6% de falsos positivos. El procedimiento parece ser un test adecuado para el diagnóstico del cáncer colorrectal cuando se compara con otros marcadores tumorales obteniendo una mayor sensibilidad (91.4%) y especificidad (96%). Otros autores²⁴⁶, citan una sensibilidad y especificidad para el CEA preoperatorio en el diagnóstico de CCR de 43% y 90% respectivamente.

Por todo ello, creemos que el método de detección del mRNA basado en qRT-PCR del gen de la telomerasa es capaz de diferenciar sujetos sanos de los pacientes con CCR. Este estudio confirma los resultados preliminares¹⁰⁰, y demuestra que el mRNA del gen hTERT de la telomerasa es posible determinarlo en sangre de pacientes con este tipo de cáncer, pudiendo ser utilizado como test analítico para el diagnóstico de esta enfermedad.

Por otra parte, el hTERT en suero podría ser un marcador excelente para el diagnóstico precoz y screenig de enfermedad residual mínima, con utilidad para el seguimiento de los pacientes tras la cirugía. Estos estudios ya están en curso en nuestro grupo.

Finalmente, habría que reflexionar sobre la implicación que podría tener en un futuro la telomerasa a nivel terapéutico. Como hemos comentado, existe una estrecha relación entre la dinámica del telómero y la expresión de la telomerasa, es por ello, que el desarrollo de inhibidores de la telomerasa puede llegar a convertirse en una nueva alternativa terapéutica contra los tumores, sin embargo, todavía ninguno de los ensayos que se están llevando a cabo con dichos inhibidores se encuentran en fase clínica. La inhibición de la telomerasa en una célula tumoral en la que se encuentra activada haría que los telómeros se acortaran y, por ello, se produciría la muerte celular, frenando de esta forma el crecimiento de las células tumorales. En cultivos celulares se ha comprobado que se inhibe la telomerasa, y ello puede inducir la muerte programada de las células en unos pocos días, evitando de esta forma el crecimiento tumoral²⁴⁷, aunque, como hemos mencionado todavía no se ha llevado a cabo ningún tipo de estudio clínico.

Se han desarrollado trabajos con modelos de ratones con la telomerasa inactivada, lo que se conoce como ratones Knock-out. Así, Zanetti y cols.²⁴⁸ han desarrollado una vacuna en colaboración con el instituto Pasteur de París dirigida contra la telomerasa que puede activar eficazmente el sistema inmunológico del organismo para luchar contra las células cancerosas. Esta vacuna se ha probado en células tumorales in vitro con la finalidad de dirigir a los linfocitos T citotóxicos, o células Killer, contra las células cancerosas a través de la telomerasa, tratando de comprobar si el sistema inmunológico de los individuos con cáncer podría retener la capacidad de reconocer la telomerasa e impulsar la respuesta de los linfocitos T citotóxicos ante el tumor. El prototipo de inmunoterapia se probó, inicialmente, en células tumorales de

próstata, aunque también se ha ensayado con cáncer de mama, colon, pulmón y con melanomas. Estos experimentos también se han realizado con ratones transgénicos en el Instituto Pasteur y los resultados han revelado que la vacuna inducía respuesta inmunológica en los animales, sin efectos secundarios aparentes²⁴⁸.

En la actualidad, se están realizando estudios preclínicos de inhibidores de la telomerasa²⁴⁹. Estos ensayos, se basan en el hecho de que las células tratadas, entrarían en crisis sólo después de un número de divisiones celulares relacionado directamente con la longitud de los telómeros en el momento de iniciar el tratamiento¹¹⁹, es decir, la predicción es que las células con telómeros cortos entrarían en crisis después de pocas divisiones, mientras que las que tienen telómeros largos precisarían mayor número de divisiones en presencia de un inhibidor de telomerasa para que la erosión gradual de los telómeros llegara a la longitud crítica. Es por ello, que una de las líneas de investigación que está llevando a cabo nuestro grupo, es el desarrollo de técnicas antisentido para terapia génica, consistente en el bloqueo de la expresión de un gen utilizando un oligonucleótido complementario de la secuencia del gen que se desea bloquear. En concreto, en el ensayo preliminar llevado a cabo por Lledó y cols.²⁵⁰ se ha estudiado el efecto de la terapia con oligonucleótidos antisentido contra el oncogen K-ras y el gen de la telomerasa, sobre la viabilidad de una línea celular humana derivada de un adenocarcinoma de colon. Los resultados ponen de manifiesto que el tratamiento independiente de cada uno de los ODNs-AS es capaz de ejercer efectos inhibidores parciales (50% aproximadamente) sobre la proliferación celular. Sin embargo, el tratamiento conjunto con ODNs-AS contra K-ras y telomerasa ejercen una importante sinergia que conduce a la pérdida completa de la viabilidad (> 99.5%) de las células tumorales. Queda por determinar la capacidad, uso y efectos secundarios in vivo. Serán necesarios estudios futuros para evaluar la eficacia terapéutica de estos ODNs-AS y/o su combinación utilizando vectores de transferencia, así como esclarecer su potencial utilidad clínica. Hay estudios en marcha en los que se analiza la respuesta de inhibición del hTERT en células de cáncer de vejiga²⁵¹. Por lo tanto, la telomerasa debe ser considerada una diana terapéutica a tener en cuenta. Así mismo, se piensa que estas terapias, no deben tener efectos negativos importantes al tener efecto selectivo sobre las células tumorales que es donde mayormente expresa la enzima, en cambio, la presencia de actividad telomerasa en otros tipos celulares como son las células de la línea

germinal, algunas poblaciones de linfocitos T y B, de células madre y regiones proliferativas de los folículos pilosos, indica la posibilidad de tener algún tipo de efecto secundario, aunque parece ser que la actividad es reducida en estos tipos celulares.

Por otra parte, los inhibidores de la transcriptasa inversa como la ácido timidina (AZT) y la didesoxiguanosina (ddG) se han estudiado también con gran detalle en cultivos celulares de linfocitos T y B. La ddG produjo un acortamiento de los telómeros en ambas líneas celulares, hasta llegar a un punto en el que se estabilizaron. La AZT provocó una disminución progresiva de los telómeros, y ambos compuestos inhibieron la telomerasa²⁵².

Para concluir, cabría insistir en que la telomerasa continúa siendo un objetivo altamente selectivo y con una potencial efectividad universal en la terapia anticancerosa, proporcionando un mayor nivel de especificidad frente a las células cancerosas, ya que se ha visto asociada principalmente con la inmortalidad celular y el estado de diferenciación. Lo que parece claro, sin embargo, es que la expresión de la telomerasa no es exclusiva de las células cancerosas y de las líneas germinales, como hemos comentado, ello sugiere que los posibles efectos tóxicos de la terapia de inhibición de la telomerasa deberían ser previamente estudiados en animales de experimentación. Los datos actuales sugieren que la telomerasa puede ser el marcador tumoral más específico y universal conocido hasta la fecha. Además, diversos estudios han demostrado que la expresión de la telomerasa se correlaciona con el pronóstico de ciertos cánceres. Este prometedor potencial diagnóstico y pronóstico de la telomerasa deberá ser completamente estudiado en ensayos bien diseñados para determinar definitivamente la verdadera utilidad clínica del test diagnóstico de cáncer basado en la telomerasa.

Por todo ello, pensamos que el cirujano deberá involucrarse en estos ensayos, hasta ahora del dominio de los investigadores, si queremos comprender los progresos en el manejo del cáncer colorrectal, y sobretodo, mejorar los resultados del tratamiento quirúrgico de nuestros pacientes²⁵³. Finalmente, concluimos que la técnica empleada abre nuevas vías para su utilización como un test analítico no invasivo para el diagnóstico de esta enfermedad, de la misma manera que puede tener un potencial uso en un futuro como método de detección de enfermedad residual, progresión o recidiva en enfermos oncológicos, así como en el diagnóstico de grupos de riesgo utilizando fluidos biológicos.

CONCLUSIONES

Según el análisis de los resultados obtenidos en este estudio, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. El estudio demuestra que el mRNA de la subunidad hTERT del gen de la telomerasa puede ser detectado y cuantificado en plasma de pacientes con CCR.
2. Con respecto al método utilizado, la medida cuantitativa del gen hTERT de la telomerasa mediante transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), permite utilizar cantidades muy pequeñas de RNA fragmentado en plasma circulante, sin necesidad de extraerlo directamente de células tumorales, presentando además una correlación con otras técnicas que miden la actividad enzimática a nivel tisular, sin los inconvenientes que pueden presentar las mismas.
3. La cuantificación en el RNA plasmático de la subunidad hTERT del gen de la telomerasa, ha sido mucho mayor en los pacientes con cáncer colorrectal, en comparación con el grupo control. Por lo tanto, discrimina claramente entre sujetos sanos y pacientes con CCR.
4. No se ha encontrado relación entre los valores del hTERT con respecto a la edad y el sexo en ambos grupos, si bien, en mujeres se han obtenido valores discretamente superiores.
5. Hemos observado que los pacientes con niveles de CEA preoperatorio elevados presentan también cifras más elevadas de hTERT, sin embargo, estos resultados no son significativos.
6. Con respecto al estadio tumoral, cuanto más avanzado es el estadio de la enfermedad, mayor es la expresión del hTERT. Esto se manifiesta de una manera mucho más clara al comparar los pacientes con y sin metástasis hepáticas (estadio-IV). En cambio, en el estudio no encontramos relación de las cifras del hTERT con la afectación ganglionar ni con el grado de diferenciación tumoral, aunque hay cierta tendencia a que los tumores peor diferenciados, presenten valores superiores de hTERT.

7. La actividad telomerasa es significativamente mayor en tejidos tumorales de CCR con respecto a tejidos de mucosa sana de colon.
8. La sensibilidad de la prueba obtenida en el estudio es del 91.4%, la especificidad del 96% y la exactitud como prueba de cribaje del 93.1%.

BIBLIOGRAFÍA

¹ Plan integral de lucha contra el cáncer de la Comunidad Valenciana. Anuario 1989-90. Ed. Consellería de Sanitat y Consumo. Valencia, 1990.

² Lledó Matoses S. (1994). Estado actual del cáncer colorrectal. En: S. Tamames Escobar y C. Martínez Ramos. Avances, controversias y actualizaciones en Cirugía General y del Aparato Digestivo. 1ª Ed, Madrid, vol.IV, p.74-94.

³ Helad RJ, Moran BJ, Ryall RDH, Sexton R, McFarlane JK. Rectal cancer. The Basinstoke experience of Total Mesorectal Escision, 1978-1997. Arch Surg 1998; 133: 894-899.

⁴ Quirke P, Durdey P, Dixon MF, Williams NS. Local recurrence of rectal adenocarcinoma due to inadequate surgical resection. Lancet 1986; 1: 996-999.

⁵ García Armengol J, Martínez Soriano F, García-Granero E, Lledó S. Anatomía quirúrgica de la pelvis aplicada a la escisión mesorrectal en la cirugía del cáncer de recto. Cir Andal 2001; 12: 277-281.

⁶ Wexner SD, Rotholtz NA. Surgeon influenced variables in resectional rectal cancer surgery. Dis Colon Rectum 2000; 43: 1606-1627.

⁷ García-Granero E, Martí-Obiol R, Gómez-Barbadillo J, García-Armengol J, Esclapez P, Espí A, Jiménez E, Millán M, Lledó S. Impact of surgeon organization and specialization in rectal cancer outcome. Colorectal Dis 2000; 3: 179-184.

⁸ Lledó Matoses S, Roig Vila JV, García García A, Villanueva García P, Álvarez Pernia I, Ferri Romero J y Castells Ferrer P. Detección de las neoplasias colorrectales mediante encuesta clínica y test Hemocult^R. Cir Española 1998; 43: 710-714.

⁹ Umpleby HC, Fermar B, Symes MO, Williamson RC. Viability of exfoliated colorectal carcinoma cells. Br J Surg 1984; 71(9): 659-663.

¹⁰ Salomon MJ, Egan M, Roberts RA, Philip J, Rusell P. Incidence of free colorectal cancer cells on the peritoneal surface. Dis Colon Rectum 1997; 40(11): 1294-1298.

¹¹ Hermanek P, Wiebelt H, Staimmer D, Riedl S. Prognostic factors of rectum carcinoma. Experience of the German Multicentre Study Group for colorectal cancer. *Tumori* 1995; 8(3 suppl): 60-64.

¹² Hermanek P. Impact of surgeon`s technnique on outcome after treatment of rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 559-562.

¹³ Lledó Matoses S. “ Estado actual del cáncer colorrectal” . En: S. Tamames y C. Martínez, editores. *Cirugía: Aparato Digestivo, Aparato Circulatorio y Aparato Respiratorio*. Editorial médica Panamericana. Madrid. Capítulo 26. pp. 222-229. 2000.

¹⁴ Lledó S. Genética y cáncer colorrectal. En S. Lledó editor. *Guía quirúrgica en Cirugía Colorrectal*. AEC. Arán editores. ISBN: 84-86725-77-1. Capítulo 18, pp. 249-254. Madrid 2000.

¹⁵ Cervantes A y Lledó S. Cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis (CCHNAP). En: S. Lledó editor. *Guía quirúrgica en Cirugía colorrectal*. AEC. Arán editores. ISBN: 84-86725-77-1. Capítulo 21; pp. 279-283. Madrid 2000.

¹⁶ James R (1997). Genética del cáncer colorrectal. En: Theodore J, Saclarides MD. *Aspectos nuevos y controvertidos en el tratamiento de las enfermedades colorrectales*. Clínicas quirúrgicas de Norteamérica. Ed. Interamericana, Chicago, vol 1, p.183-205.

¹⁷ Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Preisinger AC, Willard HF, Michelson AM, Riggs AD, Orkin SH. Clonal analysis using recombinant DNA probes from the X-chromosome. *Cancer Res* 1987; 47: 4806.

¹⁸ Fearon ER, Hamilton SR, Vogelstein B. Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science* 1987; 238: 193.

¹⁹ Peto R. Epidemiology, multistage models, and short term mutagenesis test. In: *Origins of human cancer*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory 1977; p. 1403 .

²⁰ Shibata D, Peinado MA, Mecklin JP, et al. Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persist after transformation. *Nat Genet* 1994; 6: 273-281.

²¹ Muta H, Noguchi M, Perucho M, et al. Clinical implication of microsatellite instability in colorectal cancers. *Cancer* 1996; 15, 77, 2: 265-270.

²² Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759.

²³ Nishiho I, Nakamura Y, Miyosi Y, Miki Y, Anso H, et al. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 1991; 253: 665.

²⁴ Groden J, Thiveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991; 66: 601.

²⁵ Cottrell S, Bicknell D, Kaklamanis L, Bodmer WF. Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas. *Lancet* 1992; 340: 626.

²⁶ Holstein M, Sidranski D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancer. *Science* 1991; 253: 49.

²⁷ Fearon ER, Jones PA. Progressing to wards a molecular description of colorrectal cancer development. *FASEB J*; 6: 2783 (1992).

²⁸ Khine K, Smith DR, Goh H. High frequency of allelic deletion on chromosome 17p in advanced colorectal cancer. *Cancer* 1994; 73: 28.

²⁹ Cchang F, Syrjanen K. The p53 tumor suppressor gene as a common cellular target in human carcinogenesis. *Am J Gastroenterology* 1993; 88: 174 .

³⁰ Remvicos Y, Tominaga O, Hammel P, et al. Increased p53 protein content of colorectal tumors correlates with poor survival. *Br J Cancer* 1992; 66: 758.

- ³¹ Dix B, Robbins P, Carrello S, House A, Lacopeta B. Comparison of p53 gene mutation and protein overexpression in colorectal carcinomas. *Br J Cancer* 1994; 70: 585.
- ³² Caldés T, Iniesta P, Vega FJ, López JA, Díaz-Rubio E, Fernandez C, Cerdán J, Balibrea JL, Benito M. Comparative survival analysis of p53 mutations and protein accumulation in colorectal cancer. *Oncology* 1998; 55: 249.
- ³³ Iniesta P, Vega FJ, Caldés T, et al. p53 exon 7 mutations as a predictor of poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Cancer Letters* 1998; 130: 153.
- ³⁴ Loda M, Cukor B, Tain SW, et al. Increased proteasome dependent degradation of the cyclin-dependent Kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nature Medicine* 1997; 3: 231.
- ³⁵ Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AMM, Boss JL. Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl Med* 1988; 319: 525.
- ³⁶ Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, et al. Identification of a chromosome 18q gene which is altered in colorectal cancers. *Science* 1990; 247: 49.
- ³⁷ Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Brian TM, et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 1991; 253: 593.
- ³⁸ Guillem JG, Smith AJ, Puig-La Calle J Jr, Ruo L. Gastrointestinal polyposis syndromes. *Curr Probl Surg* 1999; 36: 217-323.
- ³⁹ Giardiello FM, Welsh SB, Hamilton SR, Offerhaus GJ, Gittelsohn AM, Booker SV, Krush AJ, Yardley JH, Luk GD. Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome. *New Eng J Med* 1987; 316: 1511-1514.
- ⁴⁰ Desai DC, Neale KF, Talbot IC, Hodgson SV, Phillips RK. Juvenile polyposis. *Br J Surg* 1989; 82: 14-17.

- ⁴¹ Lin K, Shashidharan M, Thorson A, et al. Cumulative incidence of colorectal and extra colonic cancers in MLH1 and MSH2 mutation carriers of hereditary nonpoliposis colorectal cancer. *J Gastrointes Surg* 1998; 2: 67-71.
- ⁴² Menko FH. Genetics of colorectal cancer for clinical practice. Ed. Kluwer Academic Publisher 1993. Dodrech. The Netherlands.
- ⁴³ Wijnen J, Vasen H, Khan PM, et al. Seven new mutations in hMSH2, an HNPCC gene, identified by denaturing gradient-gel electrophoresis. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 1060.
- ⁴⁴ Andreyev HJN, Ross PJ, Cunningham D, Clarke PA. Antisense treatment directed against mutated Ki-ras in human colorectal carcinoma. *Gut* 2001; 48: 230-237.
- ⁴⁵ Barbacid M: Ras genes. *Ann Rev Biochem* 1987; 56: 779.
- ⁴⁶ Fearon ER: K-ras gene mutation as a pathogenetic and diagnostic marker in human cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1978.
- ⁴⁷ Boss JL, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancer. *Nature* 1987; 327: 293.
- ⁴⁸ Forrester K, Almoquera C, Hank L, et al. Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature* 1987; 327: 298-303.
- ⁴⁹ Capella G, Cronaver-Mitra S, Peinado MA, et al. Frequency and spectrum of mutations at codons 12 and 13 of the K-ras gene in human tumors. *Environ Health Perspect* 1991; 93: 125.
- ⁵⁰ Kenr SE, Fearon ER, Tersmette KWF, et al. Allelic loss in colorectal carcinomas. *JAMA* 1989; 261: 3099.
- ⁵¹ Laurent-Puig P, Olschwang S, Delatre O, et al. Survival and acquired genetic alterations in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1992; 102: 1136.
- ⁵² Ben hatter J, Losi L, Chaubert P, et al. Prognostic significance of K-ras mutations in colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 1993; 104: 1044.

⁵³ Finklestein SD, Sayegh R, Bakker A, et al. Determination of tumor aggressiveness in colorectal cancer by K-ras-2 analysis. *Arch Surg* 1993; 128: 526.

⁵⁴ Finklestein SD, Sayegh R, Christensen S, et al. Genotypic classification of colorectal adenocarcinoma. *Cancer* 1993; 71: 3827.

⁵⁵ Okada F, Rak JW, Croix BS, Lieubeau B, Kaya M, Roncoril L, Shirasawa S, Sasazuki T, Kerbel RS. Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Pres Natl Acad Sci USA* 1998 Mar 31; 95(7): 3609-14.

⁵⁶ Sakakura C, Hogiwarra A, Tsujimoto H, Ozaki K, Sakakibora T, Oyama T, Ogaki M, Imanishi T, Yamazaki J, Takahashi T. Inhibition of colon cancer cell proliferation by antisense oligonucleotides targeting the messenger RNA of the Ki-ras gene. *Anticancer Drugs* 1995 Aug; 6(4): 553-61.

⁵⁷ Ward RL, Todd AV, Santiago F, O'Connor T, Hawkins NK. Activation of the K-ras oncogene in colorectal neoplasm is associated with decreased apoptosis. *Cancer* 1997 Mar 15; 79(6): 1106-13.

⁵⁸ Moore M, Jones DJ, Schalfield PF, Harnden DG. Current status of tumor markers in large bowel cancer. *World J Surg* 1989; 13: 52-59.

⁵⁹ Abeler GI, Perova SD, Khramkova NI, et al. Production of embryonal alpha-globulin by transplantable mouse hepatomas. *Transplantation* 1963; 1: 174-180.

⁶⁰ Gold P, Freedman SO. Demonstration of tumor specific antigens in human colonic carcinoma by immunologic tolerance and absorption techniques. *J Exp Med* 1965; 121: 439-462.

⁶¹ Zimmemann W, Weber B, Ortlieb B, et al. Chromosomal localization of the carcinoembryonic antigen gene family and differential expression in various tumors. *Cancer Res* 1988; 48: 2550-54.

⁶² Zamcheck N, Martin EW. Factors controlling the circulating CEA levels in pancreatic cancer and some clinical correlations. *Cancer* 1981; 47: 1620-1627.

⁶³ Peters KM, Grundman R. The value of tumor markers in colorectal cancer. *Leber Magen Darm* 1989; 19: 18-25.

⁶⁴ Moertel CG, O'Fallon JR, Go VL, O'Connell MJ, Thynne GS. The preoperative carcinoembryonic antigen test in the diagnosis, staging and prognosis of colorectal cancer. *Cancer* 1986; 58: 603-610.

⁶⁵ Bates SE, Longo DL. Use of serum tumor markers in cancer diagnosis and manegement. *Sem Oncol* 1987; 14: 102-138.

⁶⁶ Loewenstein MS, Zamcheck N. Carcinoembryonic antigen (CEA) levels in benign gastrointestinal disease states. *Cancer* 1978; 42: 1412-1418.

⁶⁷ Bates S, Longo D. Tumor markers: values and limitations in the manegement of cancer patients. *Cancer Treat Rev* 1985; 12: 163-207.

⁶⁸ Roulston JE. Limitations of the tumour markers in screening. *Br J Surg* 1990; 77: 961-962.

⁶⁹ Go VL, Zamcheck N. The role of tumor markers in the manegement of colorectal cancer. *Cancer* 1982; 50: 2619-2623.

⁷⁰ Toitou Y, Bogdan A. Etude critique des marqueurs tumoraux recents. *Bull Cancer* 1988; 75: 247-262.

⁷¹ Wanebo HJ, Rao B, Pinsky C, et al. Preoperative carcinoembryonic antigen level as a prognostic indicador in colorectal cancer. *New Engl J Med* 1978; 299: 448-451.

⁷² Secco GB, Fardelli R, Campora E, et al. CEA as a prognostic factor and early indicator of recurrence in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 1989; 8: 173-177.

⁷³ Minton JP, Hoehn JL, Gerber DM, et al. Results of a 400 patients carcinoembryonic antigen second-look colorectal cancer study. *Cancer* 1985; 55: 1284-1290.

⁷⁴ Barillani P, Bolognese A, Chirletti P, et al. Role of CEA, TPA, and Ca 19-9 in the early detection of localized and diffuse recurrent rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1992; 35: 471-476.

⁷⁵ Quentmeier A, Schlag P, Smok M, Herfarth. Re-operation for recurrent colorectal cancer: the importance of early diagnosis for respectability and survival. *Eur J Surg Oncol* 1990; 16: 319-325.

⁷⁶ Schneebaum S, Arnold MW, Young D, et al. Role of carcinoembryonic antigen in predicting respectability of recurrent colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1993; 36: 810-815.

⁷⁷ Wolmark N, Fisher B, Wieand HS, et al. The pronostic significance of preoperative carcinoembryonic antigen levels in colorectal cancer. Results from NJABP Clinical Trials. *Ann Surg* 1984: 375-381.

⁷⁸ Steele G, Ellenberg S, Ramming K, et al. CEA monitoring among patients in multiinstitutional adjuvant GI therapy protocols. *Ann Surg* 1982; 196: 162-169.

⁷⁹ Secco GB, Fardelli R, Campara E, et al. CEA as a prognostic factor and early indicator of recurrence in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 1989; 8: 173-177.

⁸⁰ Zotter S, Lossnitzer A, Hageman P, et al. Immunohistochemical localization of the epithelial marker MAM-6 in invasive malignancies and highly dysplastic adenomas of the large intestine. *Lab Invest* 1987; 57: 193-199.

⁸¹ Cox DR, Epstein CJ. Gene structure and function in eukaryotic organism. In principles and practice of medical genetics. Emery AEG and Riman eds. Churchill Livigstones, Edinburgh 1983. pp. 4-15.

⁸² Thompson J, Thompson M. Genetics in medicine. Saunders, Philadelphia. 1986. pp. 27-43.

⁸³ Ahlquist DA, Thiboideau SN. Will molecular genetic markers help predict the clinical behavior of colorectal neoplasia? *Gastroenterology* 1992; 102: 1419-21.

⁸⁴ Rustgi AK. Molecular genetics and colorectal cancer. *Gastroenterology* 1993; 104: 122.

⁸⁵ Tobi M, Luo F, Ronai Z. Detection of K-ras mutation in colonic effluent samples from patients without evidence of colorectal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 1007-1010.

⁸⁶ McClintock B. The fusion of broken ends of chromosomes following nuclear fusion. *Prac Natl Acad Sci USA* 1942; 28: 458-63.

⁸⁷ Greider CW. Telomerase, eds. Blackburn, EH & Greider, CW. 1995; pp. 25-68.

⁸⁸ West MD. The cellular and molecular biology of skin aging. *Arch Dermatol* 1994; 130: 87-95.

⁸⁹ Harley CB, Vaziri H, Counter CM, Allsopp RC. The telomere hypothesis of cellular aging. *Exper Gerontol* 1992; 27: 375-82.

⁹⁰ Hayfflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965; 37: 614-36.

⁹¹ Steven E, Artandi MD, et al. Telomeres, telomerase and human disease. *N Engl J Med* 2006; 355(12): 1195-1197.

⁹² Counter CM, Leber B, Harley CB, Bacchetti S. Telomere length and telomerase activity in haematological malignancies. *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* 1995; 36: A3308.

⁹³ Ohyashiki JH, Ohyashiki K, Fujimura T, et al. Telomere short-ening associated with disease evolution patterns in myelodysplastic syndromes. *Cancer Res* 1994; 54: 3557-60.

⁹⁴ Shay JW, Van Der Haegen BA, Ying Y, Wright WE. The frequency of immortalization of human fibroblasts and mammary epithelial cells transfected with SV40 T-antigen. *Exp Cell Res* 1993; 209: 45-52.

⁹⁵ Shay JW. Meeting report: the role of telomeres and telomerase in cancer. *Cancer Res* 2005; 65(9): 3513-7.

⁹⁶ Chen JL, Greider CW. Functional analysis of the pseudoknot structure human telomerase RNA. *Proc Natl Acad USA* 2005; 102(23): 8080-5.

⁹⁷ Watson JD. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol* 1972; 239: 197-201.

⁹⁸ Olkonikov AM. A theory of marginotomy. *J Theor Biol* 1971; 41: 181-190.

⁹⁹ Beattie TL, Zhov W, Robinson MO, Harrington L. Reconstitution of human telomerase activity in vitro. *Curr Biol* 1998; 8: 177-180.

¹⁰⁰ Weinrich SL, Pruzan R, Ma L, Ovellette M, Tesmer VM, Holt SE, Bodnar AG, Lichsteiner S, Kim N, Treager JB, et al. Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nat Genet* 1997; 17: 498-502.

¹⁰¹ Counter CM, Meyerson M, Eaton EN, Ellisen LW, Caddle SD, Haber DA, Weinberg RA. Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of hTERT (hEST2), the catalytic subunit of telomerase. *Oncogene* 1998; 16: 1217-1222.

¹⁰² Dasí F, Lledó S, García-Granero E, Ripoll R, Marugan M, Tormo M, García-Conde J, Aliño SF. Real-time quantification in plasma of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA: a simple blood test to monitor disease in cancer patients. *Lab Invest* 2001; 81: 767-769.

¹⁰³ Arvelo F, Morales A. Telómero, telomerasa y cáncer. *Acta Científica Venezolana* 2004; 55: 288-303.

¹⁰⁴ Wick M, Zubov D, Hagen G. Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Gene* 1999; 232: 97-106.

¹⁰⁵ Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J, et al. The RNA component of human telomerase. *Science* 1995; 269: 1236-1242.

¹⁰⁶ Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andres WH, Lingner J, Harley CB. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 1997; 277: 955-959.

¹⁰⁷ Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellissent LW, Steiner P, Caddle SD, Ziaugra L, Beiersbergen RL, Davidoff J, Liu Q, et al. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 1997; 90: 785-795.

¹⁰⁸ Blasco MA, Rizen M, Greider CW, Hanaban D. Differential regulation of telomerase activity and telomerase RNA during multi-stage tumorigenesis. *Nat Genet* 1996; 12: 200-204.

¹⁰⁹ Broccoli AI, Young JW, De Lange T. Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92: 9082-9086.

¹¹⁰ Soder AI, Hoare SF, Muir S, Going JJ, Parkinson EK, Keith WN. Amplification, increased dosage and in situ expression of the telomerase RNA gene in human cancer. *Oncogene* 1997; 14: 1013-1021.

¹¹¹ Prieto J, Hernández-Alcoceba R. Los oligonucleótidos antisentido y el diseño racional de nuevos fármacos antitumorales. *Rev Esp Enferm Dig* 2005; 97(7): 98-102.

¹¹² Hosseini-Asl S, Atri M, Modaressi MH, Salhab M, Mokbel K, Mehdipour P. The expression of hTR and hTERT in human breast cancer: correlation with clinico-pathological parameters. *International Seminars in Surgical Oncology* 2006; 3: 20: 1477-78.

¹¹³ Cong YS, Wen J, Bachetti S. The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 137-142.

¹¹⁴ Kilian A, Bowtell DD, Abud HE, Hime GR, Venter DJ, Keese PK, Duncan EL, Reddel RR, Jefferson RA. Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 2011-9.

¹¹⁵ Aisner DL, Wright WE, Shay JW. Telomerase regulation: not just flipping the switch. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12: 80-5.

¹¹⁶ Sikand K, Kaul D, Varma N. Receptor C_K-dependent signalling regulates hTERT gene transcription. *BMC Cell Biology* 2006; 7: 2121-2127.

¹¹⁷ Yoshida K, Sugino T, Goodison S, Warren BF, Nolan D, Wadsworth S, Mortensen NJ, Tage T, Tahara E, Tarin D. Detection of telomerase activity in exfoliated cancer cells in colonic luminal washings and its related clinical implications. *Br J Cancer* 1997; 75: 548-553.

¹¹⁸ Yoshida K, Sugino T, Tahara H, Woodman A, Bolodeaku J, Nargund V, Fellows G, Goodison S, Tahara E, Tarin D. Telomerase activity in renal cell carcinoma. *Cancer* 1997; 79: 362-369.

¹¹⁹ Harley CB, Kim NW, Prowse KR, et al. Telomerase, cell immortality and cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1994; 59: 307-15.

¹²⁰ Counter CM, Hahn WC, Wei W, Caddle SD, Beijersbergen RL, Lansdorp PM, Sedivy JM, Weinberg RA. Dissociation among in vitro telomerase activity, telomere maintenance and cellular immortalization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 14723-14728.

¹²¹ Zhu J, Wang H, Bishop JM, Blackburn EH. Telomerase extends the lifespan of virus-transformed human cells without net telomere lengthening. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 3723-3728.

- ¹²² Yamaguchi H, Calado RT, Ly H, et al. Mutations in hTERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. *N Engl J Med* 2005; 352(14): 1413-24.
- ¹²³ Hayfflick L, Moorhead PS. Human tumor cell line with a quasi-diploid karyotype (RPMI 2650). *Exp Cell Res* 1965; 37: 614-636.
- ¹²⁴ Weikert S, Christoph F, Schulze W, et al. Testicular expression of surviving and human telomerase reserve transcriptase (hTERT) associated with spermatogenic function in infertile patients. *Asian J Andrology* 2006; 8: 95-99.
- ¹²⁵ Counter CM, Botelho FM, Wang P, Harley CB, Bacchetti S. Stabilization of short telomeres and telomerase activity accompany immortalization of Epstein-Barr virus transformed human B lymphocytes. *J Virol* 1994; 68: 3410-1414.
- ¹²⁶ Counter CM, Hirte HW, Bacchetti S, Harley CB. Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 2900-2904.
- ¹²⁷ Harley CB, Villeponteau B. Telomeres and telomerase in aging and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5: 249-255.
- ¹²⁸ Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266: 2011-2015.
- ¹²⁹ Leng B, Bian M, Sun A, Fan M, Chen Q. Telomerase activity in cervical carcinoma and cervical intraepithelial neoplastic and its correlation to classification of koilocytosis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2002; 82: 262-266.
- ¹³⁰ Shay JW, Wright WE. Telomerase activity in human cancer. *Curr Opin Oncol* 1996; 8: 66-71.
- ¹³¹ Engelhardt M, Albanell J, Drullinsky P, Han W, Gillem J, Scher HI, Reuter V, Moore MA. Relative contribution of normal and neoplastic cells determines telomerase activity and telomere length in primary cancers of the prostate, colon and sarcoma. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 1849-1857.

¹³² Sarin KY, Cheung P, Gilson D, et al. Conditional telomerase induction causes proliferation of hair follicle stem cells. *Nature* 2005; 436(7053): 1048-52.

¹³³ Flores I, Cayuela ML, Blasco MA. Effects of telomerase and telomere length on epidermal stem cell behavior. *Science* 2005; 309(5738): 1253-6.

¹³⁴ Toribara NW, Sleisenger MH. Screening for colorectal cancer. *N England J Med* 1995 Mar 30; 332(13): 861-7.

¹³⁵ Brown T, Aldous W, Lance R, Blaser J, Baker T, Williard W. The association between telomerase, p53, and clinical staging in colorectal cancer. *Am J Surg* 1998 May; 175(5): 364-6.

¹³⁶ Carrasco JL. Estadística analítica. Asociación de caracteres cualitativos. In Editorial Ciencia 3. El método estadístico en la investigación médica, sexta edición. Madrid 1995: 182-189.

¹³⁷ Carrasco JL. Estadística multivariante. Descripción conceptual de las técnicas multivariantes. In Editorial Ciencia 3. El método estadístico en la investigación médica, sexta edición. Madrid 1995: 351-375.

¹³⁸ Carrasco JL, Hernán MA. Análisis de regresión logística. In Editorial Ciencia 3. Estadística multivariante en las ciencias de la vida. Madrid 1993: 197-246.

¹³⁹ Molinero LM. Regresión logística I. Enero 2001. *As Esp Hipert*: 294-299.

¹⁴⁰ Escrich-Sos J, Martínez-Ramos D, Miralles-Tena JM. Pruebas diagnósticas: nociones básicas para su correcta interpretación y uso. *Cir Esp* 2006; 79(5): 267-73.

¹⁴¹ Hanley JA, McNeil BJ (1982). The meaning and use of the area under receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology*. 143: 29-36.

¹⁴² Metz CE (1978). Basic principles of ROC analysis. *Semin Nucl Med*. 8: 283-298.

¹⁴³ Lopez de Ullibarri T, Fernández S. Curvas ROC, evaluación de pruebas diagnósticas. *Cad Aten Primaria* 1998; 5(4): 229-235.

¹⁴⁴ Andreyer HI, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter RASCAL study. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 675-84.

¹⁴⁵ Jass JR. Subsite distribution and incidence of colorectal cancer in New Zealand, 1974-1983. *Dis Colon Rectum* 1991; 34: 56-59.

¹⁴⁶ Band PR, Beck IT, Dinner PJ, Lentle BC, Amy R. Two years followup study of patients with known serum concentrations of carcinoembryonic antigen. *Can Med Assoc J* 1997; 117: 657-659.

¹⁴⁷ Chang WY, Burnett WE. Complete colonic obstruction due to adenocarcinoma. *Surg Gynecol Obstet* 1962; 114: 353-356.

¹⁴⁸ Evans JT, Mittelman A, Chu M, Holyoke ED. Pre and postoperative uses of CEA. *Cancer* 1978; 42: 1419-1421.

¹⁴⁹ Staab HJ, Anderer FA, Stump E, Hornung A, Fisher R, Keininger G. Eighty-four potential second-look operations based on sequential CEA determinations and clinical investigations in patients with recurrent gastrointestinal cancer. *Am J Surg* 1985; 149: 198-204.

¹⁵⁰ Onetto M, Paganuzzi M, Secco GB, Momparler RL, Momparler LF, Riverd GE. Preoperative carcinoembryonic antigen and prognosis in patients with colorectal cancer. *Biomed Pharmacother* 1985; 39: 392-395.

¹⁵¹ Szymendera JJ, Nowacki MP, Szalowski AW, Kaminska JA. Predictive value of plasma CEA levels: preoperative prognosis and postoperative monitoring of patients with colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1982; 25: 46-52.

¹⁵² Blake KE, Dalbow MH, Concannon JP, Hodgson SE, Brodmarkel GJ Jr, Panahadeh AH, et al. Clinical significance of the preoperative plasma carcinoembryonic antigen (CEA) level in patients with carcinoma of the large bowel. *Dis Colon Rectum* 1982; 25: 24-32.

¹⁵³ Lewi H, Blumgart LH, Carter DC, Gillis CR, Hole D, Ractliffe JG, et al. Pre-operative carcinoembryonic antigen and survival in patients with colorectal cancer. *Br J Surg* 1984; 71: 206-208.

¹⁵⁴ Albe X, Vassilakos P, Helfer-Guamori K, Givel JC, De Quay N, Suardet H, et al. Independent prognostic value of ploidy in colorectal cancer. *Cancer* 1990; 66: 1168-1175.

¹⁵⁵ Ahnen DJ, Feigl P, Quan G, Fenoglio-Preiser C, Lovato LC, Bunn PA, et al. Ki-ras mutation and p53 overexpression predict the clinical behaviour of colorectal cancer: a Southwest Oncology Group Study. *Cancer Res* 1998; 58: 1149-58.

¹⁵⁶ Allegra CJ, Paik S, Colangelo LH, Parr AL, Kirsch I, Kim G, et al. Prognostic value of thymidylate synthase, Ki-67, and p53 in patients with Duke's B and C colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Collaboration study. *J Clin Oncol* 2003; 21: 241-50.

¹⁵⁷ Gallego MG, Acenero MJ, Ortega JS, Delgado AA, Cantero JL. Prognostic influence of p53 nuclear overexpression in colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 2000; 43: 971-5.

¹⁵⁸ Soong R, Powell B, Elsaleh H, Gnanasampanthan G, Smith DR, Joseph D, et al. Prognostic significance of TP53 gene mutation in 995 cases of colorectal carcinoma. Influence of tumour site, stage, adjuvant chemotherapy and type of mutation. *Eur J Cancer* 2000; 36: 2053-60.

¹⁵⁹ Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, Ukei T, Satriano R, Haller D, et al. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2001; 344: 1196-206.

¹⁶⁰ Elsaleh H, Powell B, Soontrapornchai P, Joseph D, Gorla F, Spry N, et al. p53 gene mutation, microsatellite instability and adjuvant chemotherapy: impact on survival of 388 patients with Dukes C colon carcinoma. *Oncology* 2000; 58: 52-9.

¹⁶¹ Tollenaar R, Van Krieken J, Van Slooten H, Bruinvels DJ, Nelemans KM, Van Der Broek LJ, et al. Immunohistochemical detection of p53 and Bcl-2 in colorectal carcinoma no evidence for prognostic significance. *Br J Cancer* 1998; 77: 1842-7.

¹⁶² Díez M, Pallán M, Ramos P. Variación del valor pronóstico de la proteína p53 en relación con el estadio tumoral en pacientes con adenocarcinoma colorrectal. *Cir Esp* 2005; 77(4): 213-20.

¹⁶³ Choi H, Quejon I, Kim S, Hong S. Proliferating cell nuclear antigen expression and its relationship to malignancy potencial in invasive colorectal carcinomas. *Dis Colon Rectum* 1997; 40: 51-9.

¹⁶⁴ Yoshikawa R, Utsunomiya J. Cell proliferation kinetics are anormal in transitional mucosa adjacent to colorectal carcinoma. *Br J Surg* 1996; 83: 36-9.

¹⁶⁵ Abad A, Martínez-Balibrea E, Manzano JL, Ciranqui B. Biología molecular del cáncer colorrectal. *Cir Esp* 2003; 73(1): 9-16.

¹⁶⁶ Jiménez-Anula J, Luque RJ. Valor pronóstico del patrón de invasión tumoral en el cáncer colorrectal. *Cir Esp* 2005; 77(6): 337-42.

¹⁶⁷ Bodnar AG, Oullette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998; 279: 349-352.

¹⁶⁸ Arboleda V, Yunis JJ, Castro LJ, Ricaurte O. Análisis de longitud telomérica y actividad telomerasa en la carcinogénesis gástrica. Grupo de patología molecular. Trabajo de investigación. Premio Aventis. Colombia 2003.

¹⁶⁹ Takagi S, Kinouchi Y, Hiwatashi N, et al. Relationship between microsatellite instability and telomere shortening in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2000; Oct 43(10 suppl): 512-7.

¹⁷⁰ De Kok JB, Zendman AJ, Van Der Locht LT, Ruvers TJ, Van Muijen GN, Mensink EJ, Swinkels DW (1999). Real-time hTERT quantification: a promising telomerase-associated tumor marker. *Lab Invest* 79: 911-912.

¹⁷¹ Shay JW and Gazdar AF. Telomerase in the early detection of cancer. *J Clin Pathol* 1997; 50: 106-109.

¹⁷² Shay JW and Bachetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *European Journal of Cancer* 1997; 33: 187-191.

¹⁷³ Srivastava S, Verma M, Henson DE. Biomarkers for early detection of colon cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1118-1126.

¹⁷⁴ Kopreski MS, Benko FA, Kwak LW, Gocke CD. Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1961-1965.

¹⁷⁵ Chen XQ, Bonnefoi H, Pelte MF, Lyantey J, Lederey C, Movarekhi S, Schaeffer P, Mulcahy HE, Meyer P, Stroun M, Anker P. Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3823-3826.

¹⁷⁶ Ditkoff BA, Marvin MR, Yemul S, et al. Detection of circulating thyroid cells in peripheral blood. *Surgery* 1996; 120(6): 959-64.

¹⁷⁷ Tallini G, Ghossein RA, Emanuel J, et al. Detection of thyroglobulin, thyroid peroxidase, and RET/PTC-1 mRNA transcripts in the peripheral blood of patients with thyroid disease. *J Clin Oncol* 1998; 16(3): 1148-66.

¹⁷⁸ Ringel MD, Balducci-Silana PL, Anderson JS, et al. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction of circulating thyroglobulin messenger ribonucleic acid for monitoring patients with thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(11): 4037-42.

¹⁷⁹ Shay JW (2000). Telomeres, aging and tumorigenesis. *Advances in Oncology*. 16: 3-9.

¹⁸⁰ Thon I, Freedman MH (2002). Telomeres, X-inactivation ratios and hematopoietic stem cell transplantation in humans. A review. *Stem Cells*. 20: 198-204.

¹⁸¹ Shay JW (1998). Telomerase in cancer: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. *Cancer J Sci Am.* 4 (suppl 1): 26-34.

¹⁸² Hiyama K, Hiyama E, Ishioka S, Yamakido M, Inai K, Gazdar AF, Piatyszek MA, Shay JW. Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 895-902.

¹⁸³ Liu J. Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *FASEB J* 1999; 13: 2091-2104.

¹⁸⁴ Kinoshita T, Shirasawa H, Shin Y, Moriya H, Desbarats L, Eilers M, Simizu B. Transactivation of prothymosin and C-myc promoters by human papillomavirus type 16 E6 protein. *Virology* 1997; 232: 53-61.

¹⁸⁵ Greider C. Telomerase activation: one step on the road to cancer?. *Trends Genet* 1999; 15: 109-112.

¹⁸⁶ Gewin L, Myers H, Kiyono T, Galloway D. Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev* 2004; 18: 2269-2282.

¹⁸⁷ Veldman T, Liu X, Yuan H, Schlegel R. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the reverse transcriptase promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8211-8216.

¹⁸⁸ Lu W, Zhang G, Sui L, Wang J. Study on the correlation between the different papillomavirus type and telomerase in cervical cancer. *Int J Gynecol Pathol* 2004; 23(29): 100-109.

¹⁸⁹ Alonso P, Lazcano E, Hernández M. Cáncer cervico uterino: diagnóstico, prevención y control. México: Médica Panamericana. 2000.

¹⁹⁰ Pinto-Tang J, Castro T, Premali G. Detección de la actividad telomerasa en lesiones cervicales mediante el protocolo de amplificación de repeticiones teloméricas (TRAP) no radioactivo. *Invest Clin.* V.46, n°3. Maracaibo sep. 2005.

¹⁹¹ Zheng P, Iwasaka T, Zhang Z, Pater A, Sugimari H. Telomerase activity in papanicolau smear-negative exfoliated cervical cells and its association with lesions and oncogenic human papillomaviruses. *Gynecologic Oncology* 2000; 77: 394-8.

¹⁹² McMurray H, McLance D. Human papillomavirus type 16 E6 activates hTERT gene transcription through induction of C-myc and release of USF-mediated repression. *J Virol* 2003; 77: 9852-9861.

¹⁹³ Urquidi V, Tarin D, Goodison S. Role of telomerase in cell senescence and oncogenesis. *Annu Rev Med* 2000; 51: 65-79.

¹⁹⁴ Bong-Kyeong O, Young-Joo K, Young Nyum P, et al. Quantitative assessment of hTERT mRNA expression in dysplastic nodules of HBV-Related hepatocarcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 831-838.

¹⁹⁵ Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Nishimaki, et al (1997). Cytological detection of telomerase activity using an in situ telomeric repeat amplification protocol assay. *Cancer Res*; 57: 2100-2103.

¹⁹⁶ Kinoshita H, Ogawa O, Kakehi Y, Mishina M, Mitsumari K, Itoh N, Yamada H, Terachi T, Yoshida O. Detection of telomerase activity in exfoliated cells in urine from patients with bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 724-730.

¹⁹⁷ Khalbuss W, Goodison S. Immunohistochemical detection of hTERT in urothelial lesions: a potential adjunct to urine cytology. *Cito Journal* 2006; 3: 18-25.

¹⁹⁸ Ratliff TL. Urine markers for bladder cancer surveillance: a system review. *J Urol* 2005; 174(5): 2065-6.

¹⁹⁹ Sauchini MA, Gunelli R, Nanni O, et al. Relevance of urine telomerase in the diagnosis of bladder cancer. *JAMA* 2005; 294(16): 2052-6.

²⁰⁰ Califano J, Ahrendt SA, Meiningner G, Westra WH, Koch WM, Sidransky D. Detection of telomerase activity in oral rinses from head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cancer Res* 1996; 56: 5720-5722.

- ²⁰¹ Sommerfeld HJ, Meeker AK, Piatyszek MA, Bova GS, Shay JW, Coffey DS. Telomerase activity: a prevalent marker of malignant human prostate tissue. *Cancer Res* 1996; 56: 218-222.
- ²⁰² Scates DK, Muir GH, Venitt S, Carmichael PL. Detection of telomerase activity in human prostate: a diagnostic marker for prostatic cancer? *Br J Urol* 1997; 80: 263-268.
- ²⁰³ Lin Y, Vemura H, Fujinami K, Hosaka M, Harada M, Kubata Y. Telomerase activity in primary prostate cancer. *J Urol* 1997; 157: 1161-1165.
- ²⁰⁴ Weikert S, Krause H, Wolff I, Christoph F, Schrader M, Emrich T, Miller K, Muller M. Quantitative evaluation of telomerase subunits in urine as biomarkers for non-invasive detection of bladder cancer. *Int J Cancer* 2005; 117(2): 274-80.
- ²⁰⁵ Fan Y, Liu Z, Fang X, et al. Differential expression of full-length telomerase reverse transcriptase mRNA and telomerase activity between normal and malignant renal tissues. *Clin Cancer Res* 2005; 11(12): 4331-7.
- ²⁰⁶ Dasí F, Martínez-Rodes P, March JA, Santamaría J, Martínez-Javaloyas JM, Gil M, Aliño SF. Real-Time Quantification of human Telomerase Reverse Transcriptase mRNA in the plasma of patients with prostate cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006; 1075; 1: 204-210.
- ²⁰⁷ Boldrini L, Faviana P, Gisfredi S, Zucconi Y, Di quirico D, Donati V, Berti P, Spisni R, Galleri D, Materazzi G, Basolo F, Miccoli P, Pingitore R, Fontanini G. Evaluation of telomerase mRNA (hTERT) in colon cancer. *International Journal of Oncology* 2002; 21: 493-497.
- ²⁰⁸ Nakashio R, Kitamoto M, Tahara H, Nakamishi T, Ide T, Kajiyama G. Significance of telomerase activity in the diagnosis of small differentiated hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1997; 74: 141-147.

- ²⁰⁹ Hiyama E, Gollahan L, Kataoka T, Kuroi K, Yokoyama T, Gazdar AF, Piatyszek MA, Shay JW. Telomerase activity in human breast tumors. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 116-122.
- ²¹⁰ Haugen BR, Nawaz S, Markham N, Hashizumi T, Shoyer AL, Werness B, Shroyer KR. Telomerase activity in benign and malignant thyroid tumors. *Thyroid* 1997; 7: 337-342.
- ²¹¹ Langford LA, Piatyszek MA, Xu R, Schold SC, Wright WE, Shay JW. Telomerase activity in ordinary meningiomas predicts poor outcome. *Hum Pathol* 1997; 28: 416-420.
- ²¹² Shamas M, Simmons C, Corey D, Reis R. Telomerase inhibition by peptide nucleic acids reverses “immortality” of transformed human cells. *Oncogene* 1999; 18: 6191-6200.
- ²¹³ Albanell J, Lonardo F, Rusch V, Engelhardt M, Langenfeld J, Han W, Klimstra D, Venkatraman E, Moore MA, Dimitrovsky E. High telomerase activity in primary lung cancers: association with increased cell proliferation rates and advanced pathologic stage. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1609-1615.
- ²¹⁴ Gupta J, Han LP, Wang P, Gallie BL, Bachetti S. Development of retinoblastoma in the absence of telomerase activity. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1152-1157.
- ²¹⁵ Bachetti S, Counter C. Telomeres and telomerase in human cancer. *Int J Oncol* 1995; 7: 423-432.
- ²¹⁶ Bryan T, Englezov A, Dalla-Pozza L, Dunham MA, Reddel R. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med* 1997; 3: 1271-1274.
- ²¹⁷ Bryan T, Reddel R. Telomere dynamics and telomerase activity in « in vitro » immortalized human cells. *Eur J Cancer* 1997; 33: 767-773.

²¹⁸ Bryan T, Englezov A, Gupta J, Bachetti S, Reddel R. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J* 1995; 14: 4240-4248.

²¹⁹ Dikmen G, Dikmen E, Kara M, Sahim E, Dogan P, Özdemir N. Implicaciones diagnósticas de la actividad de la telomerasa en los derrames pleurales. *Eur Resp J*. Vol 5, n-1, Enero-Marzo 2004; 399-403.

²²⁰ Hiyama K, Iria Y, Koizumi S, et al. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic cells. *J Immunol* 1995; 155: 3711-3715.

²²¹ Porcel JM. Diagnóstico no invasivo del derrame pleural maligno. *Rev Cubana Med* 2006; 45(2): 147-154.

²²² Maestro S, Sanz-Costa R, Vidaurreta M, Arroyo C. Actividad telomerasa como factor pronóstico en el cáncer colorrectal. XI Reunión de la Sociedad Andaluza de Análisis Clínicos. Hospital de Antequera. Marzo-2004.

²²³ Elkak AE, Meligonis G, Salva M, Mitchell B, Blaque JR, Newbold RF. hTERT protein expression is independent of clinico pathological parameters and C-myc protein expression in human breast cancer. *J Carcinog* 2005; 4: 17.

²²⁴ García-Anguiano F, Marchena J, Martín JA, Gómez G, Nogués E, Hernández J. Factores predictivos de la recidiva del cáncer colorrectal. *Cirugía Española*. Vol 70, Dic 2001, número 6; 267-273.

²²⁵ Umbricht CB, Saji M, Westra WH, Udelsman R, Zeiger MA, Sukuman S. Telomerase activity: a marker to distinguish follicular thyroid adenoma from carcinoma. *Cancer Res* 1997; 57: 2144-2147.

²²⁶ Hiyama E, Hiyama K, Yokohama T, Matsuura Y, Piatyszek MA, Shay JW. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med* 1995; 1: 249-255.

- ²²⁷ Hiyama E, Yokoyama T, Tatsumoto N, Hiyama K, Imamura Y, Murakami Y, Kodama T, Piatyszek MA, Shay JW, Matsuura Y. Telomerase activity in gastric cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 3258-3262.
- ²²⁸ Counter CM, Gupta J, Harley CB, Leber B, Bachetti S. Telomerase activity in normal leukocytes and haematological malignancies. *Blood* 1995; 85: 2315-2320.
- ²²⁹ Mehle C, Piatyszek MA, Ljungberg B, Shay JW, Roos G. Telomerase activity in human renal cell carcinoma. *Oncogene* 1996; 13: 161-6.
- ²³⁰ Bednarek AK, Sahin A, Brenner AJ, Johnston DA, Aldaz C. Analysis of telomerase activity levels in breast cancer: positive detection at the in situ breast carcinoma stage. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 11-16.
- ²³¹ Sugino T, Yoshida K, Bolodeoki J, Tahara H, Buley I, Manek S, Wells C, Goodison S, Ide T, Suzuki T, Tahara E, Tarin D. Telomerase activity in human breast cancer and benign breast lesions: diagnostic applications in clinical specimens, including fine needle aspirates. *Int J Cancer* 1996; 69: 301-306.
- ²³² Kyo S, Kanaya T, Ishikawa H, Veno H, Inoue M. Telomerase activity in gynaecological tumors. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 2023-2028.
- ²³³ Tahara H, Nakanishi T, Kitamoto M, Nakashio R, Shay JW, Tahara E, Kajiyama G, Ide T. Telomerase activity in human liver tissues: comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 1995; 55: 2734-2736.
- ²³⁴ Yahata N, Okyashiki K, Okyashiki JK, Iwama H, Hayashi S, Ando K, Hirano T, Tsuchida T, Kato H, Shay JW, Toyama K. Telomerase activity in lung cancer cells obtained from bronchial washig. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 684-690.
- ²³⁵ Lonardo F, Albanell J. Telomerase in lung cancer. In: MJ Pass HI, Johnson DH, Turrisi AT, Minna JD (ed.). *Lung Cancer: Principles and Practice*. 2 edition, 2000; Vol. 170-180: Lippincott Williams & Wilkins.
- ²³⁶ Brambilla E and Lantuejoul S. Telomerase activation in adenocarcinoma bronchoalveolar carcinoma. *Eur Respir J* 2006; 27: 1079-81.

- ²³⁷ Suau F, Cottin V, Archer F, et al. Telomerase activation in a model of lung adenocarcinoma. *Eur Respir J* 2006; 27: 1175-1182.
- ²³⁸ Miura N, Nakamura H, Sato R, et al. Clinical usefulness of serum telomerase reverse transcriptase (hTERT) epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA as a novel tumor markers cancer. *Cancer Sci* 2006; 17: 208-214.
- ²³⁹ Tahara E, Semba S, Tahara H. Molecular biological observations in gastric cancer. *Semin Oncol* 1996; 23: 307-315.
- ²⁴⁰ Hawkins C, et al. hTERT expression points to prognosis of pediatric brain tumor. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1522-1528.
- ²⁴¹ Fujiwara M, Okayasu I, Takemura T, Tanaka I, Masuda R, Furuhata I, Noji M, Oritsu M, Kato M, Oshimura M. Telomerase activity significantly correlates with chromosome alterations, cell differentiation, and proliferation in lung adenocarcinomas. *Mod Pathol* 2000; 13: 723-729.
- ²⁴² Albanell J, Bosl GJ, Reuter VE, Engelhardt M, Franco S, Moore MAS, Dimitrovsky E. Telomerase activity in germ cell cancers and mature teratomas. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1321-1326.
- ²⁴³ Clark GM, Osborne CK, Levitt D, Wu F, Kim N. Telomerase activity and survival of patients with node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1874-1881.
- ²⁴⁴ Deeks JJ. Using evaluations of diagnostic test: understanding their limitations and making the most of available evidence. *Ann Oncol* 1999; 10: 761-768.
- ²⁴⁵ Guyatt GH, Tugwell P, Feeny DH. A framework for clinical evaluation of diagnostic technologies. *Can Med Assoc J* 1986; 134: 487-594.
- ²⁴⁶ Carpelan-Holmstrom M, Haglund C, Kuusela P, Jarvien H, Roberts PJ. Preoperative serum levels of CEA and CA 242 in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1995 Apr. 71(4): 868-872.

²⁴⁷ Folini M, Brambilla C, Villa R, Gandellini P, Vignati S, Paduano F, et al. Antisense oligonucleotide mediated inhibition of hTERT, but not hTERC, induces rapid cell growth decline and apoptosis in the absence of telomeres shortening in human prostate cancer cells. *Eur J Cancer* 2005; 41: 624-34.

²⁴⁸ Zanetti M, et al. Telomerasa como base para una vacuna contra el cáncer. *Pr Nat Aca Sci* 2000; 11.

²⁴⁹ Kurvinen K, Syrjänen S, Johansson B. Long-term suppression of telomerase expression in HeLa cell clones stably with an expression vector carrying siRNA targeting hTERT mRNA. *Int J Oncol* 2006; 29: 279-288.

²⁵⁰ Lledó S, Alfonso R y Aliño SF. Eficacia de la terapia génica antisentido utilizando oligonucleótidos anti K-ras y antitelomerasa en el cáncer colorrectal. *Rev Esp Enferm Dig* 2005; 97(7): 472-480.

²⁵¹ Kraemer K, Schmidt V, Fuessel S, Herr A, Wirth MP, Meye A. Microarrays analyses in bladder cancer cells: inhibition of hTERT expression regulates EGFR. *Int J Cancer* 2006; 13: 148-151.

²⁵² Strahl C, Blackburn EH. Effects of reverse transcriptase inhibitors on telomere length and telomerase activity in two immortalized human cell lines. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 53-65.

²⁵³ Lledó S, García-Granero E y García-Armengol J. Tratamiento quirúrgico y resultados del cáncer de recto. *Cir Española* 2003; 73(1): 25-29.