

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA



**ULTRAESTRUCTURA E HISTOLOGÍA DE TEJIDOS
ADYACENTES A ADENOCARCINOMAS RECTALES EN
PACIENTES TRATADOS CON RADIOTERAPIA Y
QUIMIOTERAPIA**

T.E.G presentado por el bachiller Héctor Luis Osorio- Vega

Tutor: Dr. Héctor José Finol

Caracas, Venezuela

Noviembre-2014

ÍNDICE DE CONTENIDO

Resumen.....	2
Introducción.....	3
Justificación.....	19
Antecedentes.....	20
Objetivos.....	23
Materiales y métodos.....	24
Resultados.....	30
Discusión.....	88
Conclusiones.....	98
Anexos.....	100
Bibliografía.....	104

RESUMEN

El cáncer constituye un conjunto de enfermedades caracterizadas por la pérdida de regulación sobre el ciclo celular. Esta aflicción se mantiene entre las primeras causas de muerte en todo el mundo. En Venezuela, los cánceres gástricos son la cuarta causa de muerte, constituyendo los Adenocarcinomas colorrectales (ACC) el 95% de los casos nuevos. Por su localización en el tracto digestivo, estas neoplasias pueden ser completamente removidas, siendo el método de extracción más efectivo en la mayoría de los casos, la resección anterior, en la cual se remueve la pieza del intestino que incluye el tumor principal e idealmente la totalidad del tejido peritumoral invadido. Sin embargo hay un porcentaje de pacientes “curados” en los que reaparecen los signos y síntomas del cáncer. Se considera que los márgenes de resección juegan un importante papel en la reaparición del cáncer y requieren de estudios tales que permitan la caracterización de estos microambientes. Para el logro de esta investigación, las muestras de ACC fueron sometidas al procesamiento rutinario de corte fino para microscopía electrónica de transmisión de muestras biológicas (Fijación, lavado, postfijación, deshidratación, infiltración e inclusión). Los cortes finos (60-90 nm) y los gruesos (1 μ m) se obtuvieron con un ultramicrotomo Porter-Blum MT2-B. Las secciones finas obtenidas fueron contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo. Finalmente, las muestras se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión modelo JEM-1011(80kV). Las secciones gruesas se tiñeron con azul de toluidina. Los resultados iniciales revelaron la presencia de alteraciones histológicas y ultraestructurales en el tumor y el tejido peritumoral de pacientes tratados y no tratados, también se pudo observar apoptosis y necrosis en el tumor de pacientes tratados y no tratados, se encontró que solo los no tratados presentaban señales de muerte celular por autofagia, además de esto, en la zona . A lo largo de todos los puntos muestreados se pudo observar la persistencia de alteraciones organelares de variada intensidad como la edematización mitocondrial, incremento en el tamaño del núcleo y la dilatación de cisternas de retículo endoplasmático rugoso. Se detectó también la presencia de un engrosamiento de la membrana basal de vasos sanguíneos que se mantuvo a lo largo del tejido peritumoral. Se encontraron evidencias de un proceso inflamatorio en toda la periferia tumoral, el cual pudiese considerarse como un elemento que influencia la presencia de alteraciones en el tejido peritumoral. Luego de realizar una comparación entre las observaciones histológicas y las ultraestructurales, resultó evidente que la microscopía de luz es insuficiente para realizar una apropiada caracterización del tejido peritumoral y que al tomar en cuenta las alteraciones ultraestructurales, la extensión de tejido clasificado como alterado puede incrementar considerablemente.

Palabras clave: Adenocarcinoma, Ultraestructura, Histología, Radioterapia, Quimioterapia, Tumor, Peritumoral.

INTRODUCCIÓN

Los primeros casos de cáncer registrados en la historia pertenecen a los egipcios, que alrededor del año 3000 A.C, describen tumores de seno que intentaron curar con cauterización, cuchillos, sales e incluso una pasta de arsénico conocida como “el ungüento egipcio” que se mantuvo vigente como tratamiento hasta el siglo 19. Las causas para esta aflicción fueron consideradas sobrenaturales hasta aproximadamente 450 años antes de Cristo, cuando Hipócrates y sus discípulos introdujeron la idea de que la aparición de tumores era un evento de origen natural e inventaron el término *Karkinos* (cangrejo) que luego sería modificado a carcinoma y cáncer para tumoraciones malignas y ulceradas respectivamente (Hajdu, 2011).

El cáncer está constituido por un conjunto de enfermedades presentes en los organismos multicelulares superiores, que se caracterizan por la pérdida de regulación sobre el ciclo celular e inestabilidad genética. Otras características resaltantes de este son: constante señalización y sensibilización ante estímulos promotores de la proliferación, evasión de supresores del crecimiento, resistencia a la muerte celular programada, inmortalidad replicativa, inducción de la angiogénesis e invasión local y metástasis activas (Hanahan y Weinberg, 2000).

Al hablar de resistencia a la muerte celular (apoptosis) e inmortalidad replicativa, se hace referencia a la capacidad de las células tumorales de evadir o inhibir en gran medida cualquier estímulo (ya sea intrínseco o extrínseco) que desencadene la sucesión de reacciones causantes de la eliminación de células, con anomalías genéticas y/o pérdida del equilibrio de sus parámetros internos.

Un término muy utilizado al referirse a tejidos en los cuales ha ocurrido un crecimiento anormal de células, capaces de desplazarse activamente a través del cuerpo, es neoplasia. El tejido resultante de esta proliferación celular descontrolada tiende a formar una masa sólida. Esta capacidad de generar tumores es una característica extremadamente común en la mayoría de las manifestaciones del cáncer.

La capacidad de las células tumorales resultantes de un proceso neoplásico de migrar desde el tumor principal hacia el tejido sano circundante por medio de quimiotaxis se conoce

como invasión local, mientras que cuando este mismo proceso le permite a la célula (ahora denominada invasora o maligna por su habilidad de desplazarse activamente por el tejido) infiltrar el sistema circulatorio o el linfático, facilitando así su movimiento a lugares distantes en el cuerpo, recibe el nombre de metástasis. Este último proceso es el responsable de la mayoría de las muertes de pacientes (Bujko y col., 2006; Herold y Rasooly., 2012).

A nivel global, el cáncer se mantiene como una de las primeras causas de muerte, estando alguna de sus manifestaciones al menos entre las primeras diez (10) en países desarrollados, solo superado por enfermedades cardíacas (World Cancer Research Fund International, 2013). El cáncer colorrectal es relativamente raro en países en vías de desarrollo, mientras que en los desarrollados representa el segundo tipo de cáncer más común. Sin embargo, en el caso particular de Venezuela, el cáncer es la segunda causa de muerte, siendo el colorrectal el más común, con una tasa de mortalidad de alrededor del 7% tanto para hombres como para mujeres (Sociedad Anticancerosa de Venezuela, período Enero-Septiembre 2012 y Ministerio Popular para la Salud, 2013).

La discrepancia en la incidencia de este cáncer entre países con distinto grado de desarrollo, se ha relacionado principalmente con la dieta asociada al estilo de vida próspero, caracterizada por ser rica en grasas, carbohidratos refinados, proteína animal y baja en fibras y actividad física. A pesar de esto, la edad es el factor de riesgo de mayor impacto, siendo personas de más de 50 años el 90% de los casos diagnosticados (Ruddon, 2007).

Otros factores de riesgo que incrementan la probabilidad de la aparición de cáncer colorrectal son: Colitis ulcerativa, historia familiar de cáncer colorrectal, obesidad, poliposis adenomatosa familiar, enfermedad de Crohn, tendencia general a la manifestación de inflamaciones severas, entre otros (Zuñiga, 1973; Adami y col., 1990; Carey y col., 2002; Chiriva-Internati y col., 2005).

Al hablar de cáncer colorrectal, nos referimos a aquellas neoplasias situadas en el intestino grueso, el cual se divide en colon (que continúa al intestino delgado) y recto (zona terminal del sistema digestivo). El colon mide aproximadamente 1,5 m de largo, mientras que el recto tiene una longitud que varía entre 12 y 15 cm. La primera parte del intestino grueso

puede dividirse en 3 secciones: colon ascendente, colon transverso y colon descendente. Las funciones principales del colon ascendente y transverso es la de absorber agua y sales, mientras que el colon descendente y el recto, sirven como lugar donde la materia fecal se deposita en espera de su expulsión (Latarjet y Ruiz, 2004).

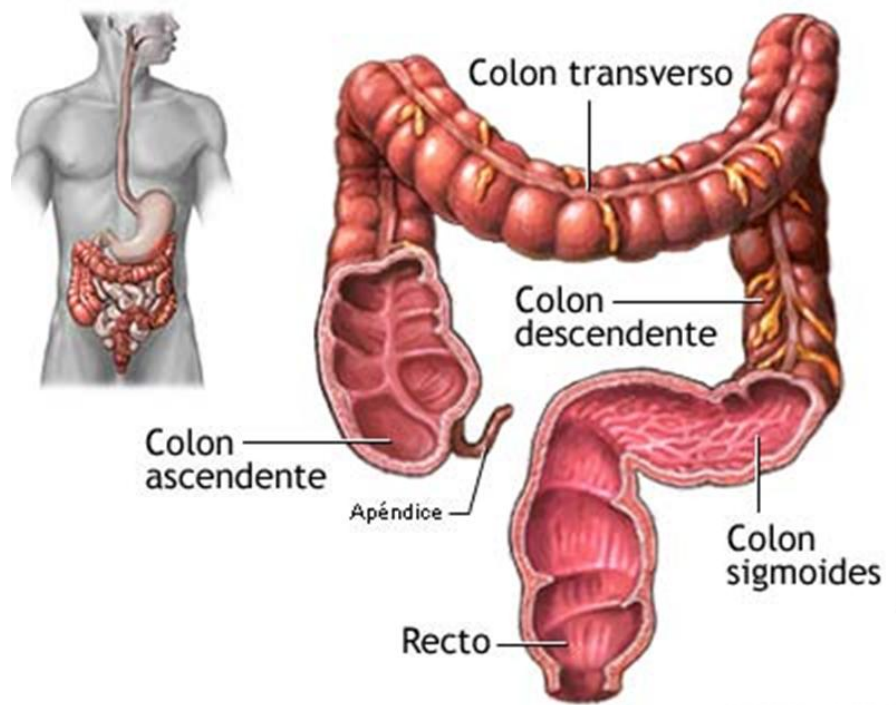


Figura 1. Anatomía del Colon (tomado de <http://www.clinicadam.com/imagenes-de-salud>)

El colon se encuentra compuesto por varias capas de tejidos concéntricos, que a *grosso* modo pueden nombrarse desde la más próxima a la luz del intestino hasta la más lejana, de la siguiente forma: mucosa, submucosa, muscular y serosa (Yadav, 2003).

La mucosa se encuentra compuesta externamente por un epitelio columnar glandular, el cual entra en contacto con la luz del intestino. A mayor profundidad se encuentra la lámina propia, compuesta por tejido areolar, que contiene las glándulas secretoras de moco formadas por el plegamiento del epitelio (criptas de *Lieberkühn*), fibras dispersas de musculo liso y nódulos linfáticos. La última capa de la mucosa (*muscularis mucosae*), es una capa de músculo liso que facilita la formación de pliegues en el tejido. La submucosa

está compuesta por tejido areolar que contiene vasos sanguíneos, nódulos linfáticos y nervios.

Así mismo, la *muscularis* se divide en distintas capas de músculo liso: oblicuo, circular y longitudinal. Finalmente, en la serosa se pueden encontrar: vasos sanguíneos, tejido adiposo y en su punto más profundo, la cubierta mesotelial. Las capas de tejido presentes en el recto son similares a las del colon, pero con criptas de mayor longitud y sin la presencia de serosa, en cuyo lugar existe una gruesa capa de grasa que lo une a una capa muscular (Yadav, 2003).

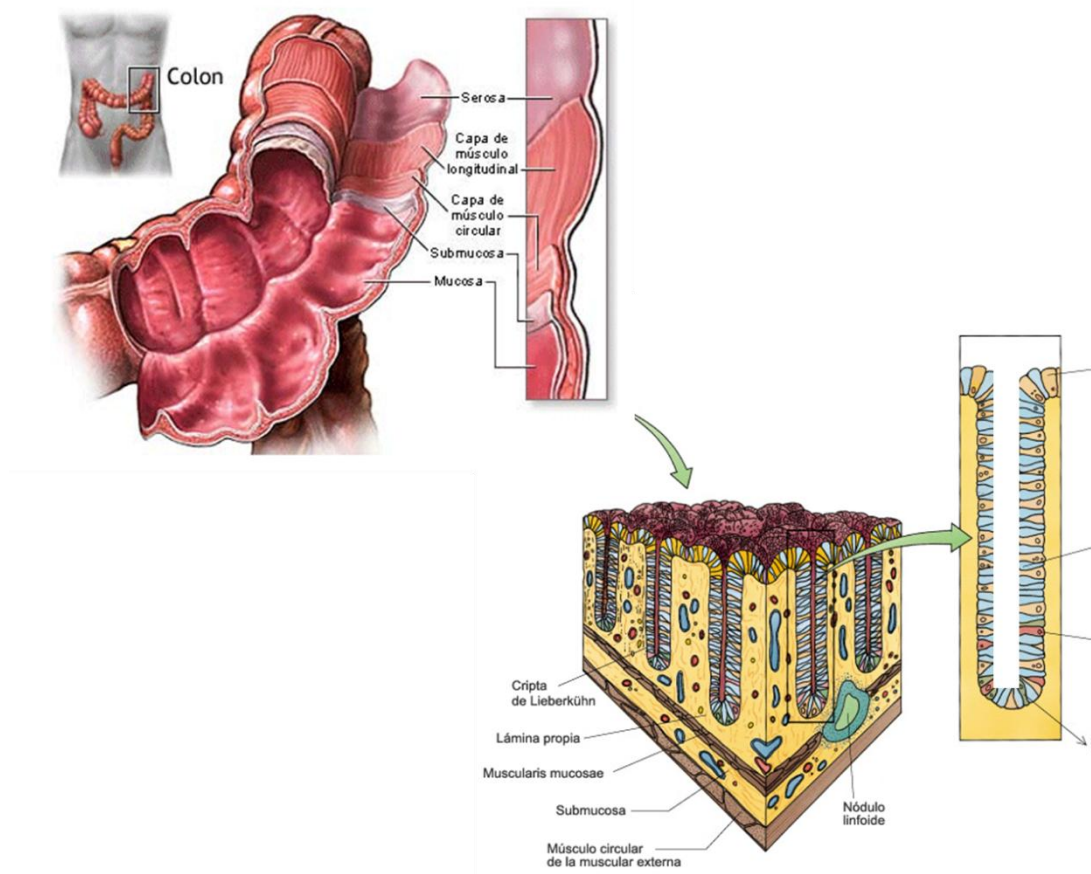


Figura 2. Histología del colon (tomado de <http://megamedicina.blogspot.com/2011/06/uabp-4.html> y http://fisio4tlcv6.blogspot.com/2010/04/caracteristicas-histologicas-del_06.html)

El cáncer colorrectal puede dividirse en distintos tipos dependiendo de la composición del tejido que forma el tumor. El 95% de los casos nuevos son Adenocarcinomas, tumores sólidos caracterizados por derivarse de un epitelio glandular, mientras que el 5% restante

está representado por Carcinomas Adenoescamosos y Carcinomas Mucinosos, los primeros (al igual que el Adenocarcinoma) formados de epitelio glandular y células escamosas. Los últimos son también tumores de epitelio glandular pero que se destacan por su gran cantidad de moco (Zuñiga, 1973; Alvaro y col., 1996; Ruddon, 2007).

La evolución natural del cáncer colorrectal comienza usualmente en la mucosa y submucosa, donde toma la forma de proliferación epitelial y se proyecta, formando una protuberancia, lo cual sugiere que el cáncer se desarrolla a partir de un adenoma preexistente. En la siguiente etapa, la infiltración resulta en ulceración que puede variar en magnitud dependiendo del grado de penetración del tejido por parte del tumor. La metástasis linfática se detecta solo cuando el tejido neoplásico se ha esparcido, a través de las capas de tejido hasta llegar a las más externas. El crecimiento local de este cáncer es lento, con semanas y meses, ocupando el proceso de penetración de la submucosa y capas musculares.

Dependiendo de la localización y características del tumor, éste puede causar una variedad de síntomas. En etapas tempranas, el paciente usualmente no presenta ninguno, mientras que, al aumentar de tamaño el tumor, la ulceración y la hemorragia resultante causa la aparición de sangre en las heces, la frecuencia de evacuación también puede resultar alterada. Cuando el cáncer se encuentra en etapas avanzadas, ha penetrado considerablemente el tejido y/o ha hecho metástasis se pueden presentar manifestaciones sistémicas generales o paraneoplásicas (College of american pathologist, 2011).

Una vez que el proceso de transformación ha tenido lugar, la población de células resultantes (tumoraes), presenta una gran heterogeneidad morfológica y funcional, pérdida de diferenciación y una gran habilidad de adaptación como resultado de fuerte presión selectiva en el microambiente, alta tasa de replicación e inestabilidad genética.

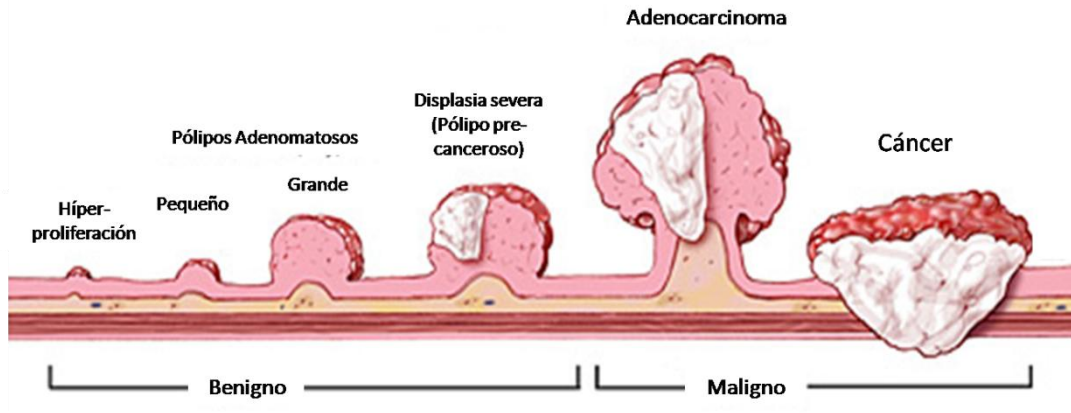


Figura 3. Progresión del cáncer Colorrectal (tomado de http://www.hopkinscoloncancercenter.org/CMS/CMS_Page.aspx)

Uno de los conceptos fundamentales más importantes con relación al cáncer colorrectal es el de la secuencia adenoma – carcinoma (SAC), un término que describe la progresión del tejido epitelial sano a displasia epitelial y finalmente a carcinoma mediante la acumulación progresiva de alteraciones genéticas. Es aceptado que esta secuencia representa el proceso mediante el cual la mayoría (sino todos) de los cánceres de la zona colorrectal tienen origen. Muchos de los modelos propuestos sugieren al gen APC (*Adenomatous Poliposis Coli*), que codifica a una proteína supresora de tumores y se asocia con los procesos de muerte celular programada y activación de la transcripción, como lugar de la(s) primeras mutaciones de esta secuencia y por tanto, las responsables de la transición de tejido normal a pólipo adenomatoso (Carey y col., 2002; Ruddon, 2007).

Puesto que la SAC incluye solo algunas de las lesiones polipoides que pueden presentarse en el intestino grueso, es apropiado establecer los distintos cambios que sufre el tejido a medida que se desarrollan los tumores colorrectales malignos (Adenocarcinomas en este caso).

De los 4 distintos tipos de pólipos epiteliales que se pueden encontrar en el sistema digestivo: Adenomatoso (PA), hiperplásico, inflamatorio y hamartomatoso, solo el primero es considerado como lesión precursora del cáncer. Estos presentan una arquitectura glandular anormal (displasia) que es clasificada como leve, moderada o severa, de manera que los pólipos con displasia severa pueden incluso clasificarse como carcinomas “*in situ*” (Yee, 2008).

Existen 3 subtipos de PA de acuerdo a sus características histológicas: Tubular, veloso y túbulo-veloso. Los primeros son los más comunes, representan un 85% de los PA y se caracterizan por tener una ramificación compleja del tejido glandular y un tamaño pequeño (menos de 10 mm). Usualmente solo el 3% de ellos progresan hasta convertirse en tumores malignos. Los velosos son menos comunes, con un tamaño de más de 2 cm, tienen glándulas rectas y cortas que se extienden hasta la muscularis mucosa y tienen un 40% de probabilidad de convertirse en carcinomas. Los túbulo-velosos poseen elementos de los 2 subtipos ya mencionados, son de mayor tamaño que los tubulares (más de 10 mm) y su tendencia de dar lugar a un carcinoma será proporcional a la cantidad de su componente veloso (Yee, 2008).

Los carcinomas colorrectales resultantes de los adenomas con displasia severa presentan fuertes cambios tanto a nivel de la arquitectura del tejido, como a nivel de la morfología celular, entre estos se encuentran: Agrupamiento de gran cantidad de glándulas, fuerte ramificación de criptas, presencia de glándulas por debajo de la *muscularis mucosae*, formación de estructuras papilares con proyección hacia la luz del intestino, pérdida de polaridad celular, pérdida de diferenciación, estratificación celular, núcleos polimórficos y/o hipercromáticos, entre otros (Lanza y col., 2011).

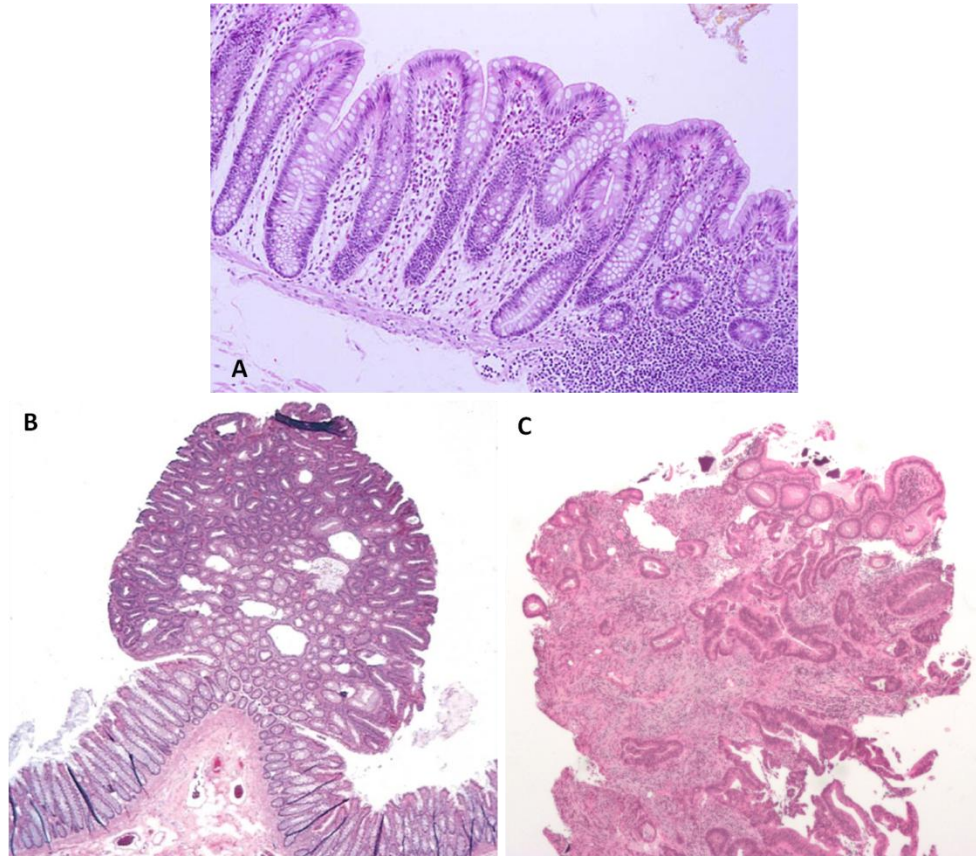


Figura 4. A) Corte histológico de Colon normal. B) Histología de Adenoma tubular. C) Histología de carcinoma colorrectal. (Tomado de <http://insidesurgery.com/2011/04/lynch-syndrome-hereditary-nonpolyposis-colon-cancere/>)

A objeto de incrementar la probabilidad de diagnosticar a un paciente con cáncer colorrectal, cuando éste se encuentra en sus etapas más tempranas, es necesario que el paciente se someta a chequeos regulares diseñados para detectar anomalías en el tracto digestivo.

Las personas que se someten a los chequeos regulares anteriormente mencionados, pueden dividirse en 2 grandes grupos. Aquellos que presenten antecedentes familiares, predisposición genética y/o alguna enfermedad asociada a frecuentes inflamaciones intestinales, serán considerados como personas de **alto riesgo**, mientras que aquellos que no presenten ninguna de estas características, son llamados personas de **riesgo promedio** (Galiano de Sánchez, 2005).

Para las personas de riesgo promedio, a partir de los 50 años se les recomienda:

- **Prueba de sangre oculta en las heces:** Para esta prueba existen muchas variaciones, sin embargo, el objetivo se mantiene en la detección de sangre en la materia fecal. De resultar positiva, esta prueba precede a una sigmoidoscopia o a una colonoscopia. Se recomienda tomar esta prueba cada año.
- **Sigmoidoscopia:** Consiste en el examen de la porción inferior del colon mediante el uso de un sigmoidoscopio insertado a través del recto. La exploración mediante este instrumento es recomendada cada 5 años.
- **Colonoscopia:** Es similar a la sigmoidoscopia, sin embargo, este método permite la visualización del colon completo. Se recomienda cada 10 años.
- **Enema de bario de doble contraste:** en esta técnica se inyecta aire y una suspensión de bario a través del recto, lo cual facilita la visualización de pólipos en las radiografías. Se recomienda cada 5 años.

En aquellos casos en los que mediante estas pruebas se detecte alguna anomalía en el tejido, el médico puede tomar una muestra de éste para su estudio histológico y/o molecular. Para las personas de alto riesgo se recomiendan las mismas pruebas o variaciones más sensibles de éstas, sin embargo, su aplicación debe comenzar más temprano en la vida del paciente y con mayor regularidad, dependiendo de los factores que lo predispongan a manifestar cáncer colorrectal (Galiano de Sánchez, 2005).

Al sospechar de la presencia de una alteración en el área colorrectal, se procede a determinar mediante una biopsia del pólipo o la zona alterada, si efectivamente el tejido de la muestra presenta anomalías histológicas correspondientes a un proceso neoplásico.

En tumores colorrectales malignos existe un parámetro de mucha importancia para determinar su estadio. El margen circunferencial se define como el margen de tejidos blandos periféricos, más próximos al punto de penetración máxima del tumor (Dominguez, 2004), siendo este factor tomado muy en cuenta en los sistemas de clasificaciones más utilizados para cáncer colorrectal, los cuales son: TNM y Duke.

La biopsia que se toma del paciente es útil para la determinación de la presencia de células malignas, aun cuando, por sí sola no es suficiente para realizar una estadificación

contextualizada espacialmente, es decir, no se tiene información concreta de la penetración del tumor a través del tejido.

Debido a que una alta proporción de los tumores colorrectales tienen un crecimiento lento, durante la mayoría del cual se encuentran confinados a las paredes del tracto digestivo, su extracción quirúrgica resulta en muchos casos con la completa extracción del tejido neoplásico del paciente.

La posición y estadio del tumor tienen gran efecto sobre qué tipo de procedimiento le será realizado al paciente. Actualmente existen 3 opciones: la resección anterior, resección local y la amputación abdominoperineal.

Solo el 5% de los tumores del área rectal son susceptibles a la resección local, puesto que exige que sean de estadio T1, con menos de 3 cm de diámetro, a un máximo de 10 cm del ano y tengan moderada o buena diferenciación, es decir, que no se haya perdido toda la estructura del tejido. Este procedimiento es el menos invasivo puesto que consiste en la extirpación del tumor mediante la extracción de una sección relativamente pequeña del recto y la inserción de los instrumentos a través del ano sin necesidad de hacer incisiones abdominales (Armengol y col., 2003).

Del 60% al 90% de los casos son susceptibles a la resección anterior. Esta técnica es más agresiva puesto que si requiere de una incisión abdominal y la pieza extraída tiende a ser de un tamaño considerablemente mayor. Los márgenes que delimitan estas secciones tienen como punto de referencia al tumor y en los casos en los que este se encuentre en la zona rectal (tumores rectales distales) se mantienen alrededor de los 2 cm de cada lado. Sin embargo, éstos incrementan a medida que se va ascendiendo por el colon, hasta el punto en que 5 cm son necesarios debido a la presencia de nidos de células tumorales que tienden a distribuirse a un rango de 2-3 cm del tumor (Armengol y col., 2003; Cervantes y col., 2003).



Figura 5. Resección anterior (tomado de <http://conemaugh.kramesonline.com/spanish/HealthSheets/3,S,88501>)

Finalmente, la amputación abdominoperineal resulta efectiva en menos del 10% de los casos, recomendándose principalmente para tumores rectales muy cercanos al ano que logran infiltrar el esfínter. Este método tiene serias consecuencias para el paciente pues implica la realización de una colostomía definitiva. Siempre y cuando los bordes de la sección removida tengan al menos 1 cm de tejido sano y se haya descartado la presencia de invasión a zonas distantes, se puede decir que la cirugía ha sido curativa (Cervantes y col., 2003).

Todas las observaciones de los segmentos de intestino extraídos son realizadas por un patólogo durante la operación. Éste determina la condición de los bordes basado en una observación histológica.

Como se mencionó anteriormente, la cirugía es el tratamiento principal y por tanto, el más utilizado en pacientes con cáncer colorrectal, sin embargo, el uso de radioterapia y/o quimioterapia es muy común ya sea antes o después de la operación.

La radioterapia se basa en el uso de radiación de alta energía (rayos X, rayos gamma, neutrones, protones, entre otros.) con el fin de eliminar células neoplásicas y reducir el tamaño de los tumores. Es utilizado usualmente cuando en el paciente, el cáncer se ha adherido a un órgano interno o al revestimiento del abdomen, puesto que en estas

situaciones al cirujano no le es posible saber si el cáncer ha sido o no totalmente removido. Adicionalmente, se ha sugerido que su uso postoperatorio reduce significativamente la probabilidad de reaparición del tumor a nivel local. A pesar de estas ventajas, esta terapia tiende a aumentar la probabilidad de complicaciones postoperatorias (sepsis, úlceras rectales, necrosis espontánea, fístulas, mala absorción, entre otros), daña el sistema inmune y no reduce la probabilidad de recurrencia por metástasis. Por estas razones, su uso tiende a limitarse a casos avanzados, donde sus efectos sobre el tumor y por tanto, su beneficio es mayor (Camma y col., 2000).

Actualmente se recomienda que la radioterapia sea aplicada antes de la resección pues esto puede llegar a favorecer la eliminación de las células malignas del paciente, especialmente en casos en los que el tamaño o la ubicación del tumor hagan difícil la cirugía.

Esta técnica también se puede utilizar para controlar el crecimiento de los tumores en aquellos pacientes que no pueden ser sometidos a cirugías o para aliviar algunos de los síntomas de personas con cáncer muy avanzado (bloqueo intestinal, sangrado o dolor).

Existen distintos tipos de tratamientos con radiación que se le pueden aplicar a pacientes con tumores malignos (radioterapia endocavitaria, braquiterapia, radioembolización con microesferas de itrio 90), sin embargo, el más usado en casos de cáncer colorrectal es el de “rayos externos”, en el cual se aplica la radiación desde una máquina que se encuentra fuera del cuerpo (acelerador lineal). La aplicación de este método no es dolorosa en sí, solo tarda unos pocos minutos y tienden a aplicarse 5 días a la semana por varias semanas (es menos frecuente si se administra antes de la cirugía) (American Cancer Society, 2013).

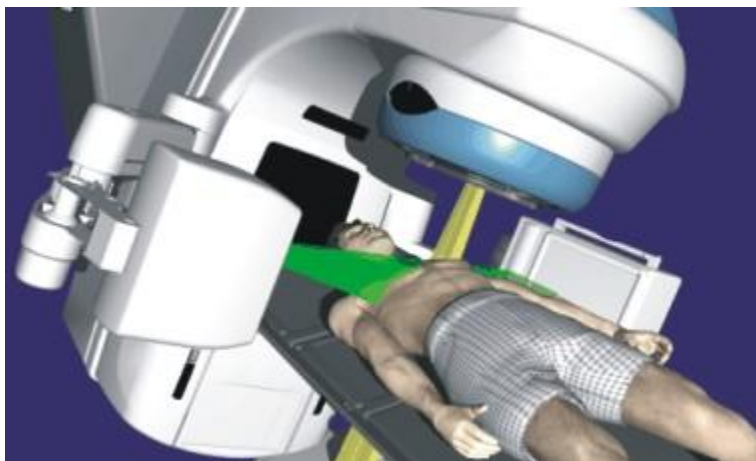


Figura 6. Ejemplo de radioterapia de rayos externos (tomada de <http://www.periodicoelpulso.com/html/1009sep/general/general-02.htm>).

Entre los efectos secundarios que pueden esperarse del uso de radioterapia en la zona colorrectal están: Irritación de la piel en la zona de aplicación, náuseas, irritación rectal, diarrea, sangre en las heces, incontinencia intestinal, irritación de la vejiga, ardor o dolor al orinar, fatiga y problemas sexuales (impotencia o irritación vaginal) (American Cancer Society, 2013).

La quimioterapia aplicada a pacientes con cáncer consiste en el uso de agentes químicos con el propósito de prevenir la multiplicación de las células malignas, invasión local y metástasis. Ya que los efectos de la mayoría de los agentes utilizados usualmente tienen su mayor influencia sobre la proliferación celular, es muy común que resulten dañinos en tejidos normales con tendencia a renovarse frecuentemente (ej. medula ósea, mucosa intestinal, entre otros.). Como consecuencia de lo anterior, la selección de los agentes quimioterapéuticos dependerá del equilibrio entre su efectividad en la inhibición del crecimiento de tejido neoplásico y de su citotoxicidad sobre células sanas, debido a esto, es esperado que este tratamiento se administre en ciclos de 2 a 4 semanas. En los casos de mayor éxito, el uso de esta técnica es suficiente para eliminar todo rastro de células anormales (Gill y col., 2003).

La forma en que se usa la quimioterapia para pacientes con cáncer colorrectal varía de acuerdo al caso. Puede ser aplicada antes de la cirugía (neoadyuvante), después (adyuvante) o como un método para controlar el crecimiento de tumores o aliviar síntomas causados por la diseminación del tejido neoplásico en pacientes terminales.

Existen varios medicamentos que se usan en la quimioterapia para cáncer colorrectal y que en casos de tratamiento adyuvante, tienden a ser administrados a los pacientes en forma de combinaciones. Entre los más utilizados se encuentran: El 5-Fluorouracilo, Capecitabina, irinotecán y oxaliplatino (American Cancer Society, 2013).

Los tratamientos con fármacos antineoplásicos en general pueden causar severos efectos secundarios como la caída del cabello, llagas en la boca, pérdida de apetito, náusea, vómito, aumento en la probabilidad de infecciones por baja cantidad de glóbulos blancos, tendencia a presentar moretones y sangrados y fatiga (American Cancer Society, 2013).



Figura 7. Medicamento antineoplásico 5-Fluoroacilo. (Tomado de <http://www.palmagyar.com/webfiles/fotos/flourouracilo%20250mg.jpg>)

Las distintas técnicas utilizadas para la extracción del tumor principal en cáncer colorrectal tienden a tener gran éxito y resultar curativas en aproximadamente un 50% de los casos en los que las células malignas no han logrado invadir a distancia y por tanto, el tejido neoplásico se encuentra limitado a las paredes del intestino, así disminuyendo el riesgo de la reaparición de la condición en otros órganos (Abulafi y Williams., 1994).

Al inicio, aproximadamente el 50% de las intervenciones quirúrgicas aplicadas (en ausencia de quimioterapia o radioterapia, ya sea antes o después de la operación) pueden considerarse curativas. Sin embargo, existe un serio problema que se mantiene hasta nuestros días y representa una de las razones de mayor peso para el mantenimiento de chequeos frecuentes del paciente luego de ser dado de alta: Se trata del fenómeno conocido como “recurrencia local”.

El término recurrencia local se refiere a la reaparición de los signos y síntomas del cáncer en un sitio que fue sometido a tratamiento y en el cual se consideró que este había resultado exitoso al eliminar todo rastro de la condición. En el caso particular del cáncer colorrectal, se sabe que cuando el tratamiento del paciente consiste solamente en la extracción del tumor principal, 50-70 % de las intervenciones son consideradas como curativas. Sin embargo, dentro de ese mismo grupo se calcula que 10-25 % sufrirá de recurrencia local (Abulafi y Williams., 1994).

Las causas de este evento caen dentro de 3 categorías: el paciente, el tumor y la cirugía. En lo referente al paciente, se asocia un incremento en la probabilidad de recurrencia en aquellos individuos mayores de 70 años (ésta aumenta en el caso de pacientes de alto riesgo). La influencia del tumor viene dada principalmente por su tamaño, grado de penetración y número de nódulos linfáticos infiltrados. Estas propiedades se piensa tienen directa relación con la reaparición de tejido neoplásico. Finalmente, la cirugía parece ser el factor que aporta mayor variabilidad a los estudios puesto que depende del conocido “factor cirujano”. La cirugía ha sido estudiada extensivamente en cuanto a su efecto sobre la recurrencia. El error humano y el clasificar una operación como curativa aun cuando solo la mayor parte del tejido afectado ha sido extraído (células tumorales o transformadas todavía presentes en áreas peritumorales no resecaadas), se consideran los elementos más importantes. El tipo de cirugía también se toma en cuenta, aún cuando, la influencia de cada forma distinta de operación y sus respectivas variaciones sobre la reincidencia no es clara (Abulafi y Williams., 1994; Camma y col., 2000). Resulta importante mencionar que en muchas ocasiones la recurrencia local se detecta a nivel microscópico (solo unas pocas

células anormales) debido a que el seguimiento del paciente luego del tratamiento favorece la detección temprana, sin embargo, de no ser tratado implica el retorno de la condición original.

La determinación de la condición de los márgenes de resección de carcinomas colorrectales tiende a ser crítica al momento de establecer si una operación ha resultado o no curativa. Por ello, la detallada descripción de la ultraestructura de la zona tumoral, así como de su periferia, en pacientes tratados o no con quimioterapia y/o radioterapia, resulta necesaria a fin de conocer el tipo de alteraciones celulares y microambientales presentes que puedan resultar relevantes para el tratamiento.

JUSTIFICACIÓN

Este trabajo es una continuación de las investigaciones que se han venido haciendo en el Centro de Microscopía Electrónica de la UCV referidas a la ultraestructura del tejido peritumoral en distintos tipos de tumores. Estas han contemplado efectos peritumorales de Adenocarcinomas colorrectales en pacientes tratados con quimioterapia y radioterapia (Sierra y col., 2013), carcinomas gástricos (Tonino y col., 1996) y la ultraestructura de alteraciones de musculatura esquelética peritumoral en Fibrohistiocitomas malignos (Finol y col., 1994). Adicionalmente, con este trabajo se intenta ampliar el conocimiento que se tiene hoy en día sobre las alteraciones histológicas y ultraestructurales presentes en los tejidos peritumorales a Adenocarcinomas colorrectales, siendo este conocimiento relevante por la elevada incidencia de carcinomas gastrointestinales que existe en Venezuela.

ANTECEDENTES

Al abordar el tema de la microscopía aplicada a tejidos neoplásicos, es imposible no hacer mención de las ideas y observaciones del patólogo alemán Rudolf Virchow, que entre los años de 1847 y 1865 publicó 3 monografías referentes a la caracterización y definición del proceso tumoral. En éstas se propone la importancia del microambiente tumoral, se comienzan a utilizar y defender los conceptos de patología celular en lugar de la humoral, establece la necesidad y dificultades de un sistema de estadificación, menciona la heterogeneidad entre tumores de una misma clasificación y explica que el comportamiento, velocidad de crecimiento y el grado de malignidad de un tumor pueden ser afectados por el contexto en el cual se encuentra. A pesar de que muchas de sus descripciones y diagnósticos referidos a tumores específicos han sido clasificadas como errores y no son aceptados actualmente, sus postulados en la patología tumoral general han resistido la prueba del tiempo, siendo confirmados y expandidos gracias a los conocimientos aportados por la microscopía electrónica, la biología molecular, la genética y la inmunología (Heinz, 1988).

No fue sino hasta el año de 1970 que el doctor Walter J. Burdette, basándose en una serie de ensayos de incorporación de timidina tritiada, propuso que en tejidos adyacentes a tumores colorrectales puede haber un comportamiento alterado a pesar que mediante histología aparenten estar en condiciones normales. Este aporte luego llevó a la aparición del término “mucosa transicional”, siendo usado para referirse al tejido próximo a tumores colorrectales (usualmente Adenocarcinomas) que poseían anomalías neoplásicas o pre-neoplásicas. Se aceptó también que la extensión de esta zona de transición era de aproximadamente 2 cm en la mayoría de los casos (Burdette, 1970; Riddell y Levin., 1977).

A pesar que la extracción de los tumores rectales principales trajo resultados favorables para los pacientes, el problema de la recurrencia local todavía era un factor a tomar en cuenta. Estudios realizados poco después de la postulación de Burdette mostraron que de la totalidad de pacientes a los cuales se les extrajo el tumor principal, 37% presentaban recurrencia local con o sin metástasis, por tanto, la investigación de las posibles causas de este fenómeno se convirtió en una prioridad (Cass y col., 1976).

Al estudiar a profundidad la invasión local presente en pacientes con cáncer de recto, se reveló que el grado de penetración del tumor a través del tejido sano tiene gran valor en la estadificación y el pronóstico del paciente. A pesar de este descubrimiento, los márgenes distales o laterales (que en ese tiempo tendían a una longitud máxima de 3 cm) no mostraron tener correlación con la probabilidad de recurrencia (Caffarey y Cawthorn., 1990).

Mediante observaciones histológicas, se encontró que la forma en que el tejido neoplásico en cáncer de recto se esparce *in situ* (invasión local), es tanto en forma continua como discontinua, de manera que, entre 2 zonas alteradas con presencia de células tumorales pueden existir espacios de tejido normal. Este hecho, en conjunto con la posible presencia de tejido que aparenta ser histológicamente normal, causa que con el tiempo fuera necesaria la modificación de la distancia recomendada entre el tumor principal y el margen distal en las resecciones de tumores colorrectales, por lo que la distancia hacia el punto de corte distal fue aumentando a medida que esto llevó a mejores resultados para los pacientes (de 1 cm o menos, a recomendarse 5 cm en casos graves) (Bujko y col., 2006).

En Venezuela, varios autores lograron observar anomalías ultraestructurales puntuales en tejidos tumorales y peritumorales mediante el uso de microscopía electrónica de transmisión (MET), tanto en tumores gástricos, como de otras clasificaciones y tejidos, tales como: Adenocarcinomas de próstata y Fibrohistiocitomas malignos. Esos estudios reportaron alteraciones organelares: Edematización mitocondrial, invaginaciones de la envoltura nuclear, dilatación de las cisternas de retículo endoplasmático rugoso, pérdida de cuerpos densos en la musculatura lisa, entre otros (Finol y col., 1994; Tonino y col., 1996; Finol y col., 2003).

El estudio de las alteraciones ultraestructurales peritumorales en presencia de Adenocarcinomas colorrectales en pacientes tratados con quimioterapia (Q) y radioterapia (R), reportó la presencia de alteraciones a nivel de fibras nerviosas amielínicas, musculatura lisa y microvasculatura que se mantenían hasta el cuarto centímetro de distancia al tumor en secciones resecaadas de intestino (Sierra, 2009).

En los últimos 10 años, nuevos estudios del microambiente tumoral en cáncer han resultando en la propuesta de nuevos parámetros evaluables mediante el uso de microscopía, con posible valor para el pronóstico del paciente. La densidad de macrófagos asociados al tumor, la proporción de linfocitos presentes en el borde del tejido tumoral, los cambios en la microvasculatura peritumoral, edematización mitocondrial, entre otros, son elementos considerados por su aparente asociación y/o influencia sobre el desarrollo del proceso neoplásico. Ello permite de esta manera el obtener una mayor cantidad de información a través de observaciones morfológicas (Solinas y col., 2009; Henry y col., 2012; Grizzi y col., 2013).

En un análisis comparativo de la variedad y frecuencia de aparición de anomalías ultraestructurales entre pacientes tratados y no tratados con R y Q se pudo observar que en las áreas peritumorales a Adenocarcinomas rectales no parece haber una relación directa entre el tratamiento y alteraciones subcelulares, indicando de esta forma que deben ser resultado de la presencia del tumor. Se hizo hincapié también en la observación de que no todos los tejidos alterados fueron inicialmente considerados como invadidos. De esta forma se sugiere que la influencia del tumor principal sobre las células circundantes no solo viene dada por la invasión local y que los factores liberados por éste también deben ser tomados en cuenta (Sierra y col., 2013).

OBJETIVOS

Objetivo general

- Describir las alteraciones patológicas en el tumor y regiones peritumorales en pacientes tratados con quimioterapia y radioterapia afectados por Adenocarcinomas de recto.

Objetivos específicos

- Identificar las alteraciones ultraestructurales e histológicas presentes en las células epiteliales y microvasculatura en el tumor de pacientes tratados con quimioterapia y radioterapia afectados por Adenocarcinomas de recto medio y bajo.
- Examinar las alteraciones ultraestructurales e histológicas presentes en musculatura lisa, epitelio, tejido conectivo y microvasculatura en las regiones peritumorales de pacientes tratados con quimioterapia y radioterapia diagnosticados con ADC de recto medio y bajo.
- Evaluar la posible presencia de procesos apoptóticos, necróticos y de autofagia en las áreas tumorales y peritumorales.

MATERIALES Y METODOS

Material biológico

El presente trabajo fue realizado usando muestras de intestino provenientes de pacientes diagnosticados con Adenocarcinoma de recto en la unidad de coloproctología del Hospital Universitario de Caracas, entre quienes, existían individuos tratados y no tratados con quimioterapia y radioterapia previamente a su intervención quirúrgica.

El grupo de pacientes de los cuales se tomaron las muestras se encontraba compuesto de la siguiente forma:

- Pacientes tratados: 3 masculinos (♂) y 3 femeninos (♀) con edades entre los 41 a 65 años.
- Pacientes no tratados: 2 masculinos (♂) y 2 femeninos (♀) con edades entre los 40 a 67 años.

Las muestras fueron recolectadas en el momento en que los pacientes se sometieron a una cirugía dirigida a la extracción de una sección del intestino, realizada por el Dr. Carlos Sardiñas.

La elaboración de este proyecto contó con el debido consentimiento informado de los pacientes (Ver anexo).

Diseño experimental

Luego de la recolección de muestras del tumor y áreas próximas al mismo, se seleccionaron pequeñas zonas localizadas a distintas distancias del mismo. A continuación las muestras fueron procesadas para su observación en los microscopios: electrónico de transmisión y de luz.

Procesamiento de muestras

El procesamiento de muestras biológicas consistió en: fijación, lavado, deshidratación, infiltración, inclusión, corte y contrastación.

Fijación

En la microscopía electrónica de transmisión se necesitan procedimientos de fijación veloces y cuidadosos, a objeto de obtener una imagen de las estructuras celulares lo más próxima posible a como se deberían ver *in vivo*. La solución fijadora a usar debe aplicarse y actuar con rapidez para evitar la degradación del tejido, en adición, debe ser capaz de penetrar el tejido completamente de manera que pueda interactuar con todas las estructuras de este (Welsch y Sobotta, 2009).

El protocolo de fijación empleado en el Centro de Microscopía Electrónica consiste en el uso del fijador Karnovsky (Karnovsky, 1965). Este se encuentra compuesto de 50% de tampón fosfato Millonig (Millonig, 1961) a un pH de 7,4 y una osmolaridad de 320 mOsm, 10% de glutaraldehído al 25%, 0,054% de Formaldehído al 37% y 0,34% de agua destilada. El tampón utilizado posee una osmolaridad mayor que la del plasma sanguíneo de los mamíferos, para evitar que la solución que alcance las zonas más profundas de la muestra se encuentre muy diluida, ocasionando daños por hipotonicidad (Arborgh y col., 1976). El glutaraldehído y el formaldehído como agentes fijadores logran penetrar en la célula. El glutaraldehído en forma de monómero actúa rápido sobre los grupos amino de las proteínas, sin embargo, en la mayoría de las soluciones existe una significativa proporción de polímeros cortos de esta molécula.

Su estructura molecular le permite reaccionar con los grupos amino de las proteínas mediante una hidrólisis que puede ocurrir en cualquiera de los 2 grupos aldehídos terminales de la molécula. Al reaccionar ambos grupos se crea un puente cruzado que impide que la proteína sufra cambios en su estructura terciaria. La presencia de oligómeros en la solución también facilita la formación de puentes de tamaño y flexibilidad variable. En el caso del Formaldehído la reacción de fijación también involucra la formación de puentes entre aminoácidos, sin embargo, la exposición a este fijador por un largo periodo de tiempo, puede afectar el sitio activo de las enzimas. Su uso en conjunto con

glutaraldehído se justifica por su habilidad de penetrar hacia el interior de los tejidos a mayor velocidad. El formaldehído por lo tanto no es el responsable de la fijación final (Bozzola y Russell, 1999; Kiernan, 2000).

Al extraerse la muestra del tejido, se procedió a sujetarla a una superficie de corcho donde es expuesta a la solución fijadora durante 5 minutos. El tejido luego fue cortado en trozos de 1mm x 2mm, que luego se sumergieron en fijador durante al menos 45 minutos a 4° C. A continuación, se procedió a lavar la muestra con tampón Millonig 3 veces con una duración de 1 minuto para cada lavado.

El siguiente paso es la post-fijación con una solución de tetraóxido de osmio (OsO_4) al 1% en tampón Millonig por un mínimo de 1 hora y un máximo de 4 horas, luego de que los trozos fueron lavados con agua destilada durante 15 minutos a 4° C. El post-fijador se dejó reaccionar con moléculas de lípido, ayudando a mantener intactos los contornos de la membrana plasmática, organelos, entre otros. Este compuesto penetra la célula lentamente y tiende a reaccionar rápidamente con los dobles enlaces etilénicos de las cadenas de carbono de los ácidos grasos insaturados (Porter y Kallman, 1952).

Deshidratación

En este proceso se busca sustituir toda el agua presente en la muestra por etanol, el cual permite realizar una mejor infiltración de la resina en la célula, la cual sirvió como medio de soporte, siendo ésta no miscible con el agua por su estructura hidrofóbica. La deshidratación consistió de una serie de cambios en soluciones de alcohol de concentración ascendente.

El tiempo de duración para cada cambio se mantuvo constante (5 minutos). Inicialmente la muestra se sumerge 2 veces en soluciones de etanol al 50% (para un total de 2 cambios de 5 minutos c/u), todo esto a una temperatura de 4° C. Para el siguiente paso se mantuvo la temperatura anterior y se realizó 1 solo cambio a etanol al 60%, continuando la deshidratación en una solución de etanol al 70%, siendo este paso el último que requiera

mantener a 4°C el material biológico. Los siguientes 3 cambios (1 en etanol al 95% y 2 en etanol al 100% respectivamente) se realizaron a temperatura ambiente, completando así un tiempo de deshidratación de 35 minutos.

Infiltración

Mediante el uso de óxido de propileno se removió el alcohol y se facilitó el ingreso de la resina a la célula. Este procedimiento también consta de una serie de cambios. Es de gran importancia mencionar que cada uno de éstos debe realizarse en un recipiente cerrado pues este reactivo se utilizará a temperatura ambiente y es altamente tóxico y volátil.

Primero se sumergió el material biológico deshidratado en óxido de propileno puro (se realizan 2 cambios de 15 minutos cada uno). Para la siguiente etapa se sumergió la muestra en una mezcla 1:1 de óxido de propileno y resina durante 30 minutos. Finalmente se realizaron 4 cambios de 30 minutos c/u en mezcla de resina pura.

Inclusión

Esto implicó el colocar la muestra en un molde, el cual se llenó con la mezcla de resina epóxica que polimeriza (se endurece) a altas temperaturas. Esta mezcla de resina sirvió como medio de soporte al momento de realizar cortes a la muestra. La resina utilizada en el laboratorio se compone de un 45% de EMBED-812 (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, Pennsylvania, USA), 30% de DDSA (2-Dodecenil succinato), 25% de NMA (Metil-5-Norborneno-2,3-Dicarboxil Anhidrato) y 2,5% de DMP-30 (2,4,6-Tri(Dimetilamina Metil Fenol)). El proceso completo de inclusión se lleva a cabo durante 48 horas a una temperatura de 60° C.

Corte y contraste

Los cortes finos (60-90 nm) se realizaron con una cuchilla de diamante acoplada a un ultramicrotomo Porter- Blum MT2-B. Los cortes fueron colocados sobre rejillas de cobre

cubiertas de colodión que sirven de soporte. Las secciones luego fueron contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo.

El mecanismo químico exacto mediante el cual actúan los contrastantes no está bien descrito. Se acepta que el uranilo interactúa con los grupos fosfato en los ácidos nucleicos y las proteínas, mientras que los iones de plomo se asocian a compuestos cargados negativamente, como los grupos sulfhidrilos de las proteínas. El uso conjunto de estos compuestos causa que las imágenes resultantes tengan mayor contraste.

El acetato de uranilo se aplicó sobre la rejilla en forma de una solución acuosa al 3% durante 35 minutos, luego de lo cual ésta se lavó con agua destilada y se deja a secar antes de proceder con el contrastado. La aplicación de citrato de plomo es similar a la del acetato, sin embargo, a la solución se le agregaron perlas de NaOH para mantener la solución desprovista de dióxido de carbono solubilizado, puesto que éste puede causar la precipitación del metal pesado (Bozzola y Russell, 1999).

Luego de la contrastación, las rejillas se lavaron nuevamente con agua destilada y se dejaron secar. Los cortes finalmente se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1011, con un voltaje de aceleración de 80 kV. El registro permanente se realizó en negativos de Kodak (8,3 x 10,2 cm; #4489).

Los cortes gruesos (1 μ m) se obtuvieron utilizando un ultramicrotomo Porter- Blum MT2-B. El medio de soporte utilizado fue un portaobjetos, el colorante empleado para teñir los cortes fue Azul de Toluidina, mientras que el montaje consiste en cubrir la muestra con medio de difracción DPX y un cubreobjetos. Finalmente, los cortes fueron observados bajo el microscopio de luz.

Análisis estadístico

En pro de facilitar el análisis de las distintas áreas tumorales y peritumorales a estudiar, se evaluaron 4 variables: Área mitocondrial (AM), área nuclear (AN), diámetro de las cisterna de retículo endoplasmático rugoso (GR) y grosor de membrana basal (GMB).

Diferentes técnicas de estadística descriptiva e inferencial se utilizaron para la apropiada caracterización del tejido en cuestión (graficas de distribución box-plot, ANOVA de una vía y ANOVA factorial).

En el caso de el ANOVA de una vía la variable independiente será el tratamiento, mientras que en el ANOVA factorial, se tomaran en consideración el tratamiento y la distancia al tumor como variables independientes.

Para la realización de los ANOVA, se han tomado en consideración una hipótesis nula (Las estructuras estudiadas son morfológicamente similares) y una alternativa (Las estructuras estudiadas no son morfológicamente similares)

El procesamiento de datos fue realizado utilizando el software STATISTICA (StatSoft, inc. 2007). El análisis del tumor y el tejido peritumoral se realizó por separado, con el fin de evitar que los valores alterados del tumor lleven a cometer un error de tipo 1.

Con el fin de obtener valores de referencia, se consultaron una serie de fuentes bibliográficas con información sobre la morfometría bajo condiciones normales de las distintas estructuras subcelulares medidas en este estudio. Estas fueron: (Electron microscopic atlas of tissues and organs in the internet., 1998; Schwerzmann y col., 1989; Yaffe, 1999; Karbowki y Youle., 2003; Ahlquist y col., 2000; Arai y Kino., 2008; Pierce y col., 1976; Rhodin, 1968)

RESULTADOS

Se tomaron muestras en el tumor (cm 0) y a diferentes distancias del mismo (cm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9), a estas les fueron realizados estudios histológicos y ultraestructurales.

Hallazgos histológicos en el tumor:

Entre los resultados obtenidos de la zona tumoral (cm 0) se encontró inicialmente que las capas de tejidos que componen el colon (Mucosa y Submucosa) no se encontraban bien definidas (Fig. 8), no era posible distinguir claramente entre estas, lo cual indica una pérdida en la arquitectura normal del tejido (Displasia), una característica muy común en tumores neoplásicos.

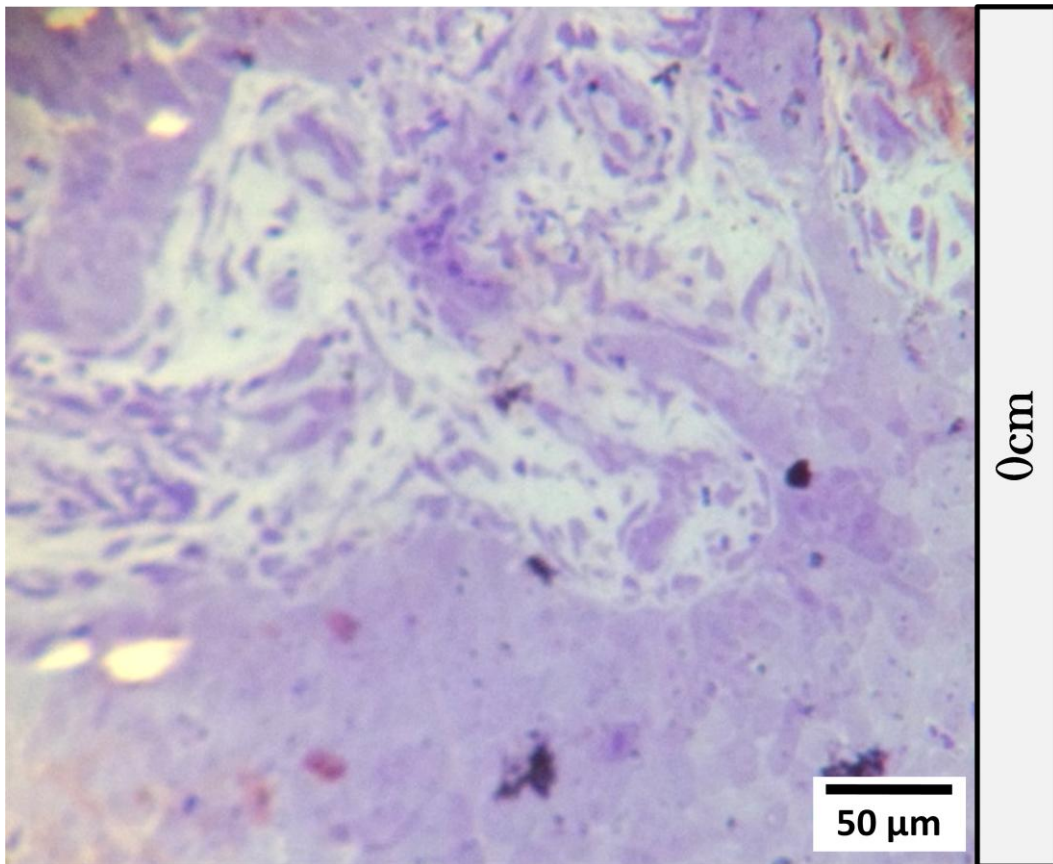


Figura 8. Corte transversal de la mucosa del colon en tumor de paciente tratado.

En adición a la alteración de la organización de los distintos tejidos del colon, se pudo observar también el incremento en el tamaño del núcleo en las células tumorales de pacientes tratados, así como evidencias de mitosis por la presencia de células con pérdida de envoltura nuclear, contenido genético condensado e hipercromático, algo que, al igual que la displasia, es muy común en tejidos afectados por el cáncer (Fig. 9).

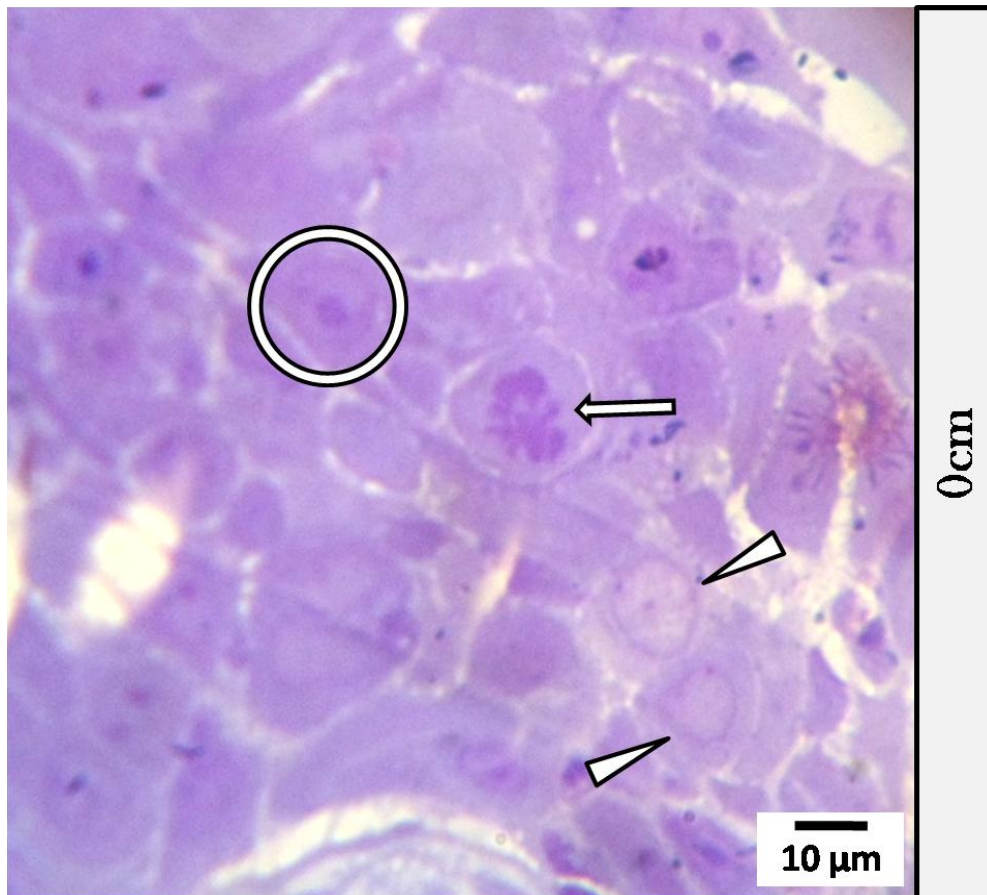


Figura 9. Corte transversal de la mucosa del colon en tumor de paciente tratado. Célula tumoral con material genético condensado (flecha blanca). Células tumorales con núcleos de gran tamaño (triángulos y círculo).

Con relación al tejido sanguíneo fue posible encontrar evidencias de un proceso inflamatorio, por la presencia de neutrofilos en el torrente sanguíneo tanto en pacientes tratados (Fig. 11) como en los no tratados (Fig. 10), en el caso de pacientes no tratados, se encontraron nuevamente evidencias de mitosis en el tejido.

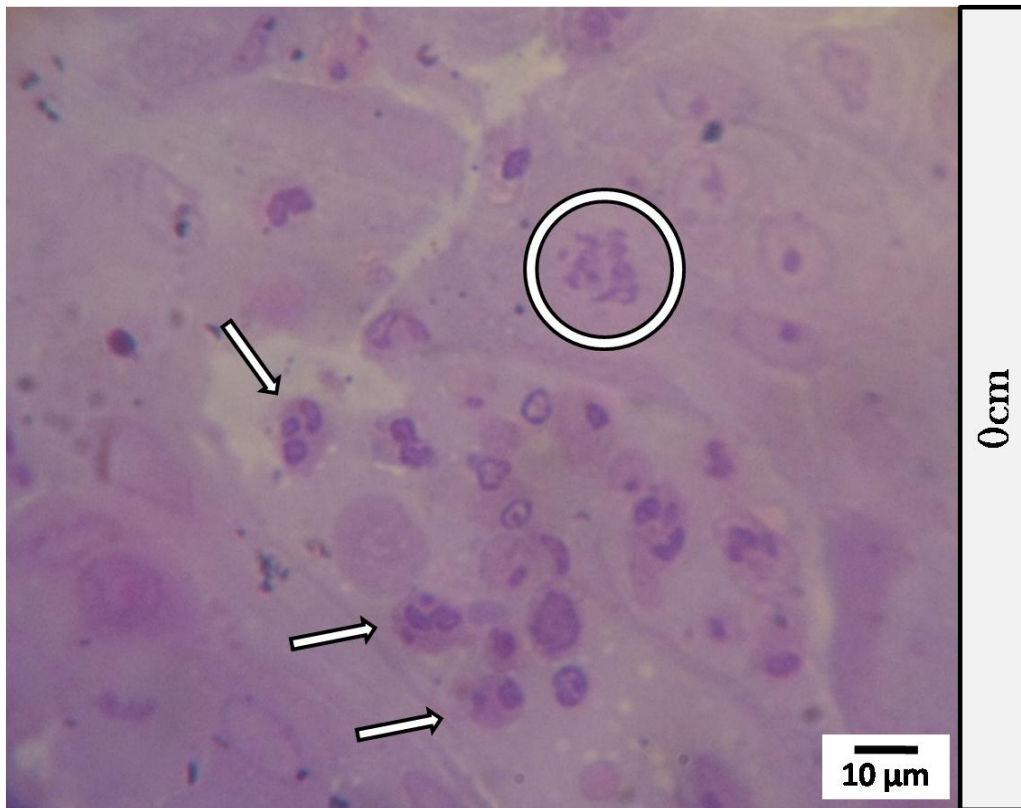


Figura 10 Corte transversal de la mucosa del colon en tumor de paciente no tratado. Neutrofilos (flechas blancas). Célula tumoral en proceso de mitosis (circulo).

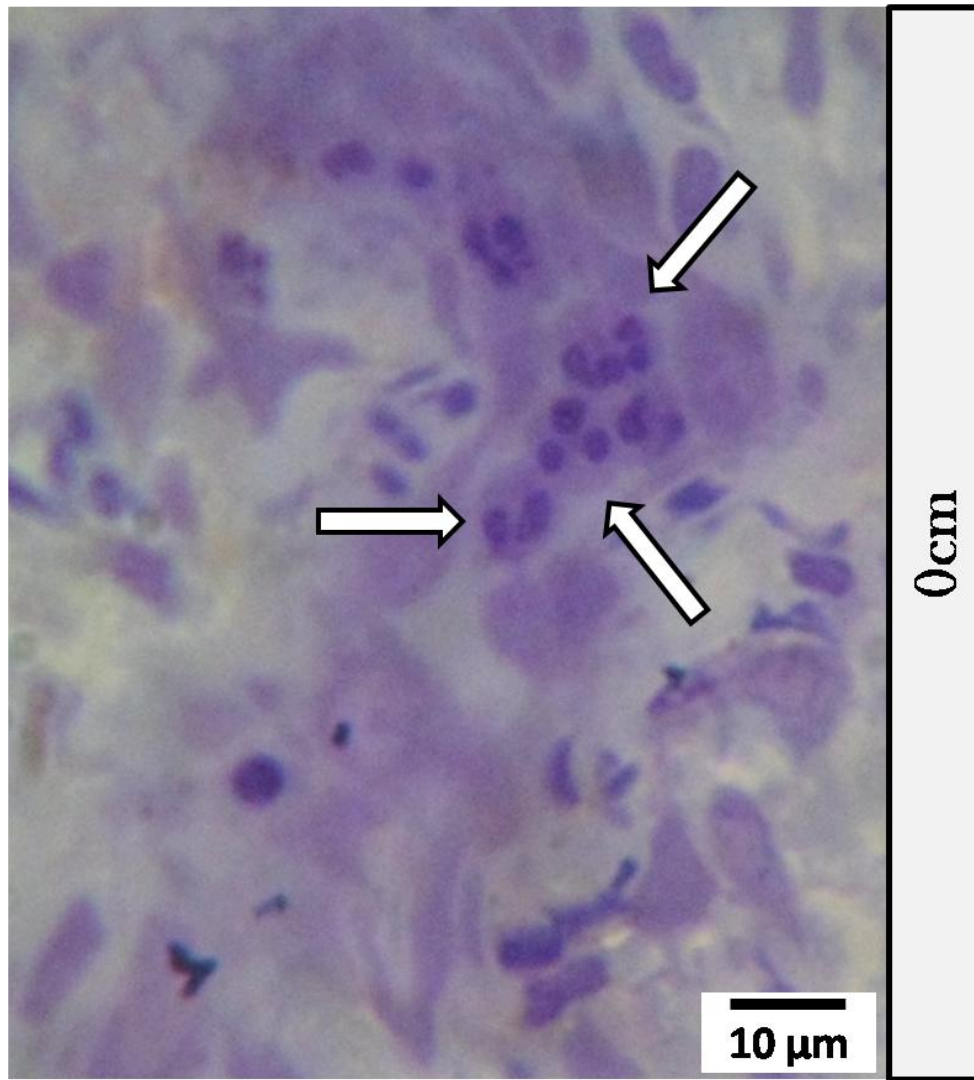


Figura 11. Corte transversal de capilar sanguíneo de la mucosa de colon en tumor de paciente tratado. Neutrofilos dentro de la luz de un capilar (flechas blancas).

El endotelio también presentó alteraciones en este nivel. Tanto en pacientes tratados (Fig. 12) como en los no tratados (Fig. 13) se encontró que las células endoteliales manifestaban un muy fuerte engrosamiento en su membrana basal (MB), la cual en la mayoría de los casos se observó heterogénea, es decir, en la periferia del vaso sanguíneo el grosor de la MB no se mantenía constante. Además de esto, en el caso de los pacientes no tratados se pudo ver que algunos de los capilares tenían luces anormales (Fig. 13).

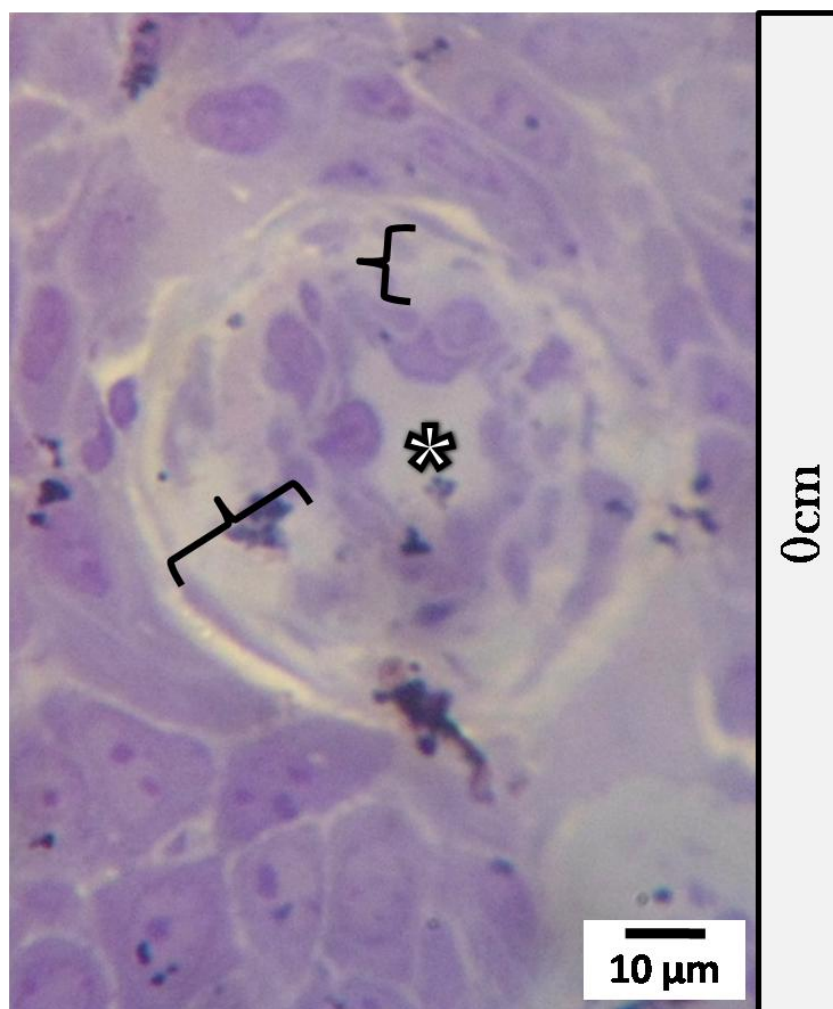


Figura 12. Corte transversal de capilar sanguíneo de la mucosa de colon en tumor de paciente tratado. Membrana basal engrosada (corcheta) y luz (asterisco).

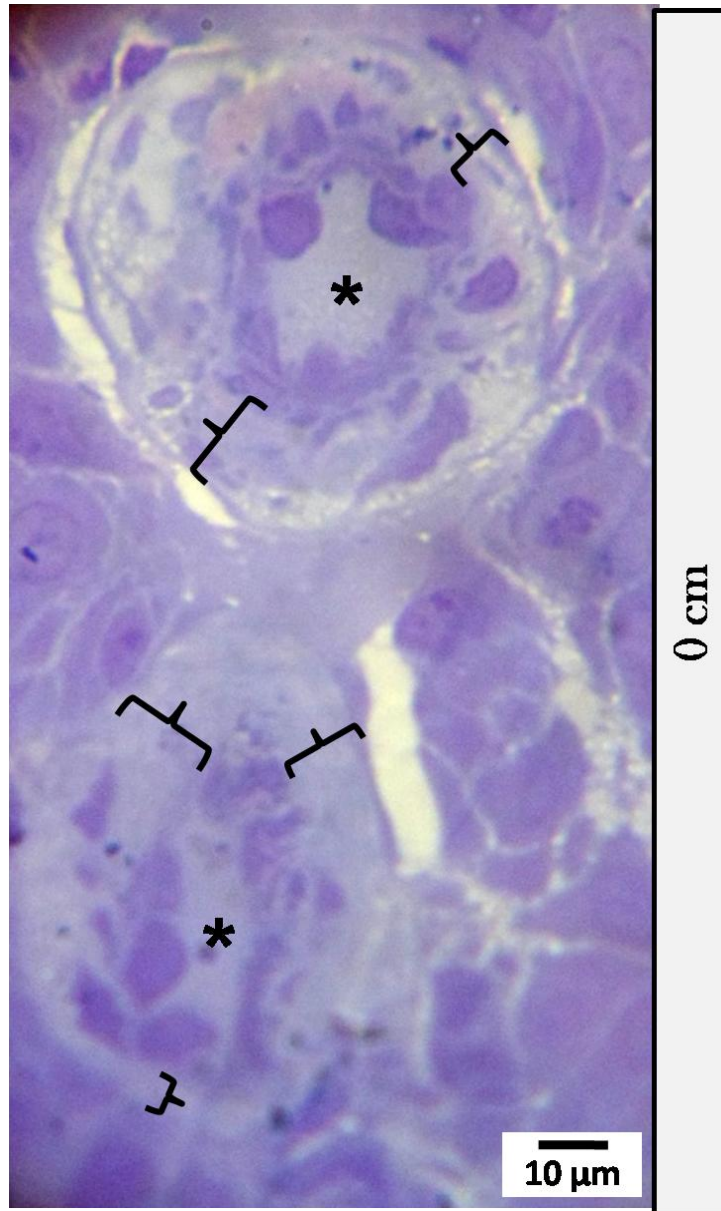


Figura 13. Corte transversal de capilares sanguíneos de la mucosa de colon en tumor de paciente no tratado. Membrana basal engrosada (corchetas). Luces irregulares (asteriscos).

Hallazgos ultraestructurales en el tumor.

La Ultraestructura del tejido reveló una gran cantidad de alteraciones que no fueron detectadas mediante microscopia de luz. Inicialmente se pudo detectar la presencia de distintos tipos de muerte celular. Tal es el caso en la mostrado Fig. 14, perteneciente al tejido tumoral de un paciente tratado con Q y R, en la cual se detectó un núcleo con condensación de la cromatina, ruptura de su envoltura (necrosis) y múltiples invaginaciones, el cual se encontró adyacente a un cuerpo apoptótico.

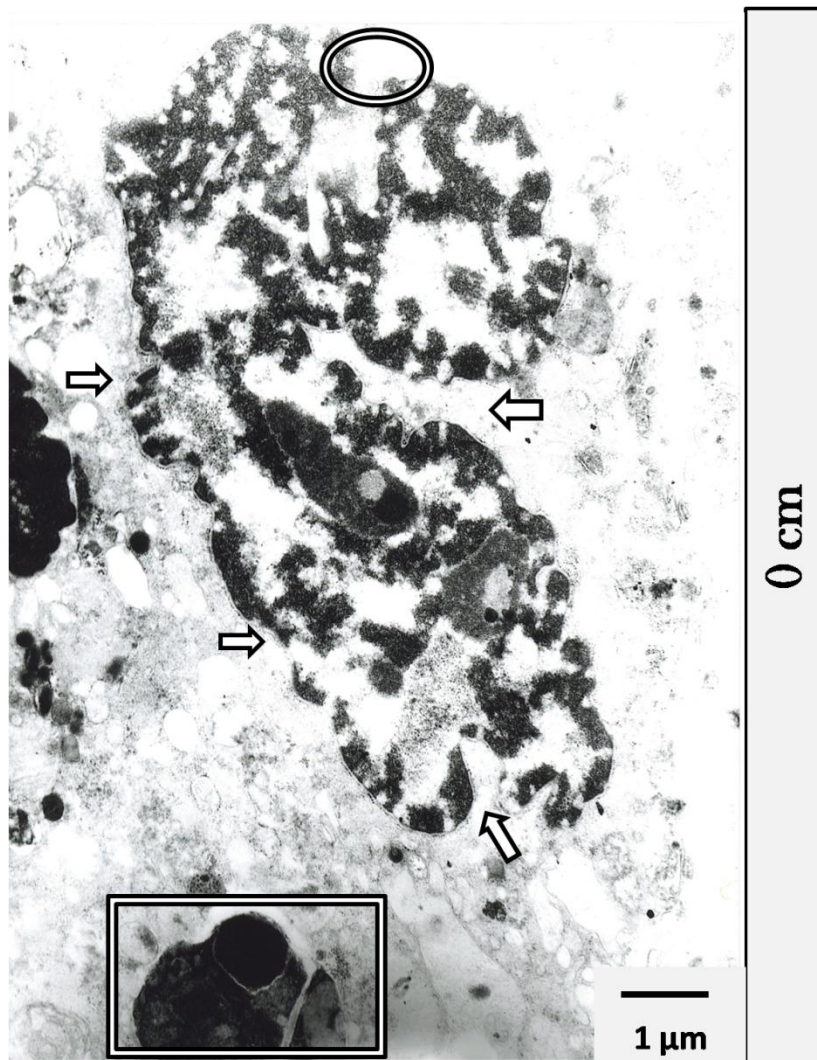


Figura 14. Micrografía de células epiteliales de la mucosa en tumor de colon de paciente tratado: Invaginaciones nucleares de diversas profundidades (flechas), ruptura de la envoltura nuclear (óvalo). Cuerpo apoptótico (rectángulo).

En los pacientes no tratados también se pudieron observar evidencias de distintos tipos de muerte celular. En la Fig. 15, se encontraron cuerpos apoptóticos al igual que en la figura anterior, sin embargo, en este caso, se observaron también evidencias de la muerte celular de tipo 2 (autofagia), como autofagosomas de gran tamaño y variada complejidad. En adición a esto, se detectaron otras alteraciones sub-celulares como mitocondrias edematizadas, poca heterocromatina y retículo endoplasmático rugoso en distintos estados de dilatación.

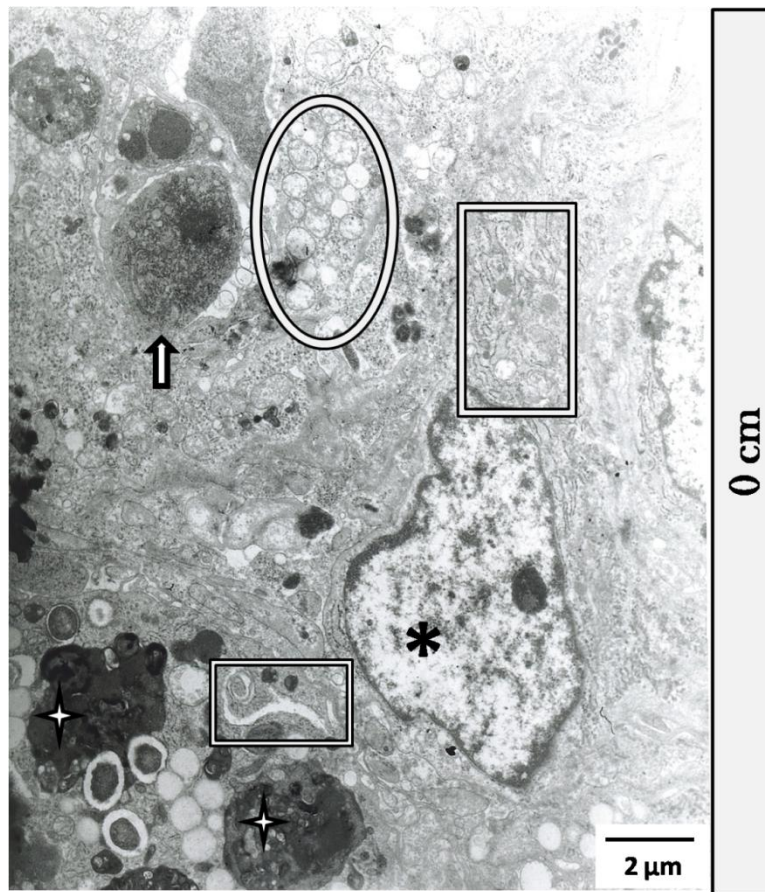


Figura 15. Micrografía de células epiteliales de la mucosa en tumor de colon de paciente sin tratamiento: Mitocondrias dilatadas (óvalo). Retículo endoplasmático rugoso (RER) dilatado (rectángulo). Irregularidad de la envoltura nuclear junto con poca cantidad de heterocromatina (asterisco). Autofagosomas de gran tamaño y complejidad variable (estrellas). Cuerpo apoptótico con estructuras sub-celulares aun discernibles en su interior (flecha).

El proceso autofágico fue encontrado en distintas muestras, no obstante, se observó solo en tumores de pacientes no tratados. En la Fig. 16 se ve un caso en el cual una célula epitelial manifiesta autofagosomas grandes y complejos mientras que al mismo tiempo exhibe mitocondrias alargadas organizadas en la periferia del núcleo, múltiples invaginaciones nucleares y un nucléolo no característico.

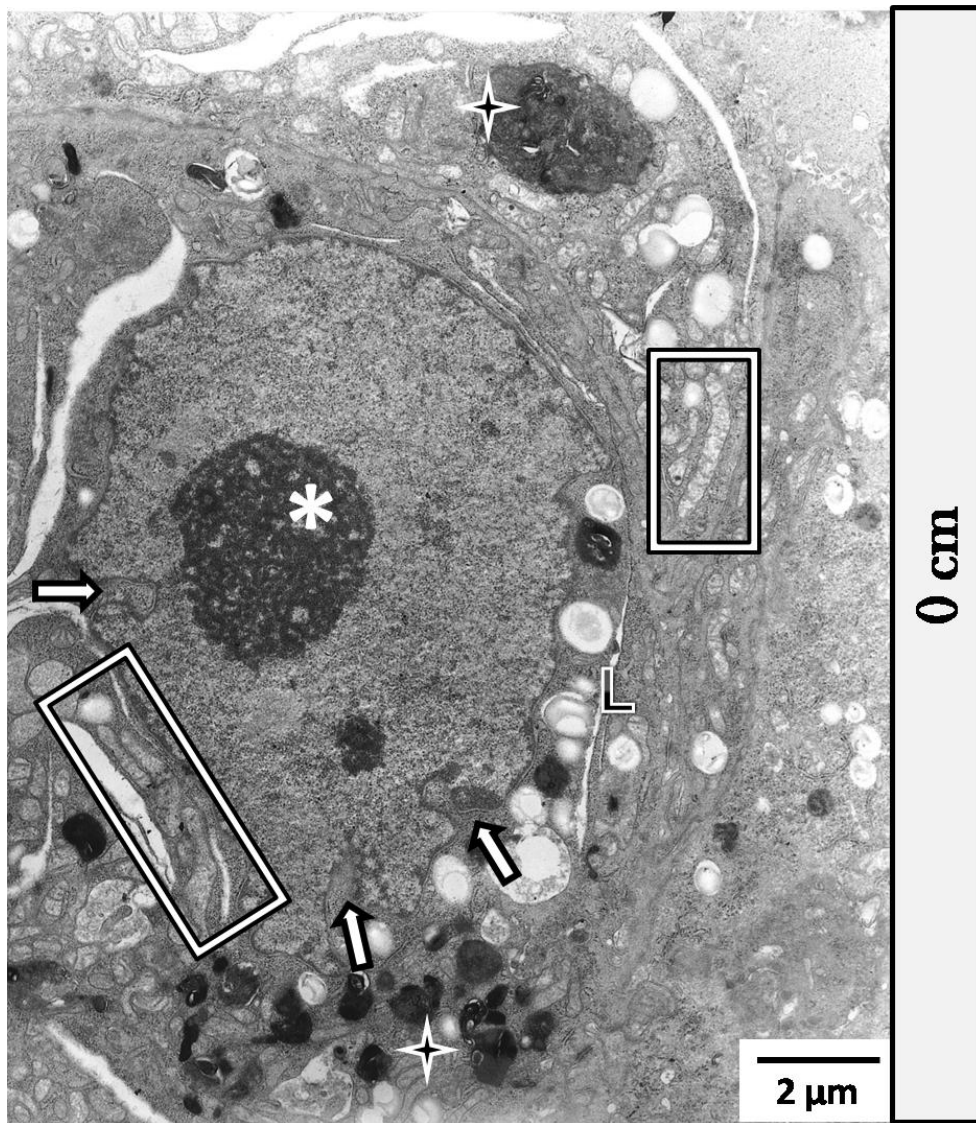


Figura 16. Micrografía de células epiteliales de la mucosa en tumor de colon de paciente sin tratamiento: Invaginaciones leves de la envoltura nuclear (flechas blancas). Nucléolo alterado (asterisco). Mitocondrias alargadas (rectángulos). Autofagosomas (estrellas).

En adición a la muerte celular, se detectaron alteraciones características de las células tumorales en proceso de transformación, como la pérdida de uniones intercelulares, como es el caso en las Fig. 17 y 18, en las cuales se observa la pérdida de uniones intercelulares entre las células epiteliales.

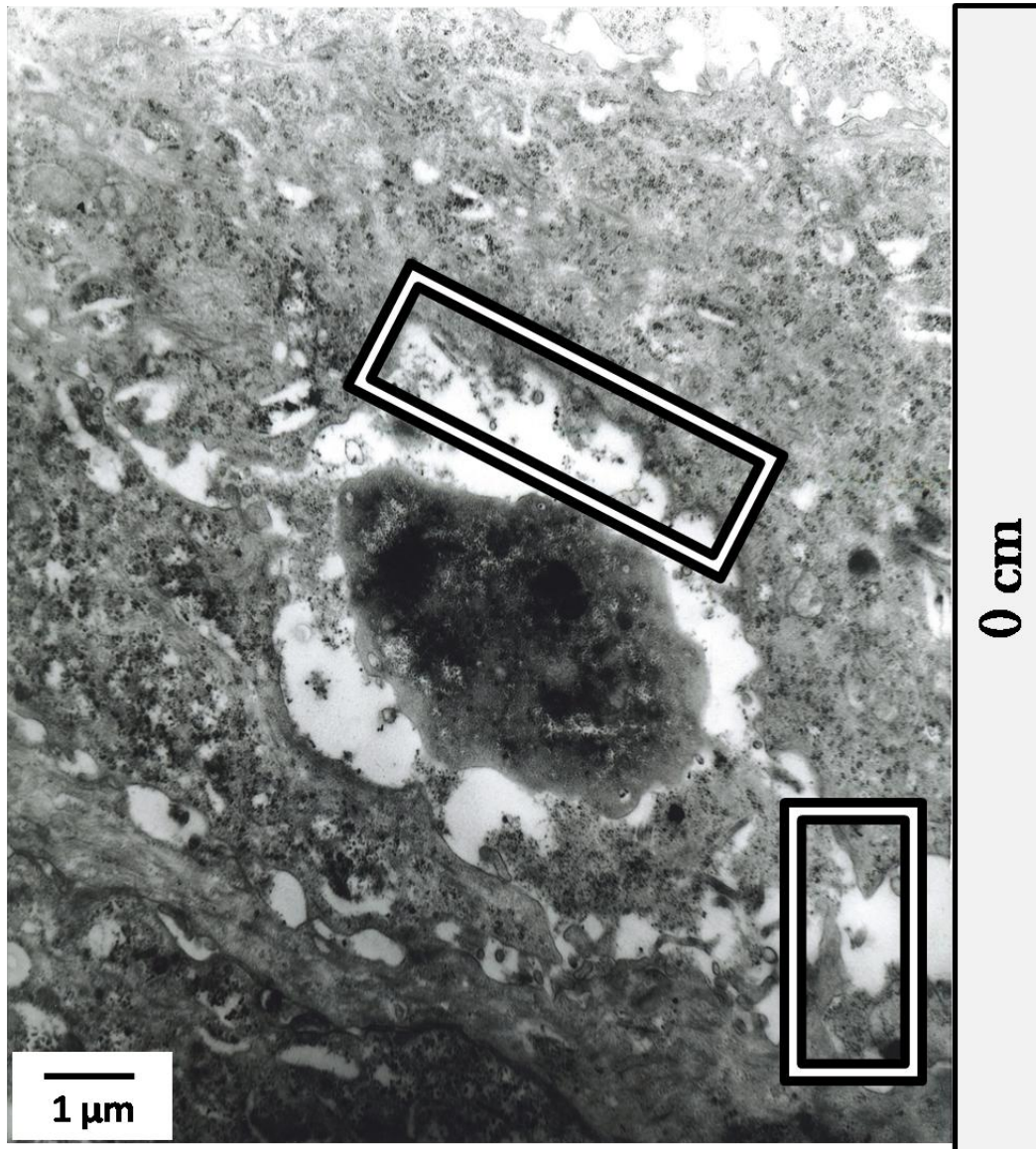


Figura 17. Micrografía de células epiteliales de la mucosa en tumor de colon de paciente tratado: Pérdida de las uniones intercelulares (rectángulos).

En la Fig. 18, además de la pérdida de uniones, también se pudieron observar varias alteraciones en los organelos como edematización de mitocondrias y dilatación de las cisternas de RER.

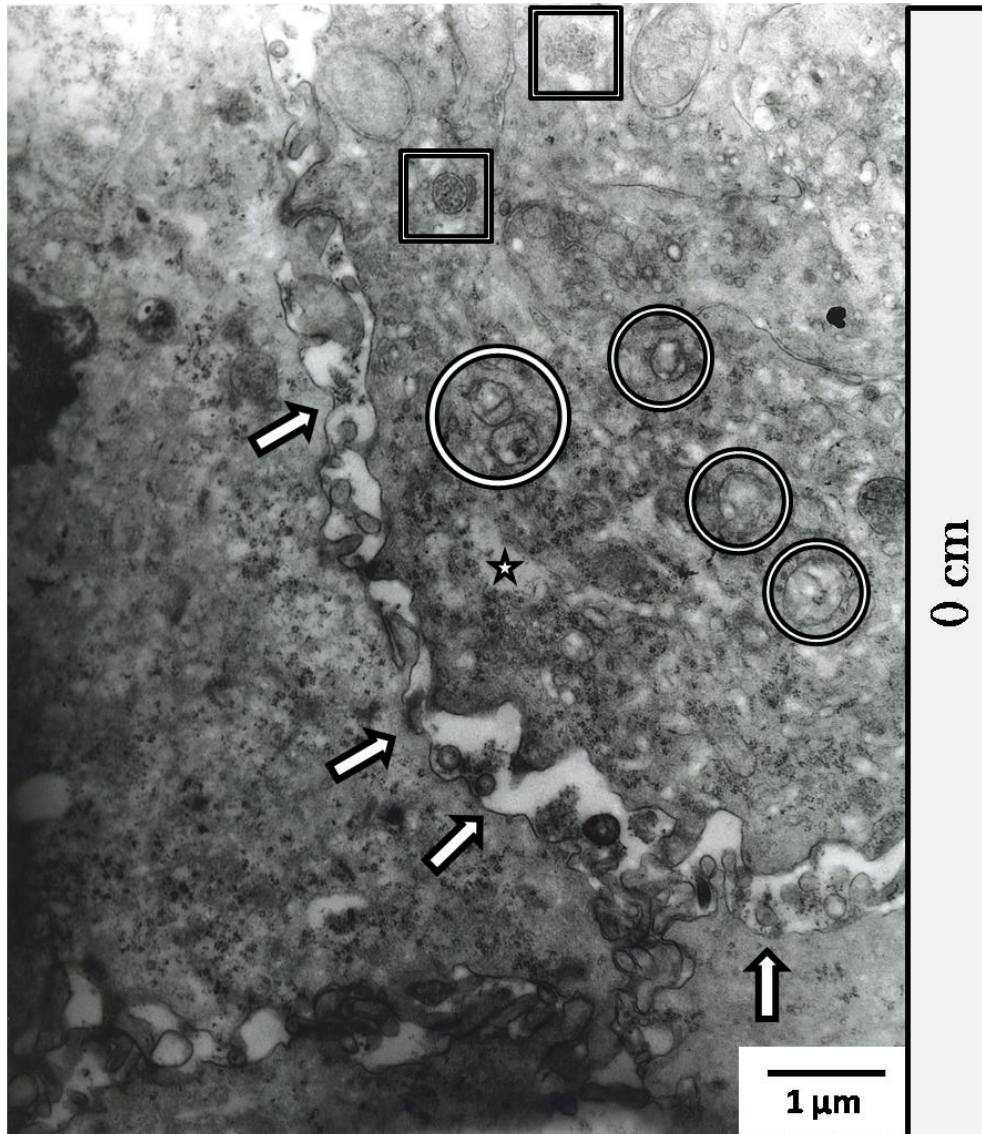


Figura 18. Micrografía de células epiteliales de la mucosa en tumor de colon de paciente sin tratamiento: Pérdida de uniones entre las células (flechas). Mitocondrias fuertemente edematizadas (círculos). RER muy engrosado (estrella). Cuerpos multivesiculares (cuadrados).

También se encontró células desdiferenciadas y con múltiples alteraciones organelares, lo cual es algo muy común en tejidos tumorales. En la Fig. 19 se ve un ejemplo de estas

células, también se ve en la misma imagen un Neutrofilo en mitad de su desgranulacion. En la célula desdiferenciada se ven diversas alteraciones organelares.

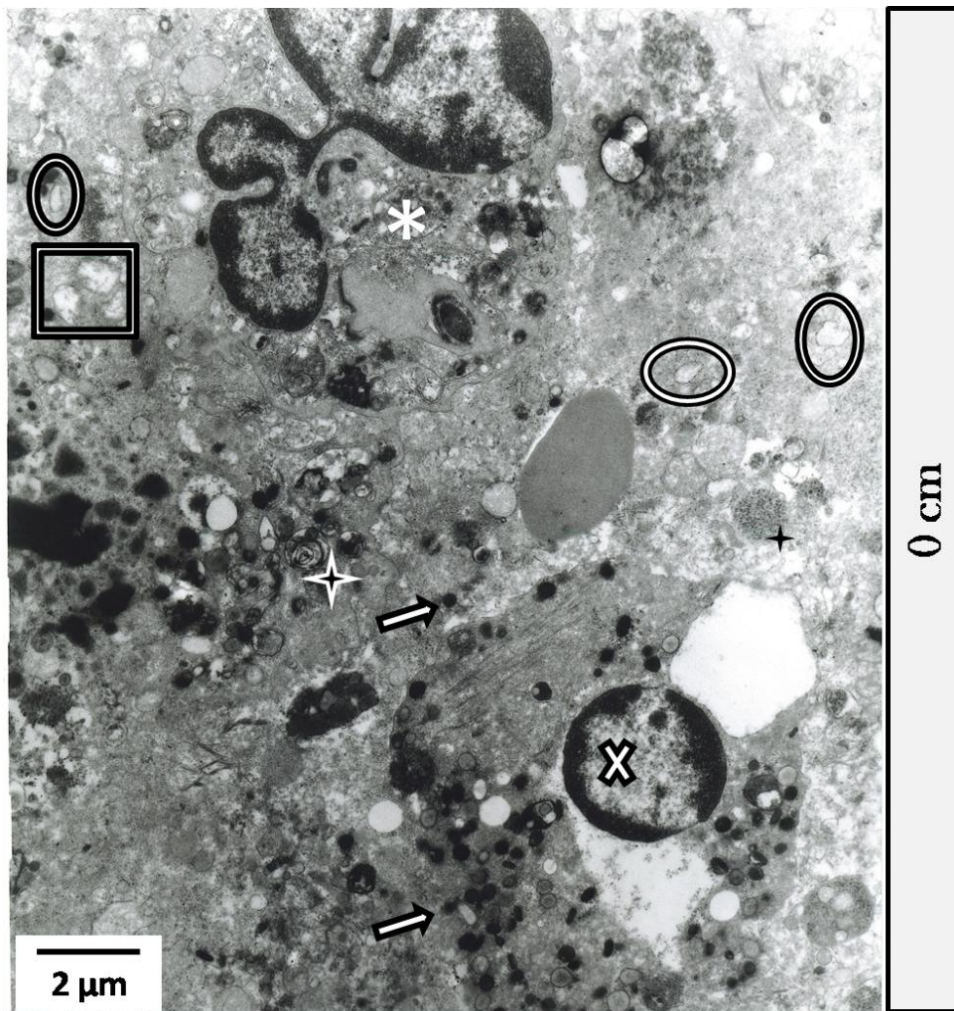


Figura 19. Micrografía donde se presenta una célula desdiferenciada y un neutrófilo en tumor del colon de un paciente sin tratamiento: Neutrófilo (equis). Célula con pérdida total de diferenciación y núcleo con ejemplos extremos de invaginación de su envoltura (asterisco). Edematización mitocondrial (cuadrado). Dilatación de las cisternas de RER (óvalos). Gránulos del neutrófilo en el medio extracelular (flechas blancas). Vacuolas autofágicas (estrella blanca).

El tejido muscular liso también se vio afectado. En la Fig. 20 se ven 2 ejemplos de las anomalías en estas células. La Fig. 20 A muestra una célula muscular lisa con engrosamiento heterogéneo de su membrana basal y gran cantidad de glucógeno, en esta no

se observan los cuerpos electron-densos correspondientes al aparato contractil, indicando una posible atrofia. La Fig. 20 B presentó mitocondrias edematizadas en asociación con RER.

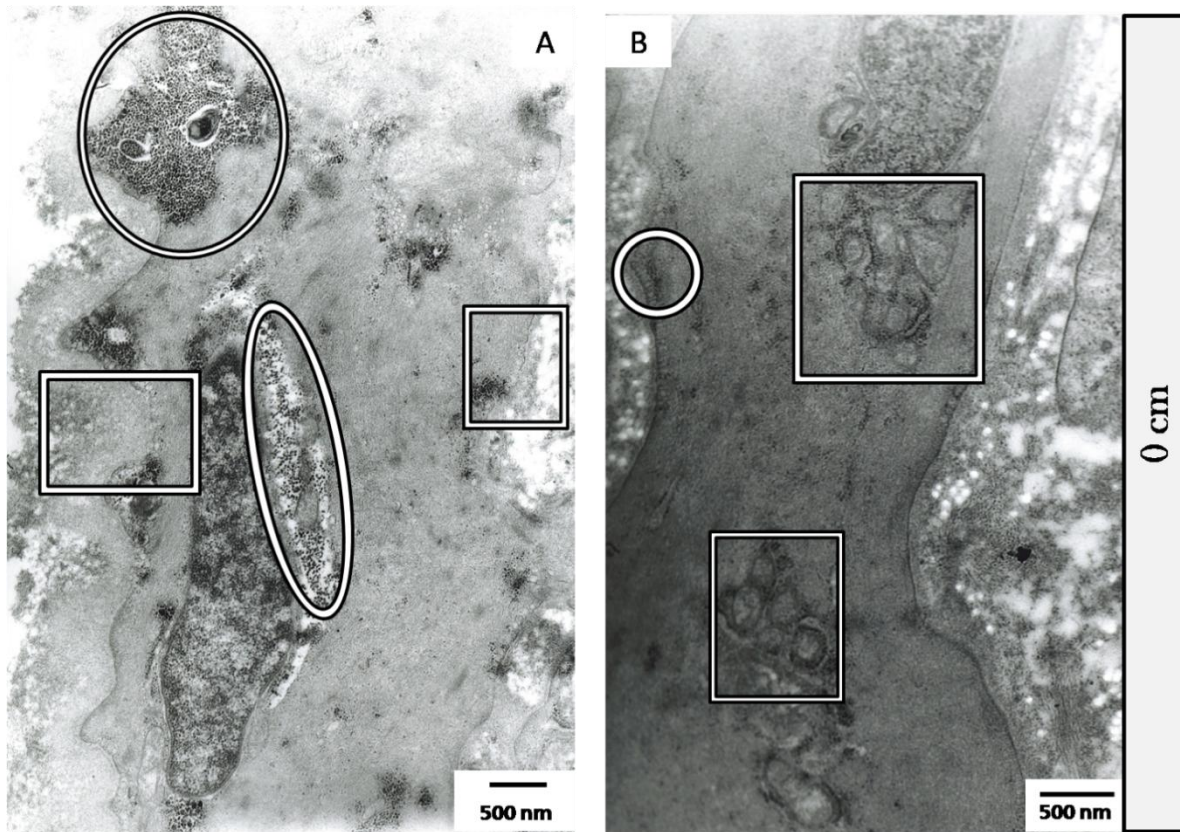


Figura 20. Micrografías de células musculares lisas en tumor de colon de paciente tratado: A) Engrosamiento de la membrana basal (rectángulos). Gran cantidad de glucógeno (óvalos). No se observan placas densas. **B)** Mitocondrias ligeramente dilatadas, rodeadas en algunos casos de RER (cuadrados). Placas densas (circulo).

Finalmente, en el endotelio también se encontraron anomalías ultraestructurales, en la Fig.21 se observa un vaso sanguíneo en el cual se encuentra una fuerte dilatación del citoplasma, ausencia de caveolas y múltiples cisternas de RER dilatado.

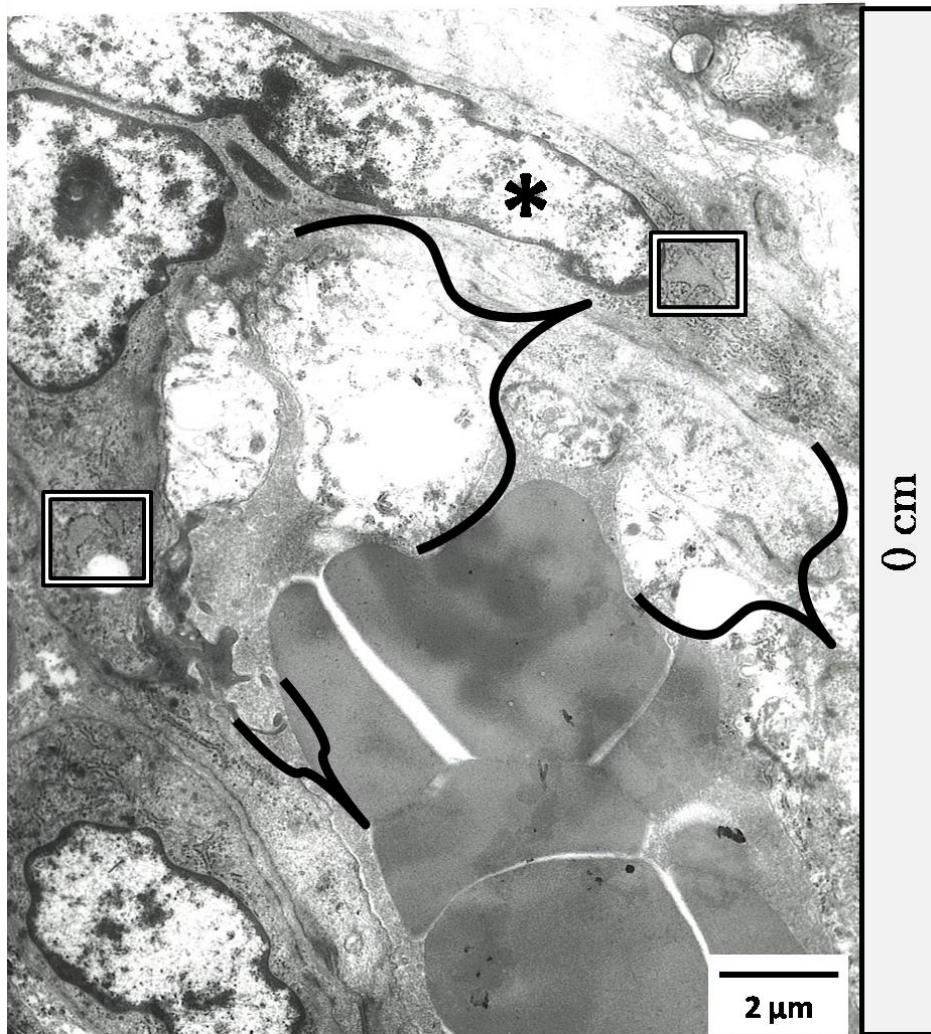


Figura 21. Micrografía de capilar sanguíneo en tumor de colon de paciente sin tratamiento: Fuerte engrosamiento del citoplasma endotelial (llaves). En el pericito (asterisco) se encuentran cisternas de RER con significativa dilatación (rectángulos).

Hallazgos histológicos en la región peritumoral (1 cm):

Tanto en pacientes tratados (Fig. 22) como en pacientes no tratados (Fig. 23), a un cm del borde tumoral no se observaron alteraciones desde el punto de vista histológico. Las glándulas de Lieberkuhn presentaron una morfología normal, con luces bien definidas y células caliciformes abundantes, típico de esta región del intestino. En la Fig. 23 se pueden observar infiltrados celulares muy comunes para este tejido (plasmocitos).

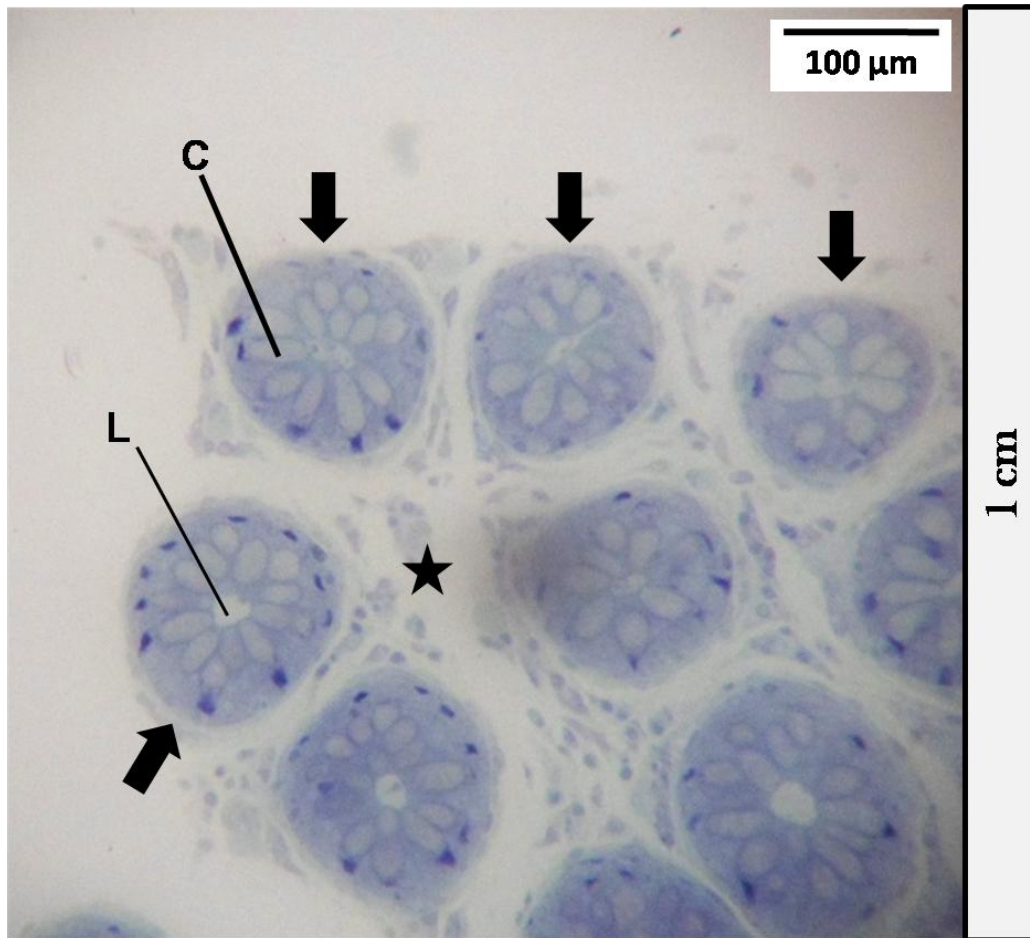


Figura 22. Corte transversal de glándulas de Lieberkuhn de la mucosa del colon a 1 cm del borde tumoral de paciente tratado. Elemento glandular (flechas negras). Tejido conectivo (estrella). Células caliciformes (C). Luces de las glándulas (L).

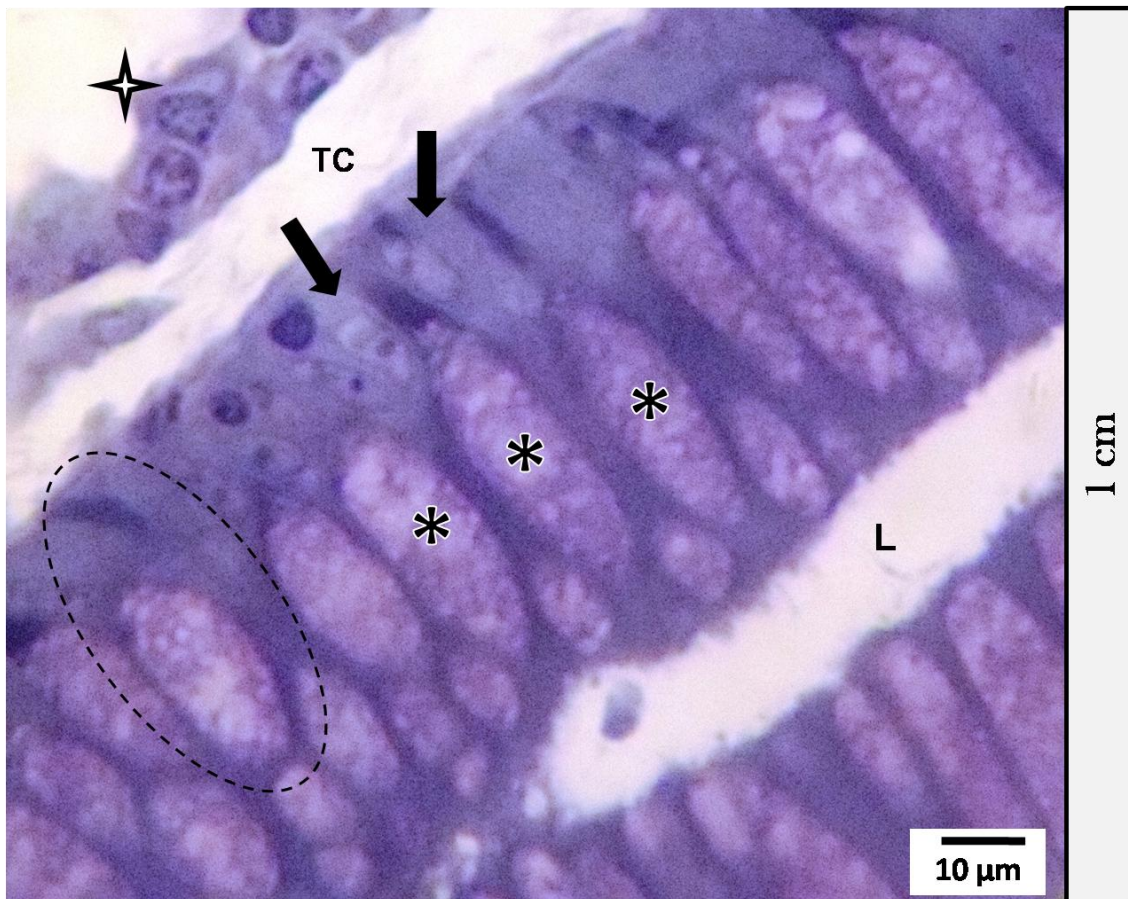


Figura 23. Corte longitudinal de glándula de Lieberkuhn de la mucosa del colon a 1 cm del borde tumoral de paciente no tratado. Luz de la glándula (L). Células caliciformes (ovalo). Núcleos (flechas negras). Moco/Mucina (asteriscos). Tejido conectivo (TC). Plasmocitos (estrella).

A esta distancia del tumor se encontraron evidencias de un proceso inflamatorio cercano por la presencia de células inflamatorias (neutrofilos) en el torrente sanguíneo, algunas de las cuales se observaron asociadas a la pared interna del capilar.

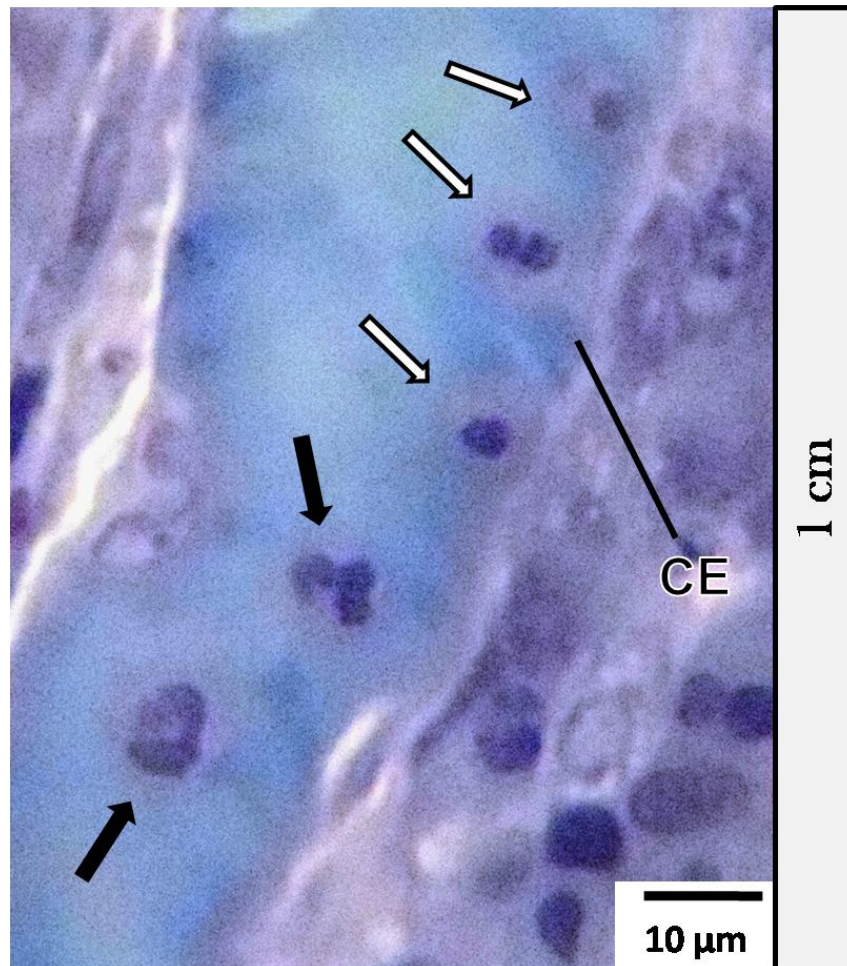


Figura 24. Corte longitudinal de capilar sanguíneo de la mucosa de colon a 1 cm del borde tumoral de un paciente no tratado. Cubierta endotelial (CE). Neutrofilos (flechas) dentro del vaso, algunos fluyendo libremente por el torrente sanguíneo (flechas negras) y otros asociados a la cara interna del vaso (flechas blancas).

En la Fig. 25 puede observarse que a nivel de la mucosa aún es posible observar evidencias de mitosis, un proceso muy común en este tejido, nuevamente en esta imagen se muestra una glándula en condiciones normales con luz y células caliciformes bien diferenciadas.

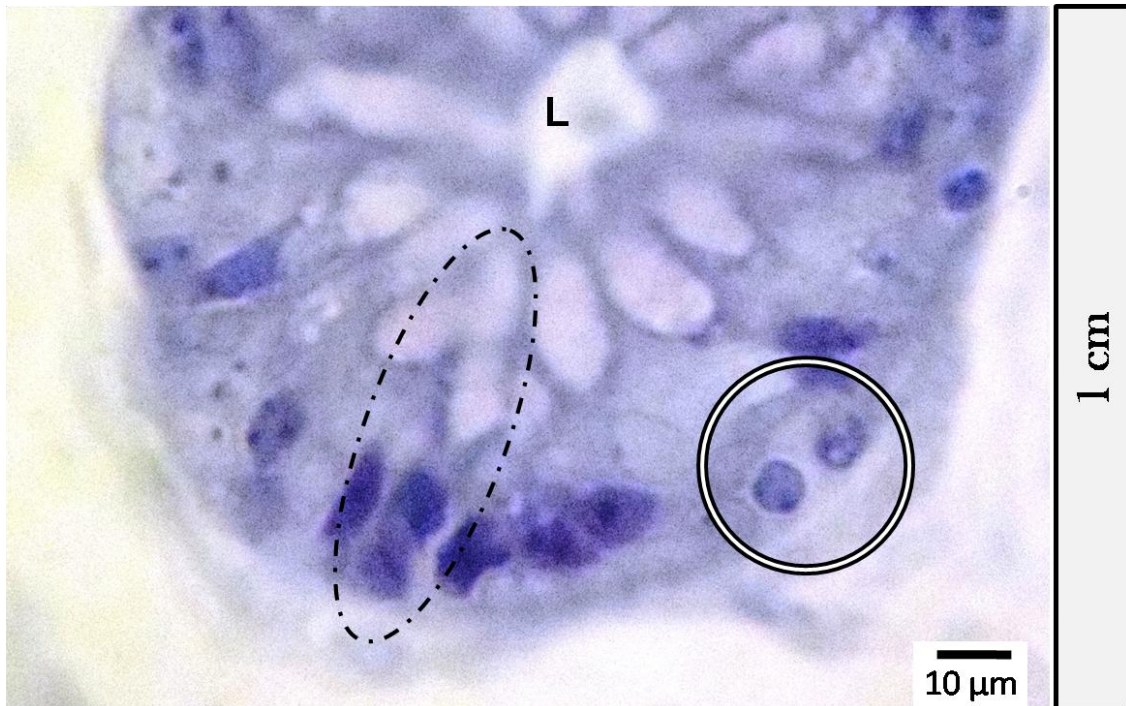


Figura 25. Corte transversal de glándula de Lieberkuhn de la mucosa del colon a 1 cm del borde tumoral de paciente tratado. Caliciformes (ovalo). Luz de la glándula (L). Célula en proceso de mitosis (círculo).

Hallazgos ultraestructurales en la región peritumoral (1 cm):

Al evaluar la ultraestructura de los tejidos a 1 cm del borde tumoral se encontraron evidencias de un posible proceso de invasión por parte de las células malignas del tumor en pacientes no tratados. En las Fig. 26 y 27 se pueden observar ejemplos de lo mencionado por la presencia de células totalmente desdiferenciadas, no asociadas a otras células y con

variadas alteraciones en los mitocondrias, envoltura nuclear y RER. Vale la pena mencionar que en ambos casos presentados, las células desdiferenciadas se encontraron alineadas en una sola fila.

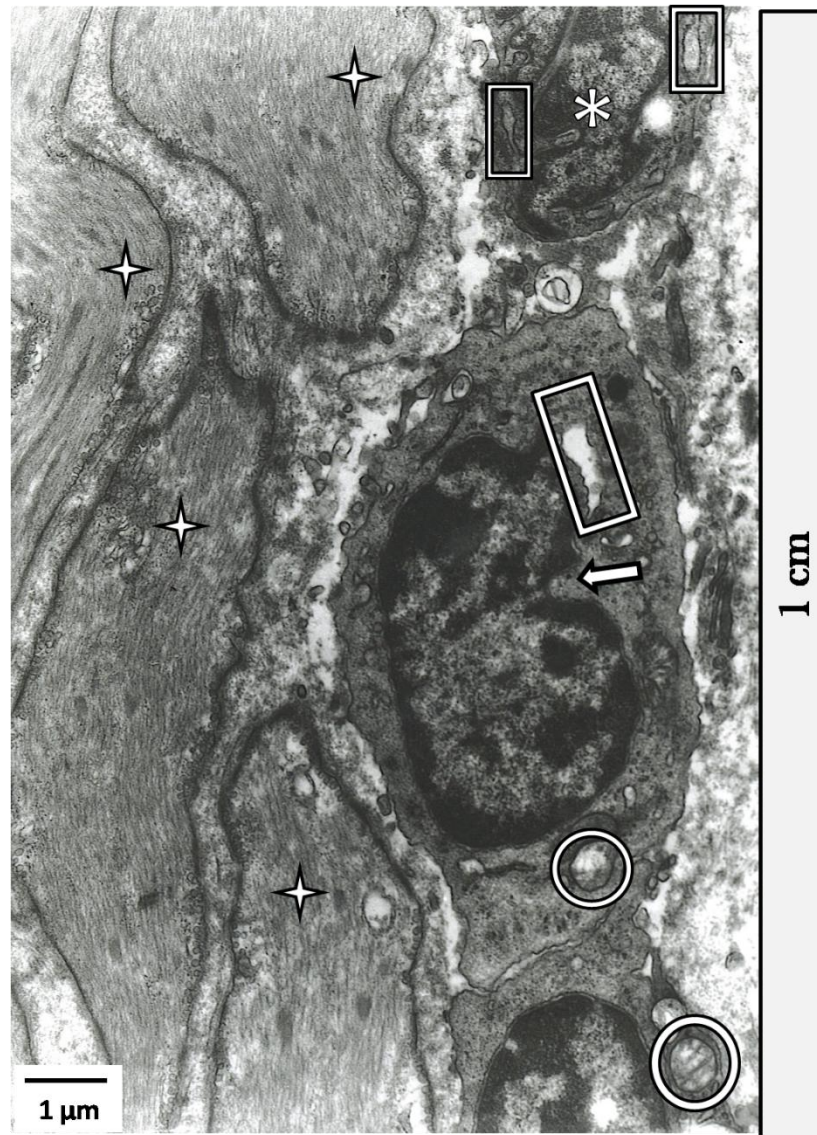


Figura 26. Micrografía de células musculares lisas y células desdiferenciadas en la mucosa de colon a 1 cm del borde tumoral de paciente no tratado: Células de musculatura lisa (estrellas blancas). RER dilatado de células desdiferenciadas (rectángulo). Invaginaciones nucleares (flecha blanca). Mitocondrias edematizadas (círculos).

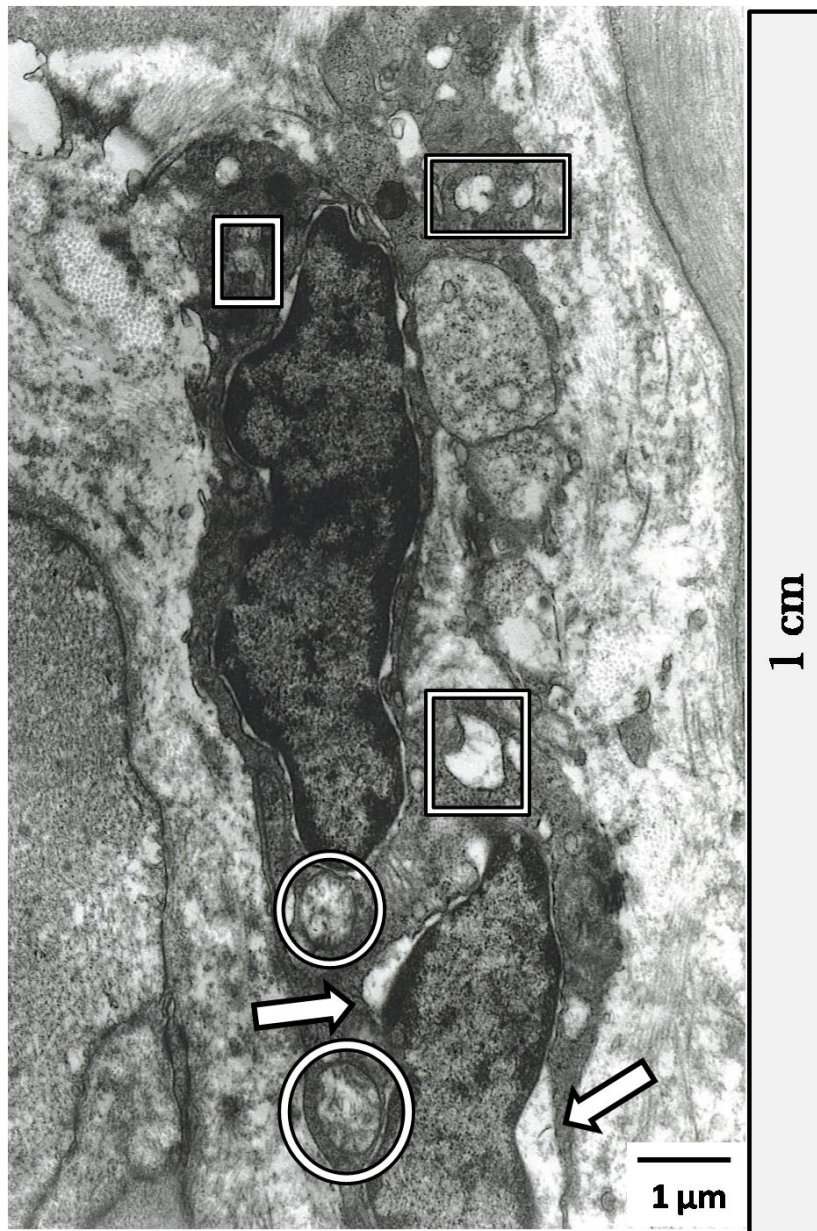


Figura 27 Micrografía de células desdiferenciadas en la mucosa de colon a 1 cm del borde tumoral de paciente no tratado: RER en diversos estados de dilatación (rectángulos). Mitochondrias hinchadas (círculos). Distensión de la envoltura nuclear (flechas).

El componente nervioso a esta distancia también se encontró alterado, en la Fig. 28 los terminales nerviosos amielinicos se observaron con baja cantidad de vesículas sinápticas, mitocondrias edematizadas y restos membranosos, indicadores de atrofia de la célula.

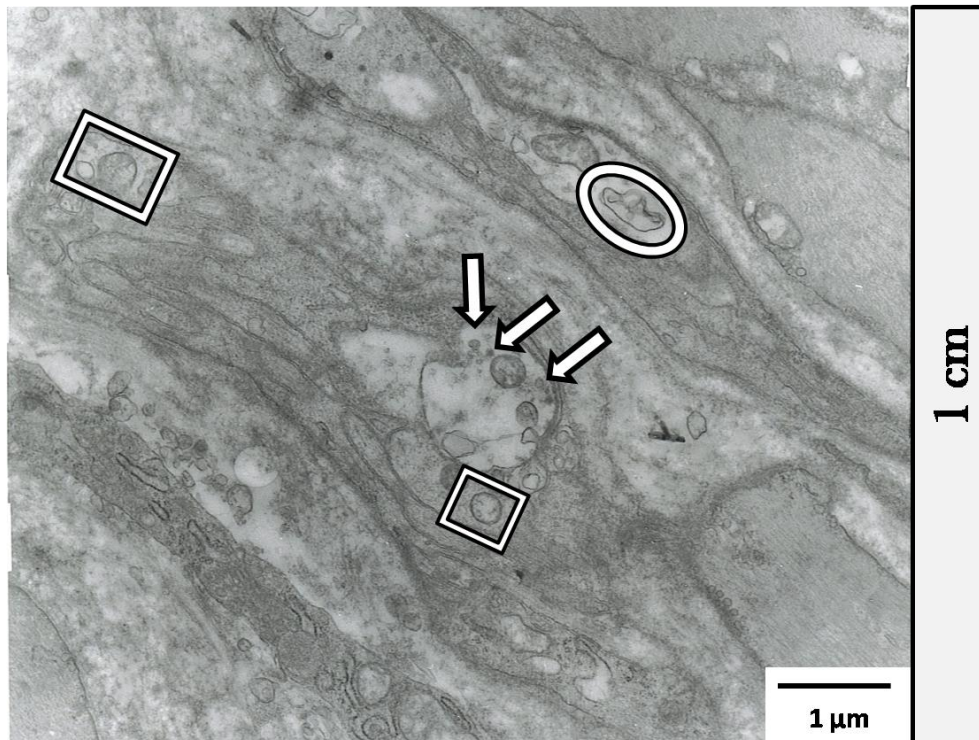


Figura 28. Micrografía de terminal nervioso amielinico en la Submucosa de colon a 1 cm del borde tumoral de paciente no tratado: Baja cantidad de vesículas (flechas., Mitocondrias edematizadas (rectángulos). Restos membranosos (elipse).

Hallazgos histológicos en la región peritumoral (2 cm):

A 2 cm del borde del tumor se encontraron nuevamente evidencias de un proceso inflamatorio cercano, en la Fig. 29 se puede observar la presencia de neutrofilos (células inflamatorias) y monocitos en el torrente sanguíneo, en el exterior del capilar plasmocitos, estos son muy comunes en la mucosa.

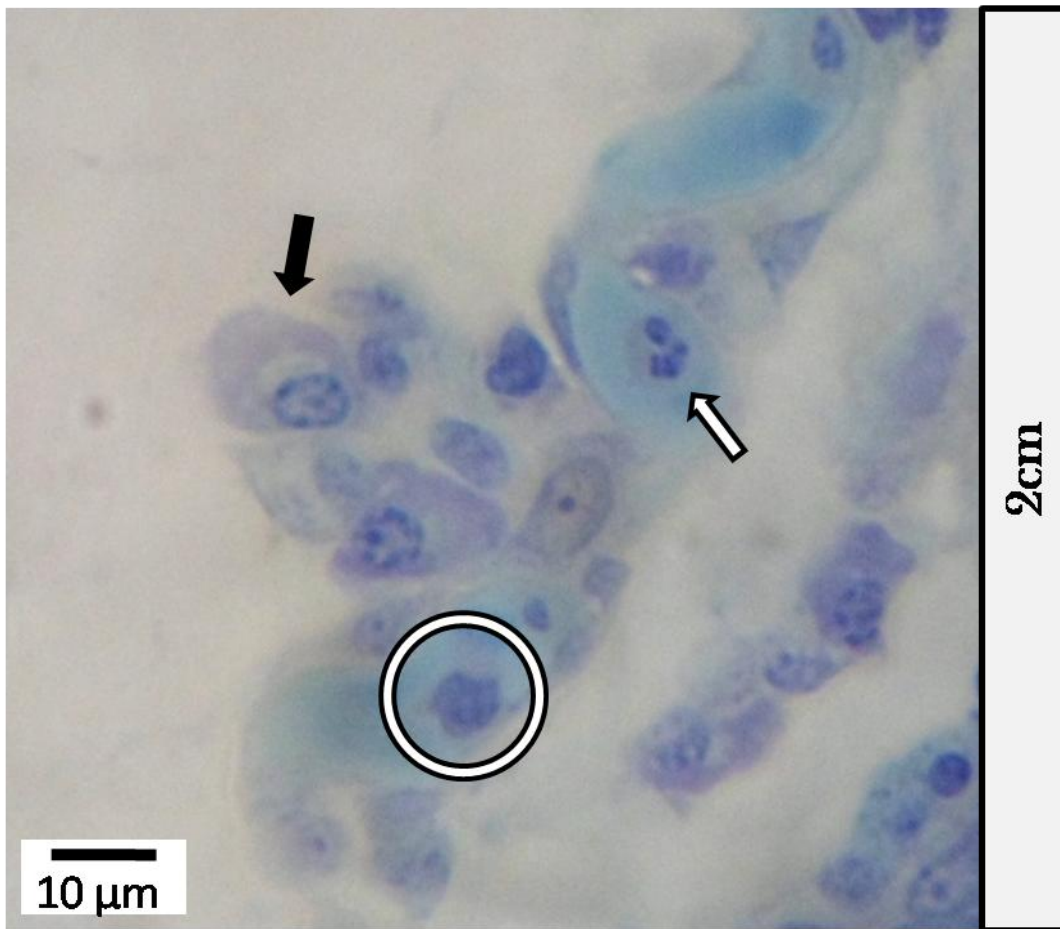


Figura 29. Corte tangencial de capilar sanguíneo de la mucosa de colon a 2 centímetros del borde tumoral de paciente tratado. Neutrófilo en el torrente sanguíneo (flechas blanca). Monocito (circulo). Plasmocitos (flecha negra).

Hallazgos ultraestructurales en la región peritumoral (2 cm):

La ultraestructura reveló muchas más alteraciones que no fueron observadas por microscopia de luz. Algunas musculares lisas (Fig. 30) presentaron fuerte edematización citoplasmática y mitocondrial, así como pérdida del elemento contráctil.

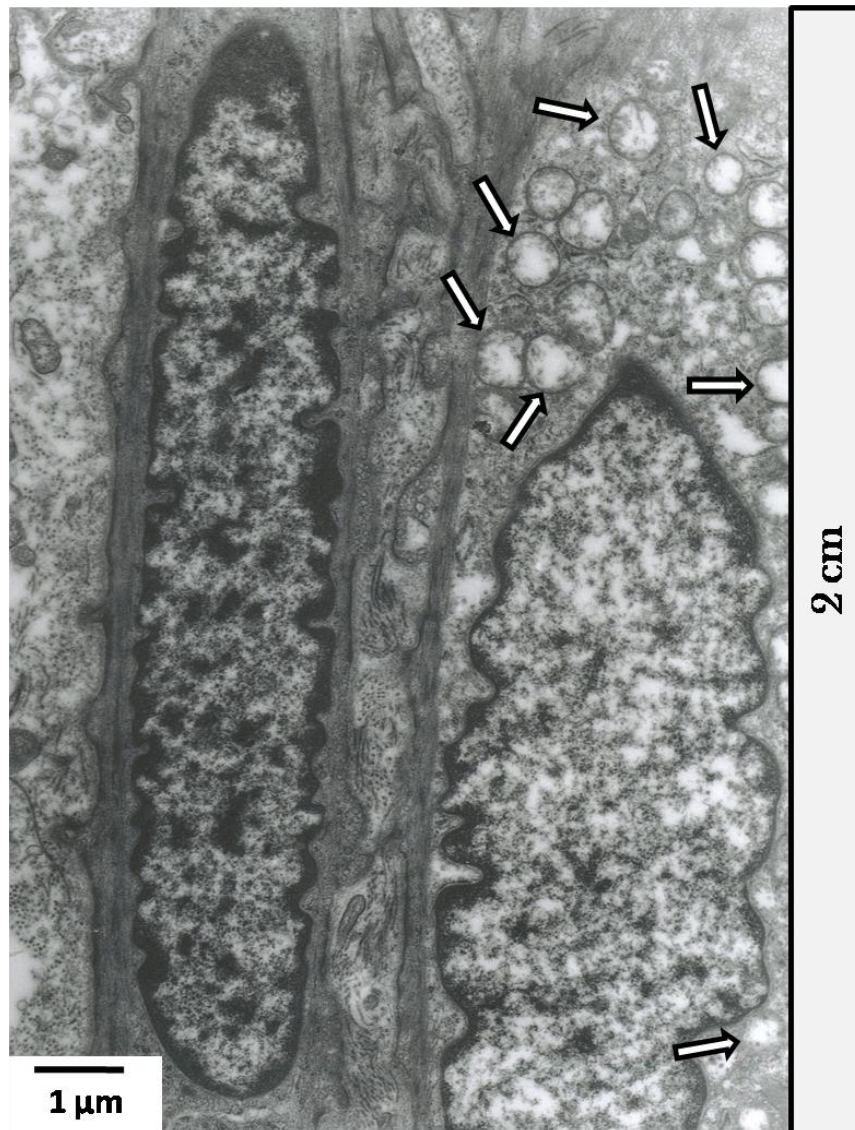


Figura 30. Micrografía de células musculares lisas de colon a 2 cm del borde tumoral de paciente no tratado: Mitocondrias con severa edematización (flechas).

Las células epiteliales presentaron la mayor variedad de alteraciones. En la Fig. 31 se presenta un grupo de células epiteliales de la mucosa del colon con mitocondrias edematizadas, engrosamiento de la membrana basal, pérdida de uniones intercelulares y proyecciones citoplasmáticas.

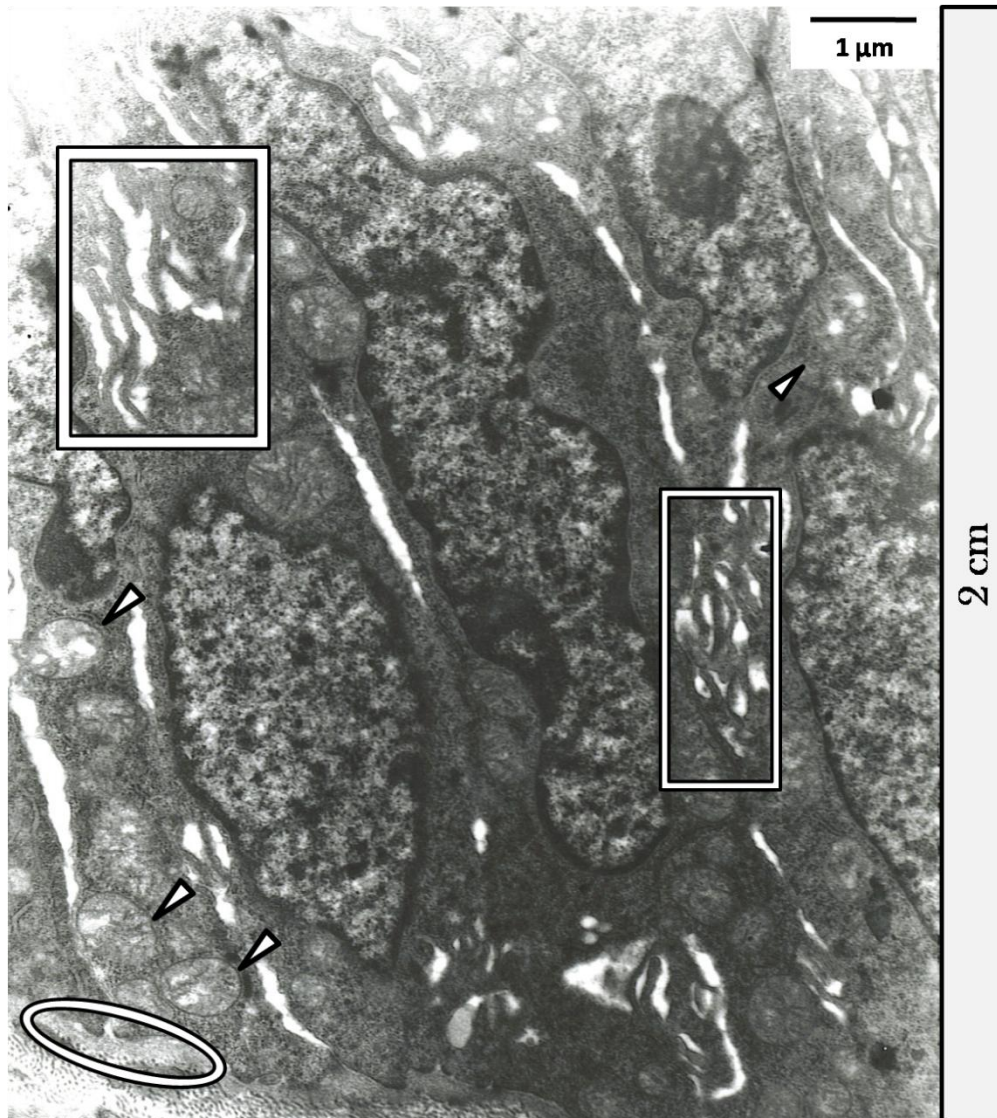


Figura 31. Micrografía de células epiteliales en la mucosa de colon a 2 cm del borde tumoral: Prolongaciones citoplasmáticas (rectángulos). Mitocondrias en varios estadios de edematización (triángulos). Engrosamiento de la membrana basal (elipse).

En el tejido muscular a esta distancia fue posible observar nuevamente el incremento en tamaño de el núcleo, en la Fig. 32 se observan 2 células musculares, una con núcleo agrandado y otras alteraciones organelares (izquierda) y otra con morfología normal (derecha).

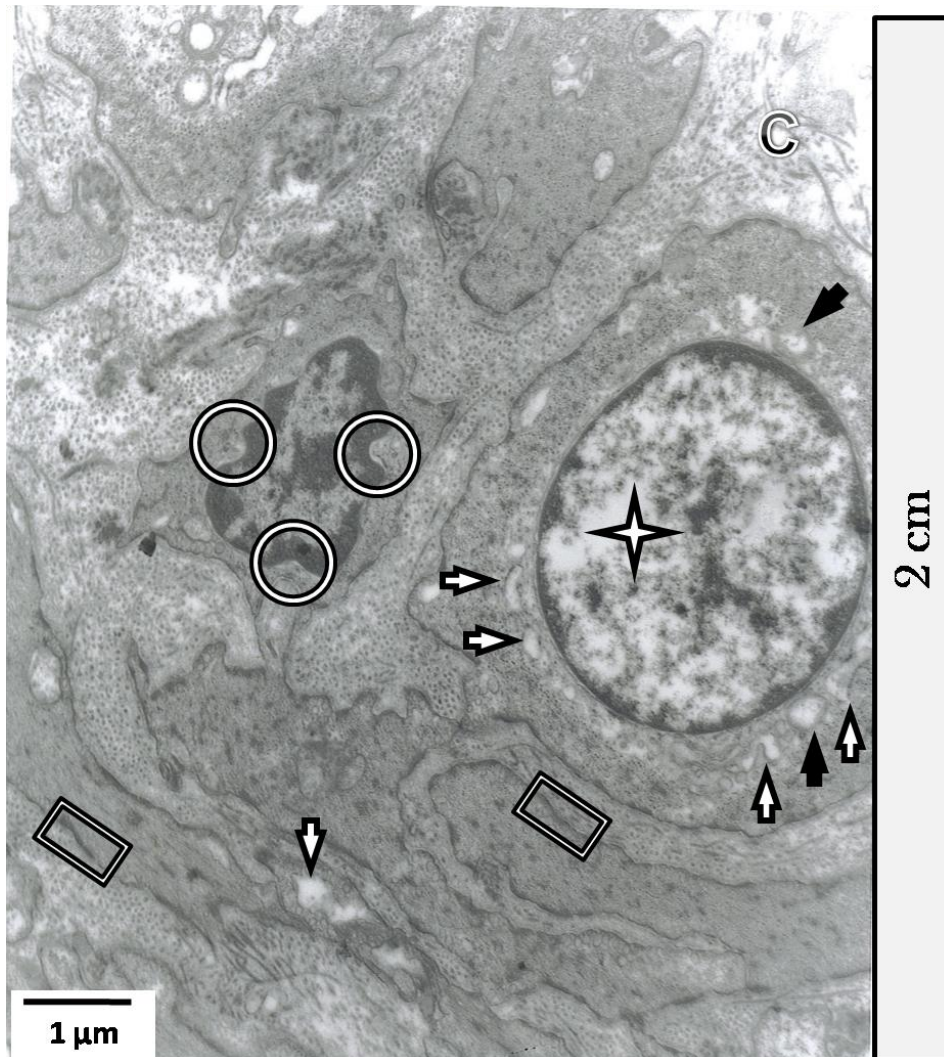


Figura 32. Micrografía de células musculares lisas de colon a 2 cm de el borde tumoral: Núcleo de gran diámetro y cubierta lisa (estrella). Mitochondrias edematizadas (flechas negras) y RER dilatado (flechas blancas) Abundancia de placas densas (rectángulos) y colágeno (C).

Hallazgos histológicos en la región peritumoral (3 cm):

Cuando evaluamos histológicamente, las muestras de pacientes tratados o no, al alejarnos del tumor, las alteraciones de la mucosa son menos frecuentes. En las Fig. 33 y 34 se muestran cortes histológicos de mucosa del colon de pacientes no tratados, la cual mantiene su morfología normal, no obstante, tanto en pacientes tratados como en los no tratados fue posible detectar en algunas ocasiones, la presencia de células inflamatorias en los vasos sanguíneos (Fig. 34) y en el epitelio, núcleos polimórficos.



Figura 33. Corte tangencial de la mucosa del colon a 3 cm del borde tumoral de paciente no tratado. Muscularis mucosae (Mm.). Glándulas de Lieberkuhn (GL). Tejido conectivo (TC).

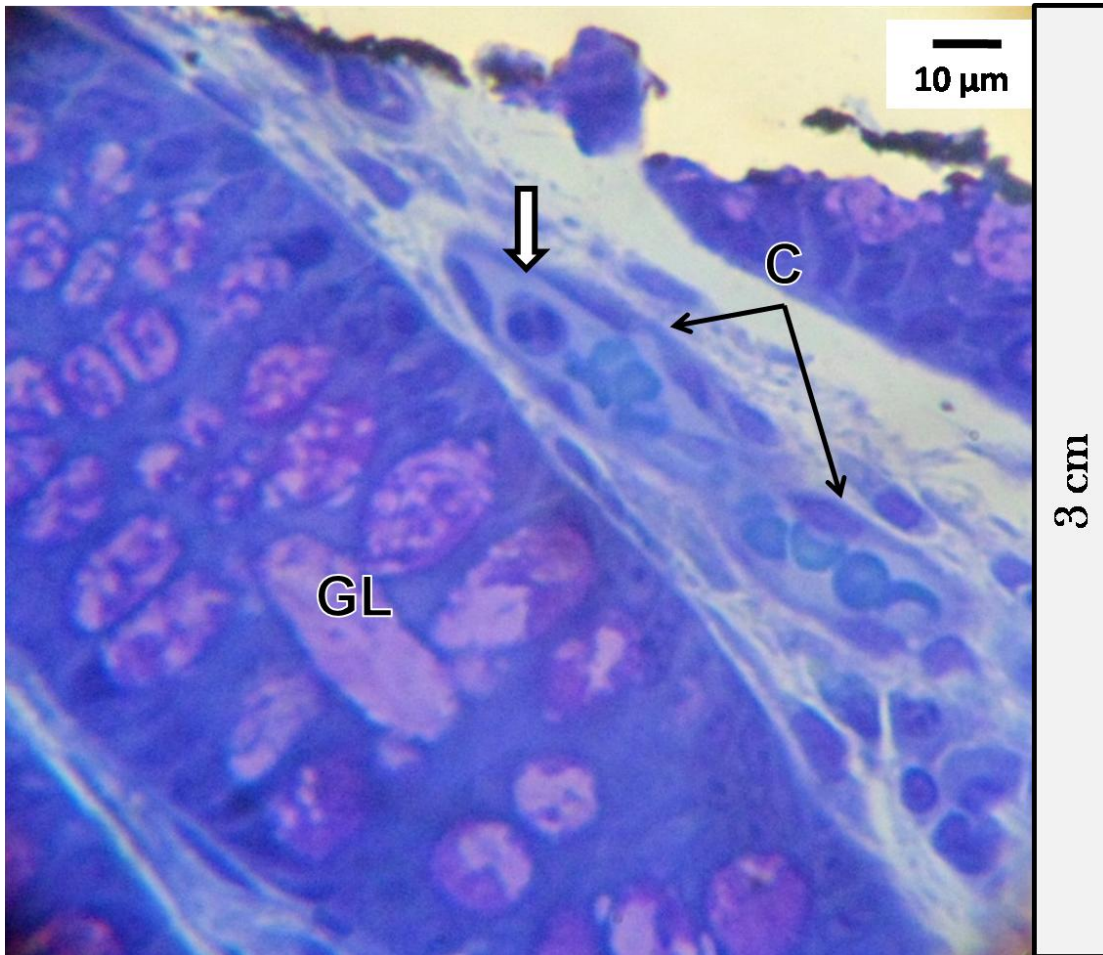


Figura 34. Corte longitudinal de glándula de Lieberkuhn y capilares sanguíneos de la mucosa de colon a 3 cm del borde tumoral de paciente no tratado. Glándula de Lieberkuhn (GL). Capilares sanguíneos (C). Neutrofilos viajando en el torrente (flecha blanca).

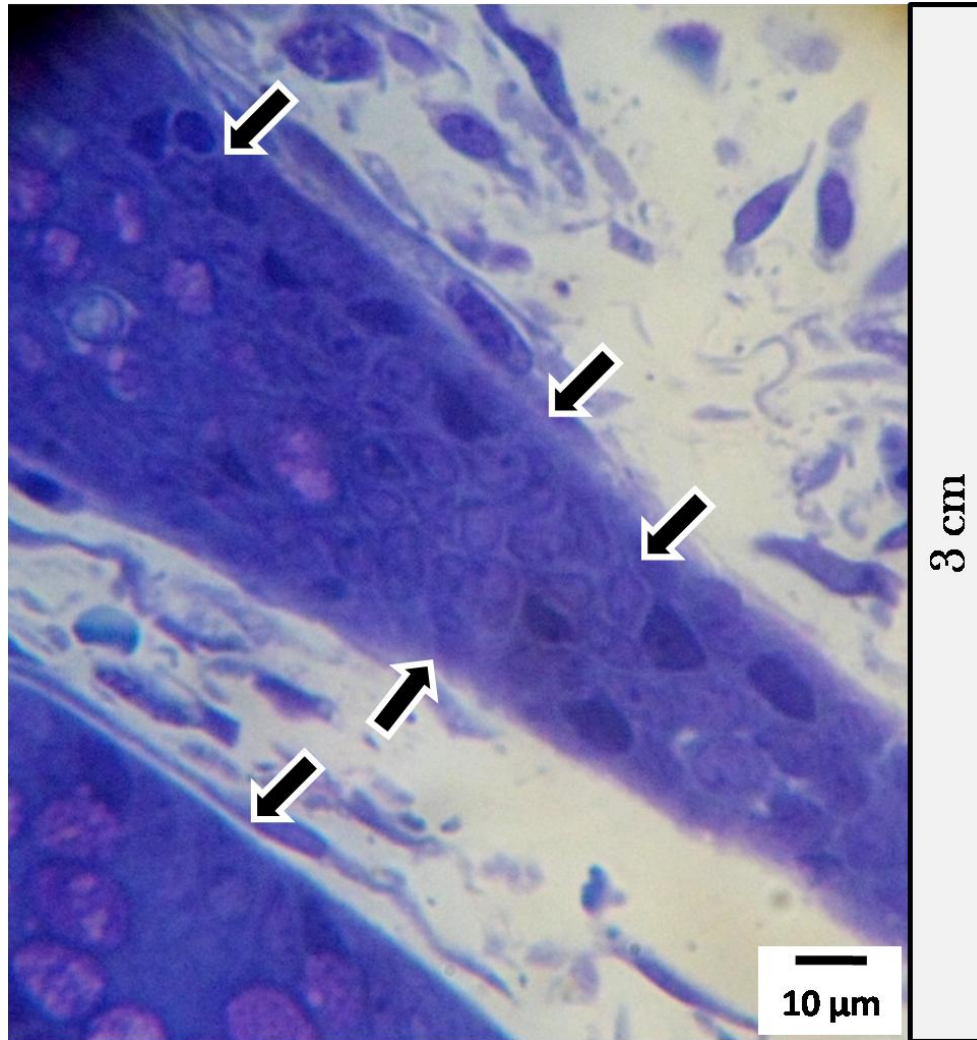


Figura 35. Corte tangencial de glándula de Lieberkuhn de la mucosa de colon a 3 cm del borde tumoral de paciente tratado. Núcleos con ligero polimorfismo (flechas).

Hallazgos ultraestructurales en la región peritumoral (3 cm):

La mayor cantidad de alteraciones encontradas a esta distancia del tumor fue detectada en el tejido muscular liso. En las Fig. 36 y 37 pueden verse ejemplos de esto en pacientes no tratados y tratados respectivamente. En la Fig. 36 se encontró una distensión severa de la envoltura nuclear, fuerte edematización de mitocondrias y ruptura de la membrana mitocondrial externa.

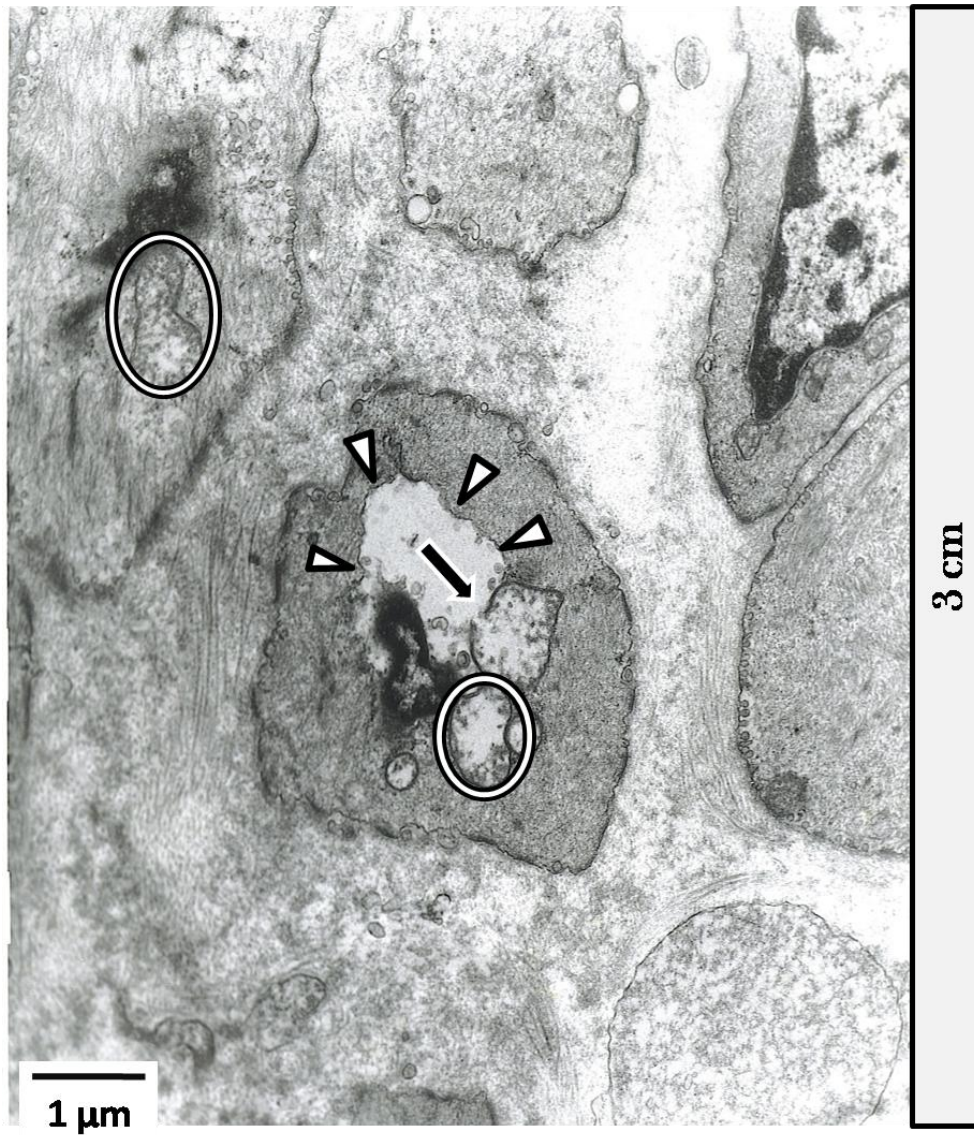


Figura 36. Micrografías de células musculares lisas a 3 cm del borde tumoral de paciente no tratado. Mitocondrias muy dilatadas (círculos). Ruptura de la membrana mitocondrial externa (flecha negra). Núcleo con envoltura severamente distendida (triángulos).

En la Fig. 37 se observan nuevamente células musculares lisas. Estas presentan mitocondrias edematizadas al igual que las descritas anteriormente, también presentan mitocondrias alargadas y evidencias de necrosis (ruptura de la membrana plasmática).

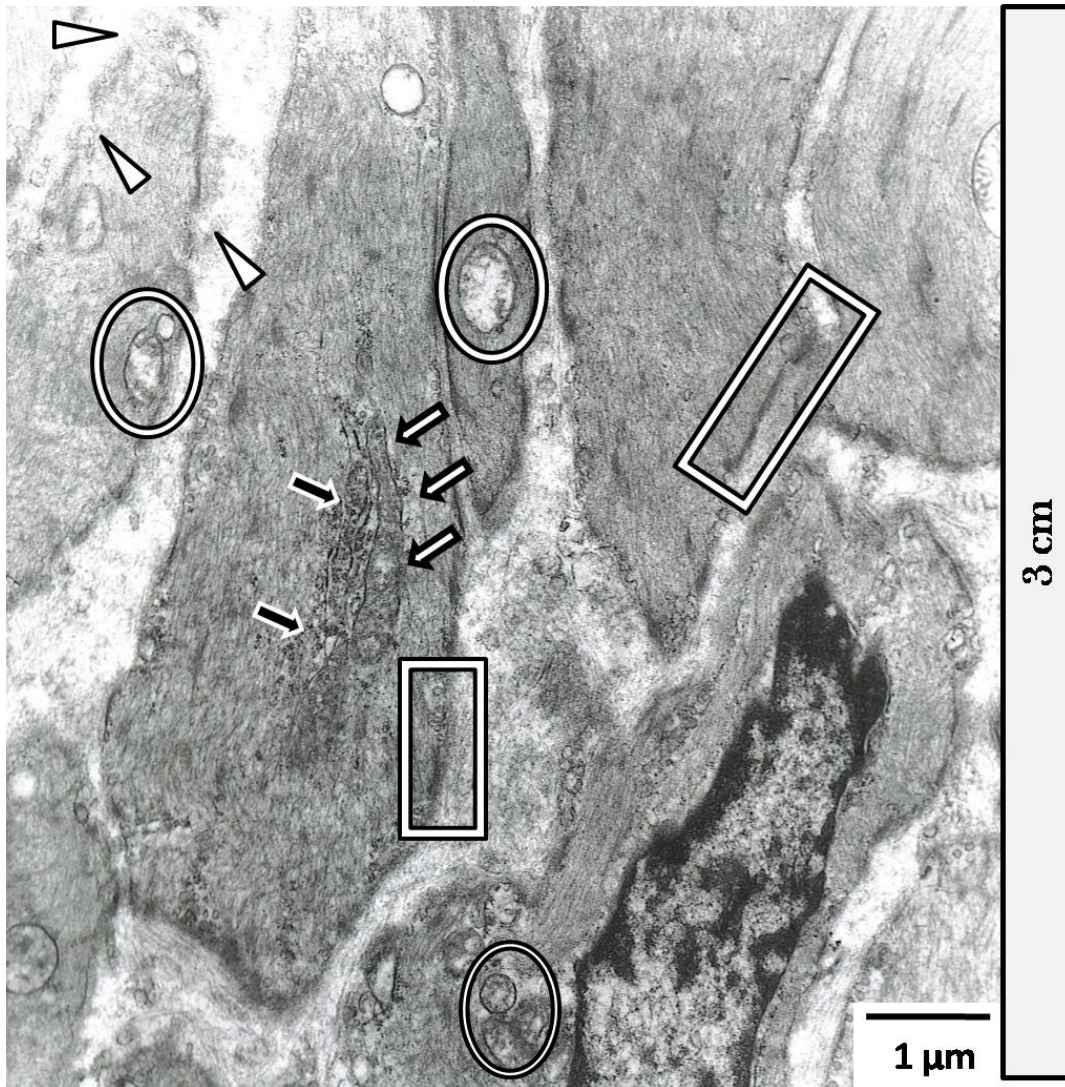


Figura 37. Micrografías de células musculares lisas a 3 cm del borde tumoral de paciente tratado. Placas densas (rectángulos). Mitocondrias edematizadas (circulo). Mitocondrias alargadas (flechas blancas). RER dilatado (flechas negras). Célula muscular lisa con ruptura del sarcolema (triángulos).

Hallazgos histológicos en la región peritumoral (4 cm):

Al igual que en las regiones descritas previamente, a esta distancia del tumor, la mucosa no parece presentar alteraciones. En las Fig. 38 y 39 se puede observar el epitelio, el cual mantiene sus características normales, así mismo, en la Fig. 38 se puede observar que hay evidencias de actividad secretora por parte del elemento glandular de la mucosa.

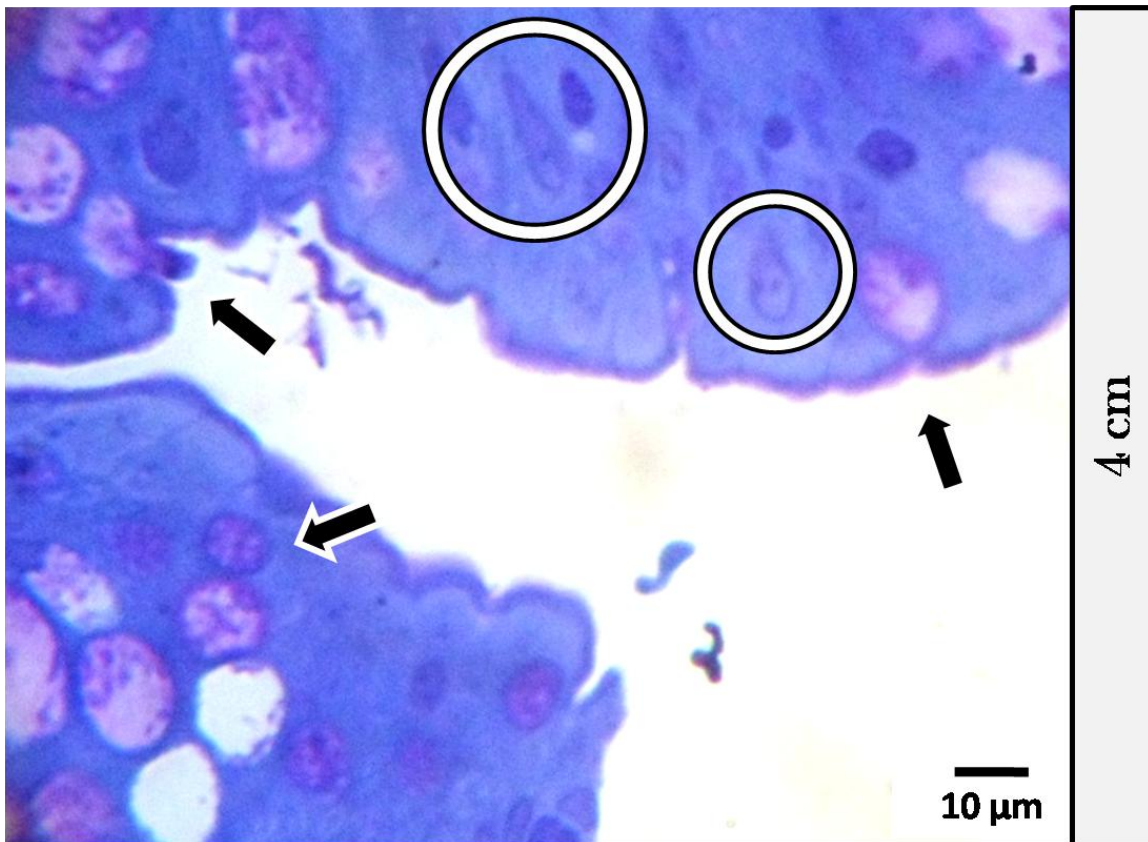


Figura 38. Corte longitudinal de glándulas de la mucosa de colon a 4 cm del borde tumoral de paciente tratado. Núcleos (círculos). Evidencia de secreción de moco hacia la luz del intestino (flechas negras).

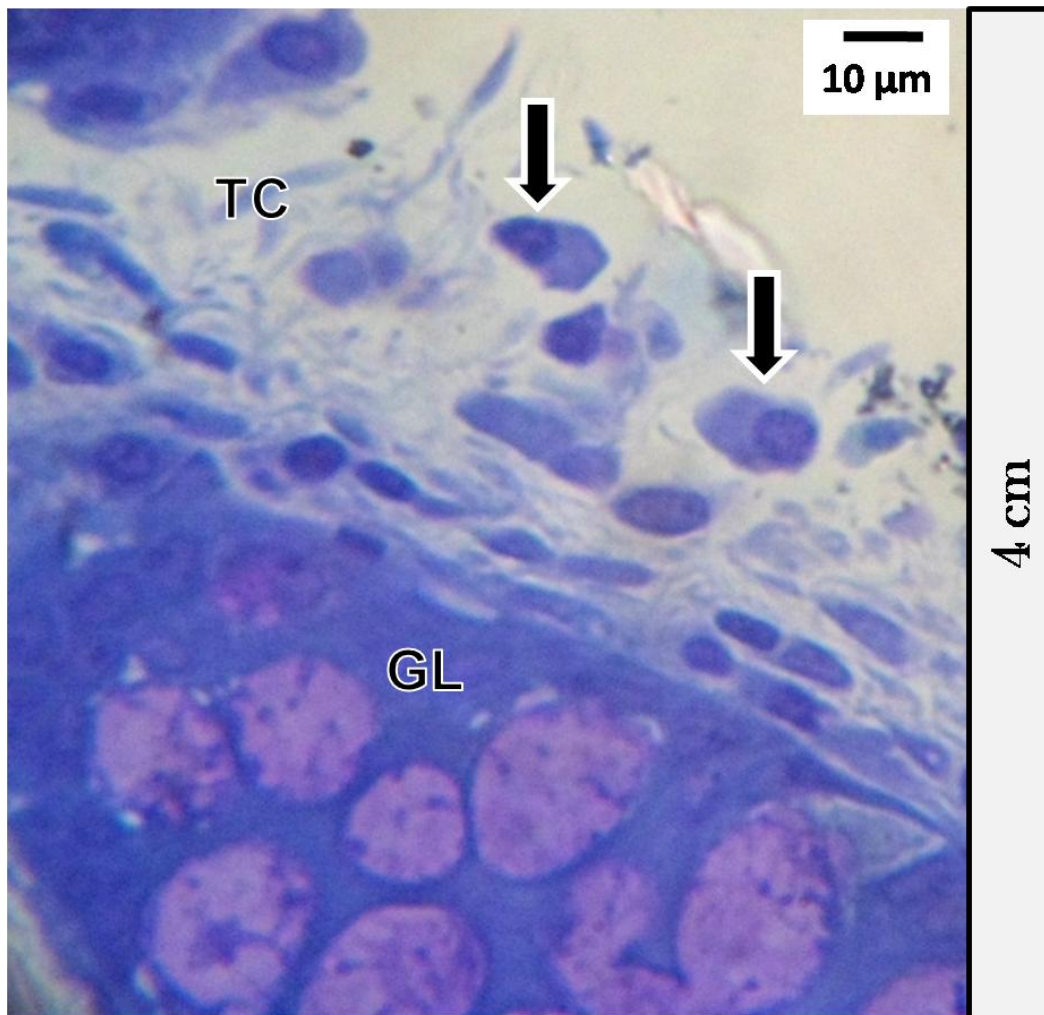


Figura 39. Corte tangencial de glándula de Lieberkuhn de mucosa de colon a 4 cm del borde tumoral de paciente no tratado. Glándula de Lieberkuhn (GL). Plasmocitos (flechas). Tejido conectivo (TC).

El tejido muscular liso de la mucosa y la muscularis se encontraron alterados. En las Fig. 40 y 41 se pueden observar cambios en la morfología normal de los núcleos de las células

musculares (aplanados y alargados), en la Fig. 40 se encontraron también evidencias de cambios en la orientación de las fibras musculares y un ligero engrosamiento de la membrana basal de los vasos sanguíneos.

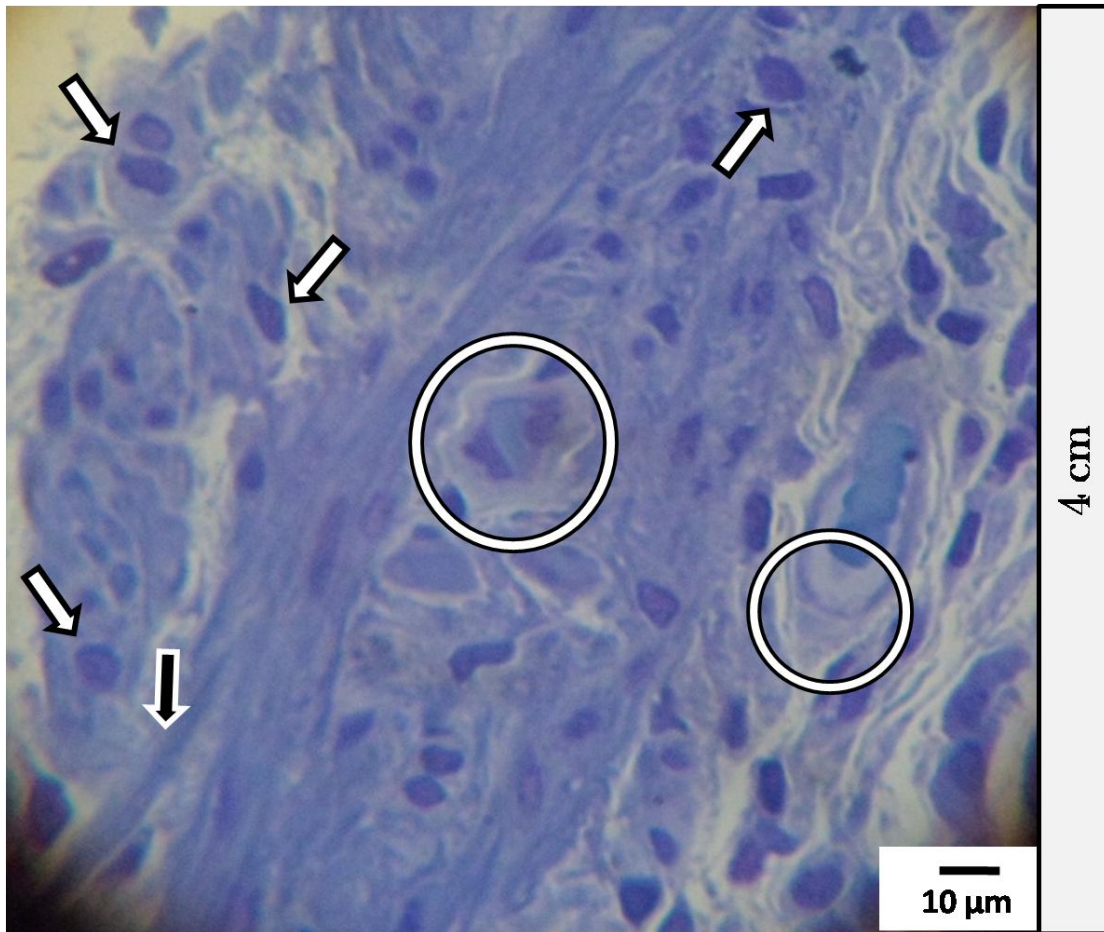


Figura 40. Corte longitudinal de *Muscularis mucosae* de la mucosa de colon a 4 cm del borde tumoral de paciente no tratado. Cambios en la orientación normal de las fibras musculares (flecha negra). Núcleos de tamaño agrandado (flechas blancas). Vasos sanguíneos con luces de forma anormal y engrosamiento de su membrana basal (círculos).

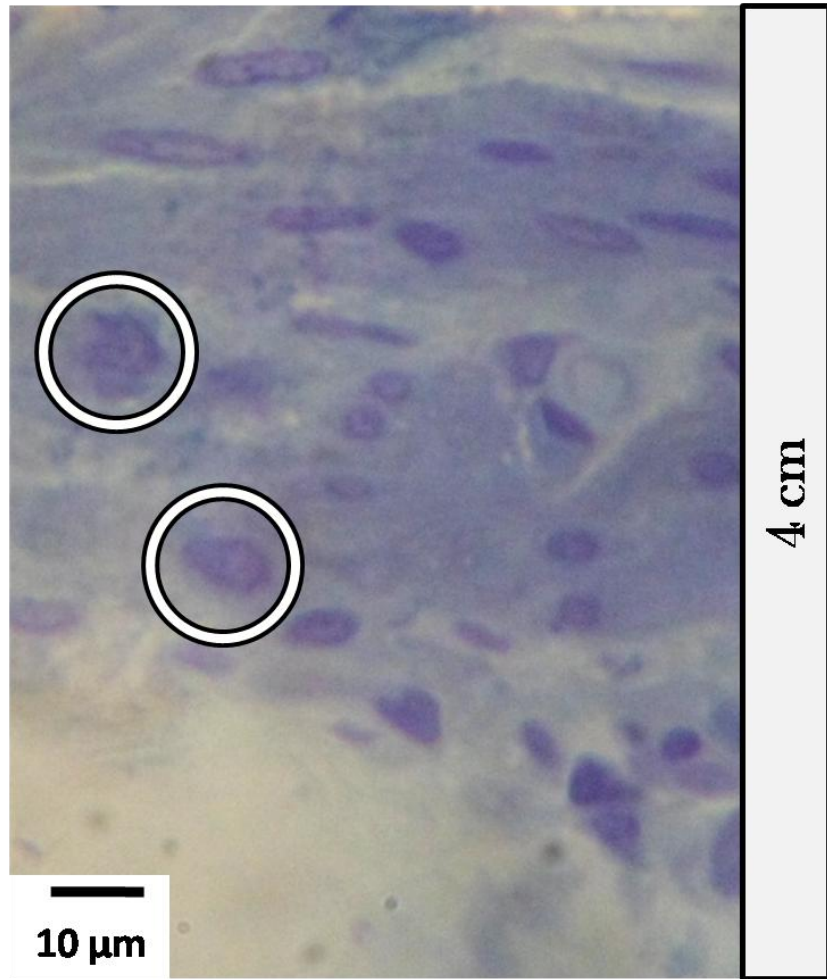


Figura 41. Corte longitudinal de musculatura lisa de Muscularis de colon a 4 cm del borde tumoral de paciente tratado. Núcleos alterados (círculos).

Hallazgos histológicos en la región peritumoral (5 cm):

A esta distancia se encontraron capilares sanguíneos con incremento en el grosor de su membrana basal (Fig. 42), sin embargo, en la mucosa (Fig. 43) no fue posible encontrar alguna alteración, la morfología de las glándulas y el tejido conectivo se observaron normales.

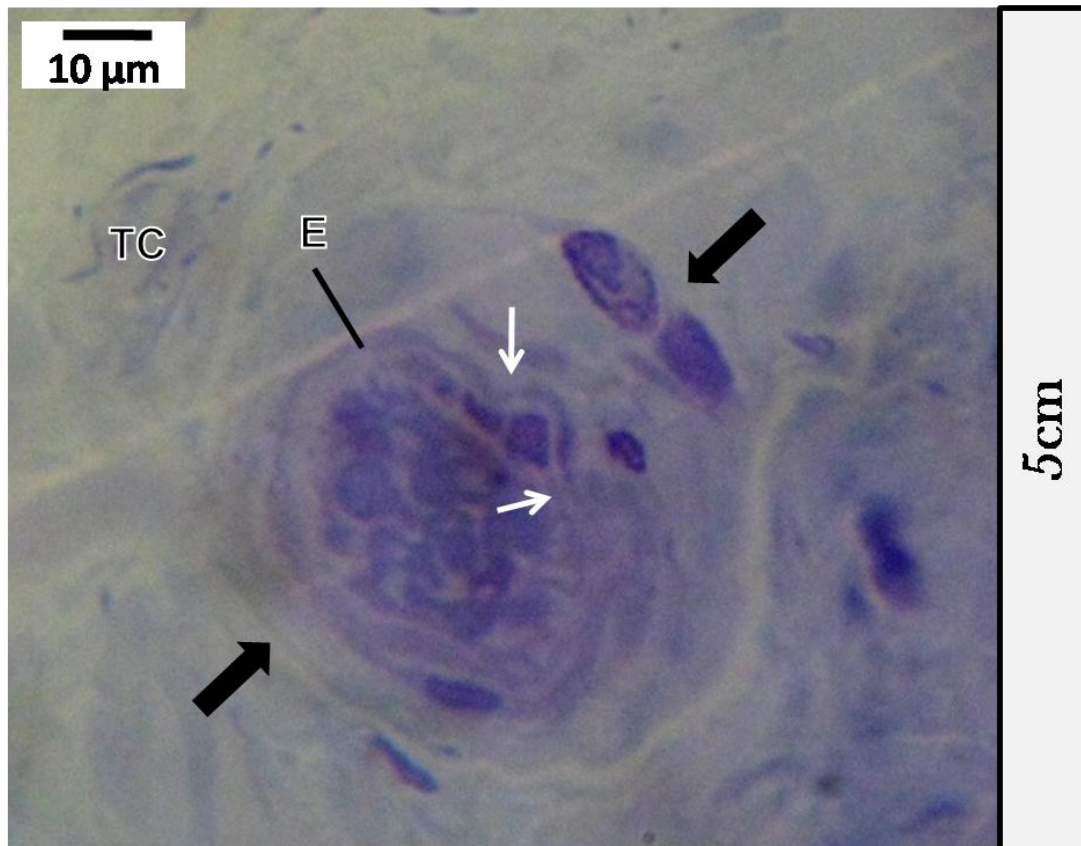


Figura 42. Corte transversal de capilar sanguíneo de submucosa de colon a 5 cm del borde tumoral de paciente no tratado. Engrosamiento heterogéneo de su membrana basal (flechas negras). Endotelio (E). Proyecciones de su membrana hacia la luz (flechas blancas). Tejido conectivo (TC).

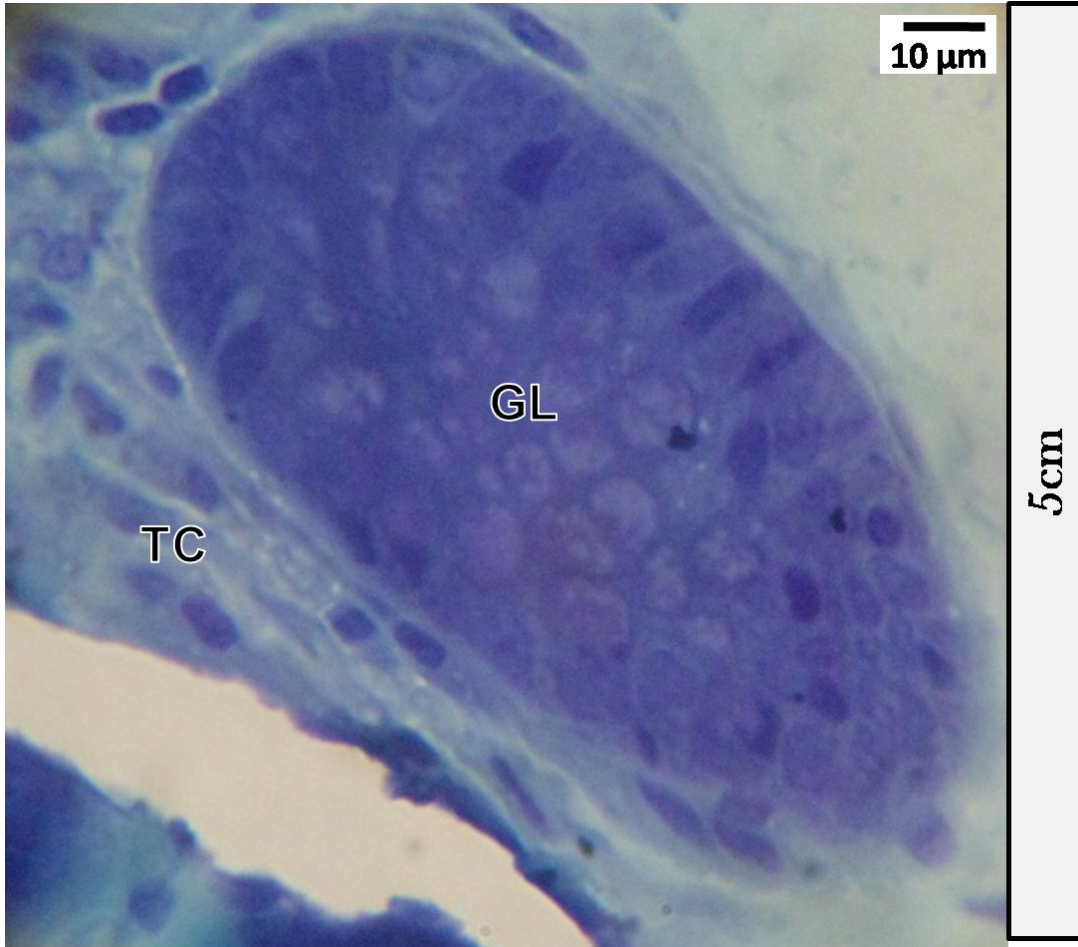


Figura 43. Corte longitudinal de mucosa de colon a 5 cm del borde tumoral de paciente tratado. Glándulas de Lieberkuhn (GL). Tejido conectivo (TC).

Hallazgos ultraestructurales en la región peritumoral (5 cm):

En la Fig. 44 se observa una célula muscular lisa con ruptura de su membrana plasmática, indicando un proceso necrótico, a esta célula también se le puede observar mitocondrias edematizadas. A nivel del componente nervioso, se pudo detectar una disminución en la cantidad de vesículas sinápticas.



Figura 44. Micrografía de células musculares lisas y terminal nervioso amielínico de la Submucosa de colon a 5 cm del borde tumoral de paciente no tratado. Baja cantidad de vesículas sinápticas (rectángulos). Ruptura de la membrana plasmática limitante, indicando un proceso necrótico (ovalo). Mitocondrias edematizadas (flechas).

Hallazgos histológicos en la región peritumoral (6 cm):

En la Fig. 45 se puede observar un fuerte engrosamiento de la membrana basal, nuevamente, el grosor de la membrana varía alrededor de la periferia del capilar.

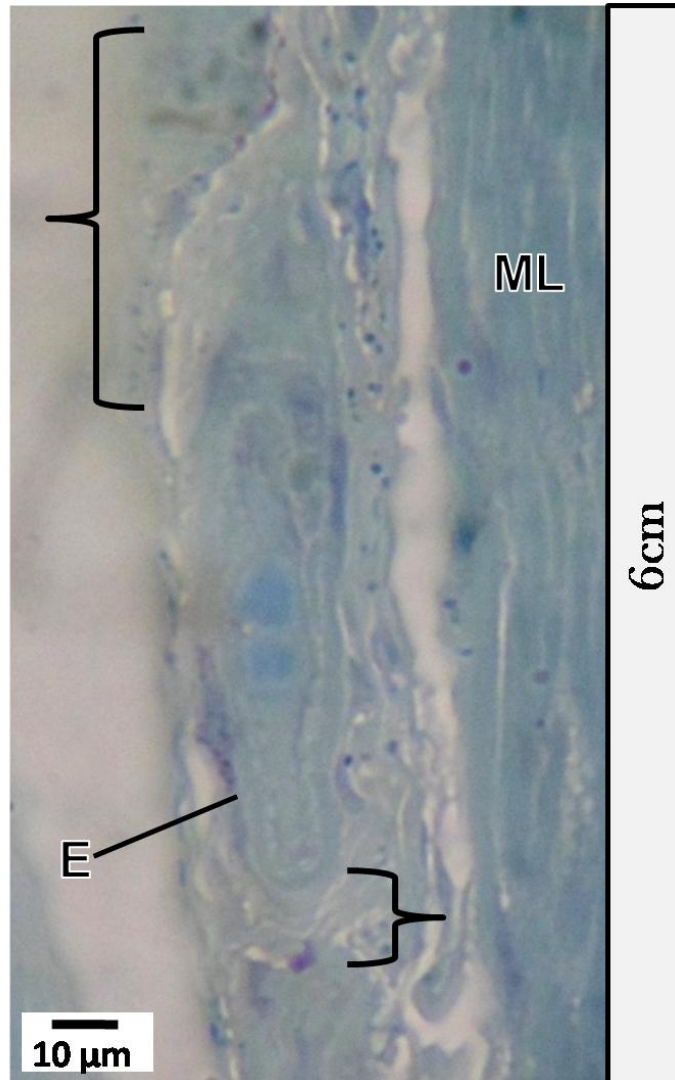


Figura 45. Corte tangencial de capilar sanguíneo de la Muscularis de colon a 6 cm del borde tumoral de paciente no tratado. Extensa de la membrana basal (llaves). Endotelio (E). Musculatura lisa (ML).

El tejido muscular liso, nuevamente presenta alteraciones, se puede ver en la Fig. 46 que este presenta incremento en el tamaño de núcleos, espacios entre las fibras musculares y cambios en la orientación del tejido.

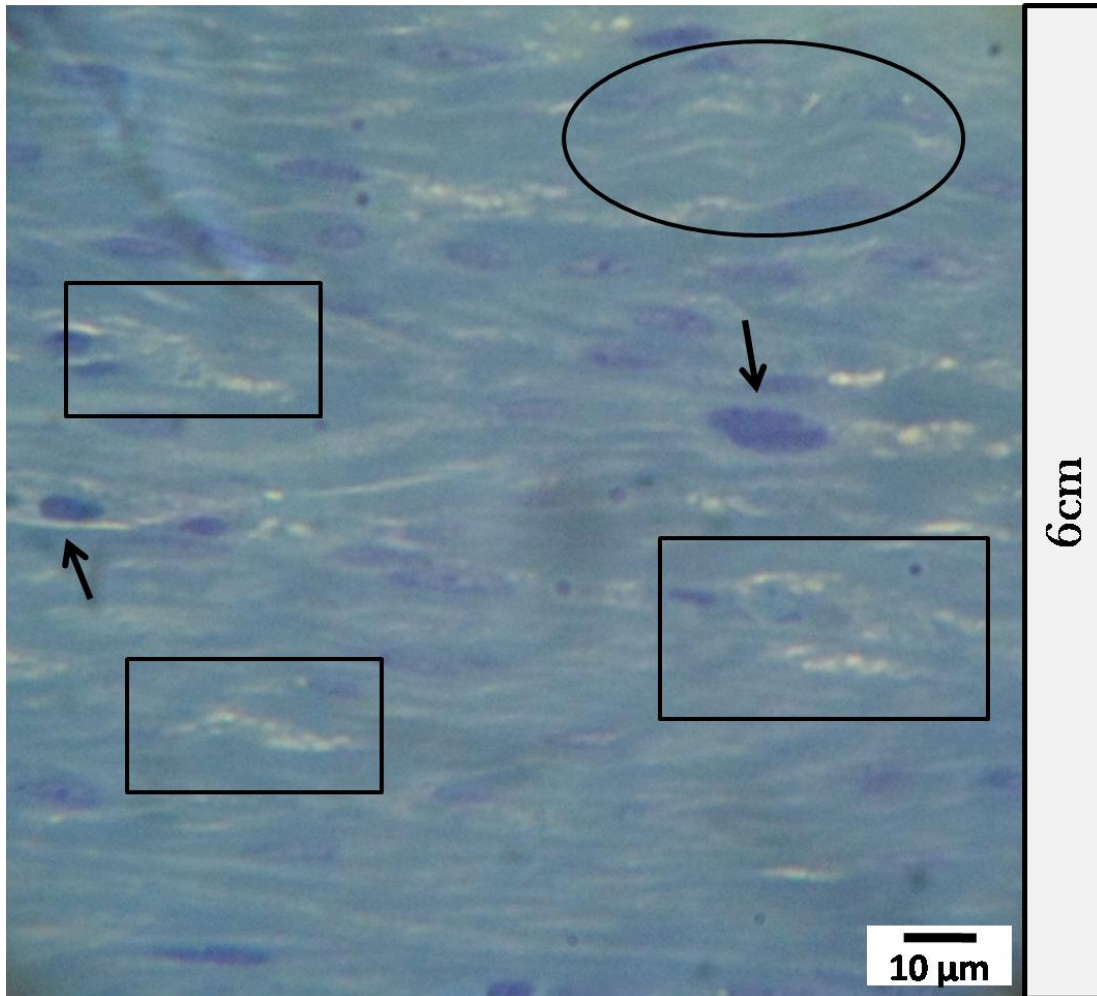


Figura 46. Corte longitudinal de musculatura lisa de la Muscularis de colon a 6 cm del borde tumoral de paciente tratado. Núcleos hipercromáticos y de gran tamaño (flechas). Fibras musculares (ovalo). Espacios entre las fibras musculares (rectángulos).

Hallazgos histológicos en la región peritumoral (7 cm):

A 7 cm del tumor, se encontraron múltiples alteraciones en la musculatura lisa tanto en pacientes tratados como en los no tratados. En la Fig. 47 y 48 se presentan cortes histológicos de la Muscularis de pacientes no tratados, en estas se puede observar la presencia de células musculares lisas con contornos irregulares, aparición de espacios entre las fibras, cambios en la morfología normal de los núcleos, así como en la orientación del tejido.

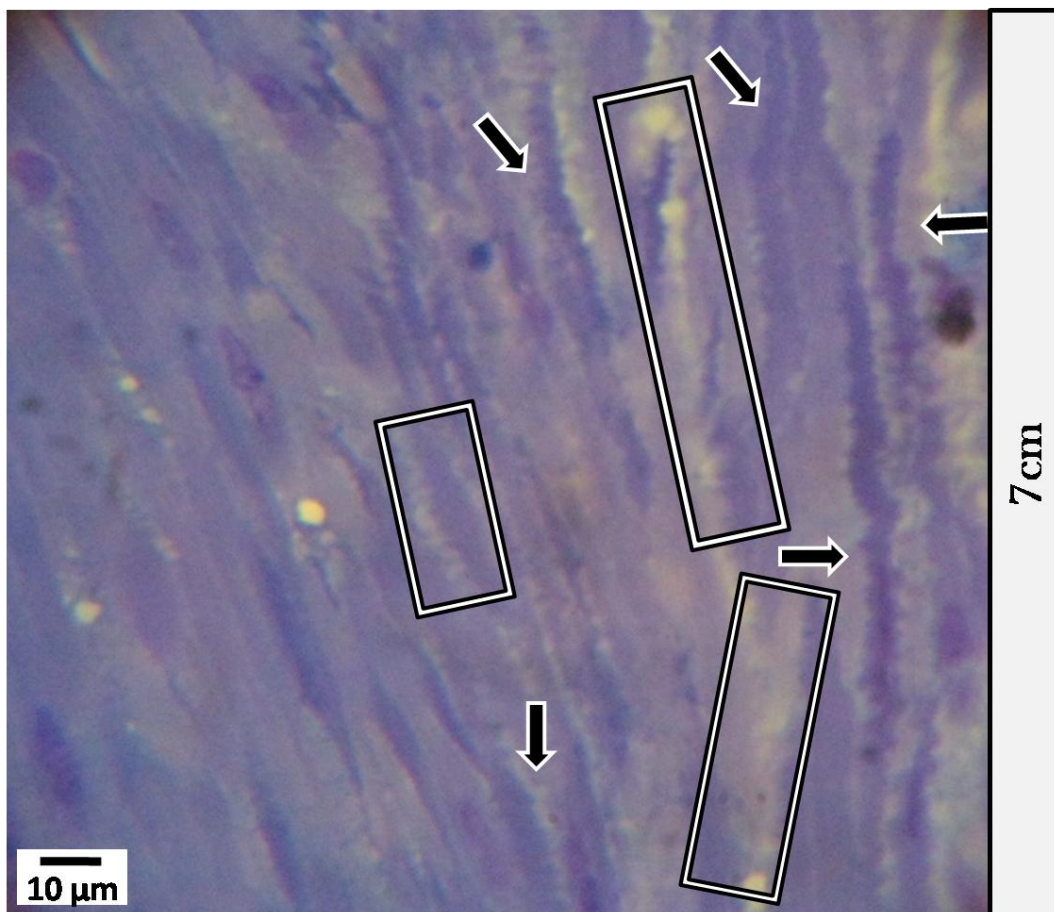


Figura 47. Corte longitudinal de musculatura lisa de la Muscularis de colon a 7 cm del borde tumoral de paciente no tratado. Musculatura anormal con una coloración intensa y contornos irregulares (flechas). Presencia de espacios entre los grupos de fibras musculares (rectángulos).

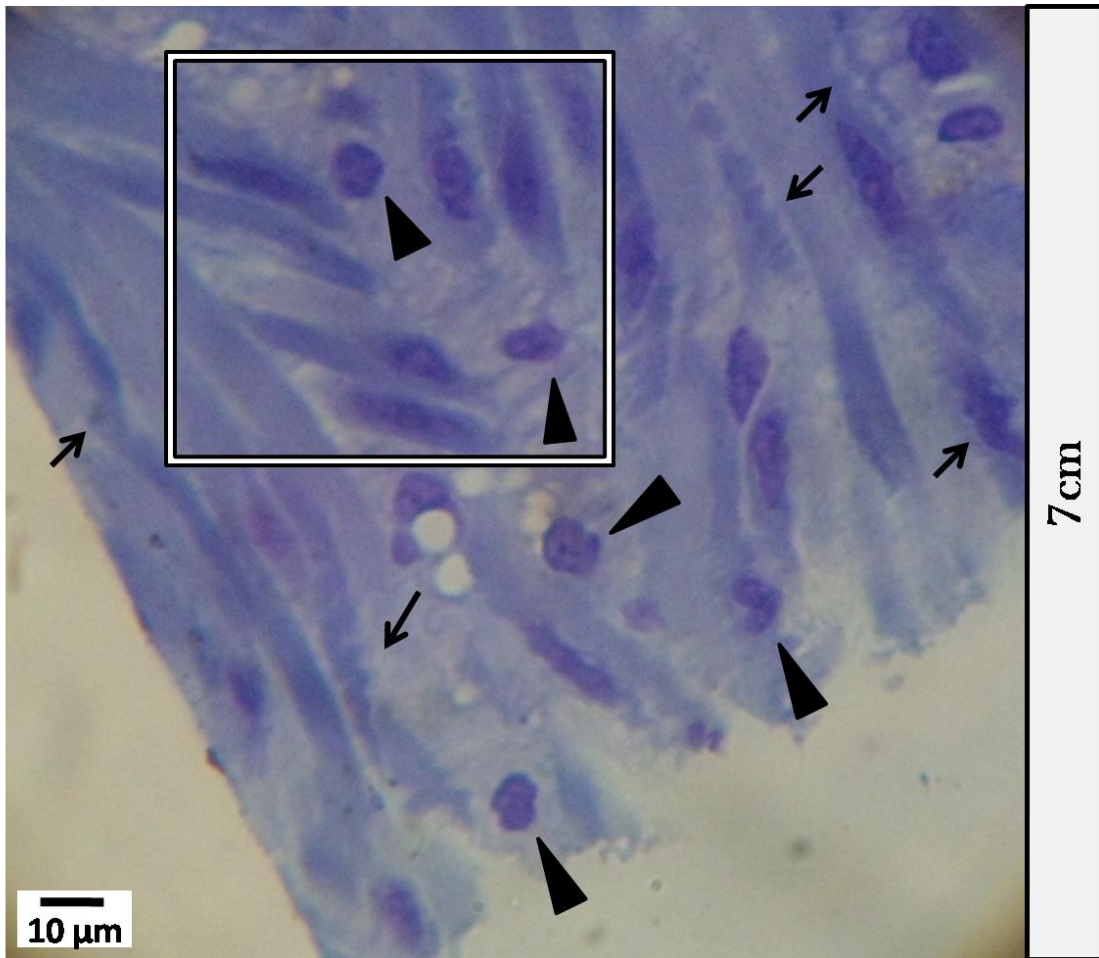


Figura 48. Corte longitudinal de musculatura lisa de la Muscularis de colon a 7 cm del borde tumoral de paciente no tratado. Cambios anormales en la orientación de la musculatura (cuadrado). Espacios entre células musculares y fibras de contornos irregulares e hiperchromacia (flechas). Presencia de núcleos de forma anormal (triángulos).

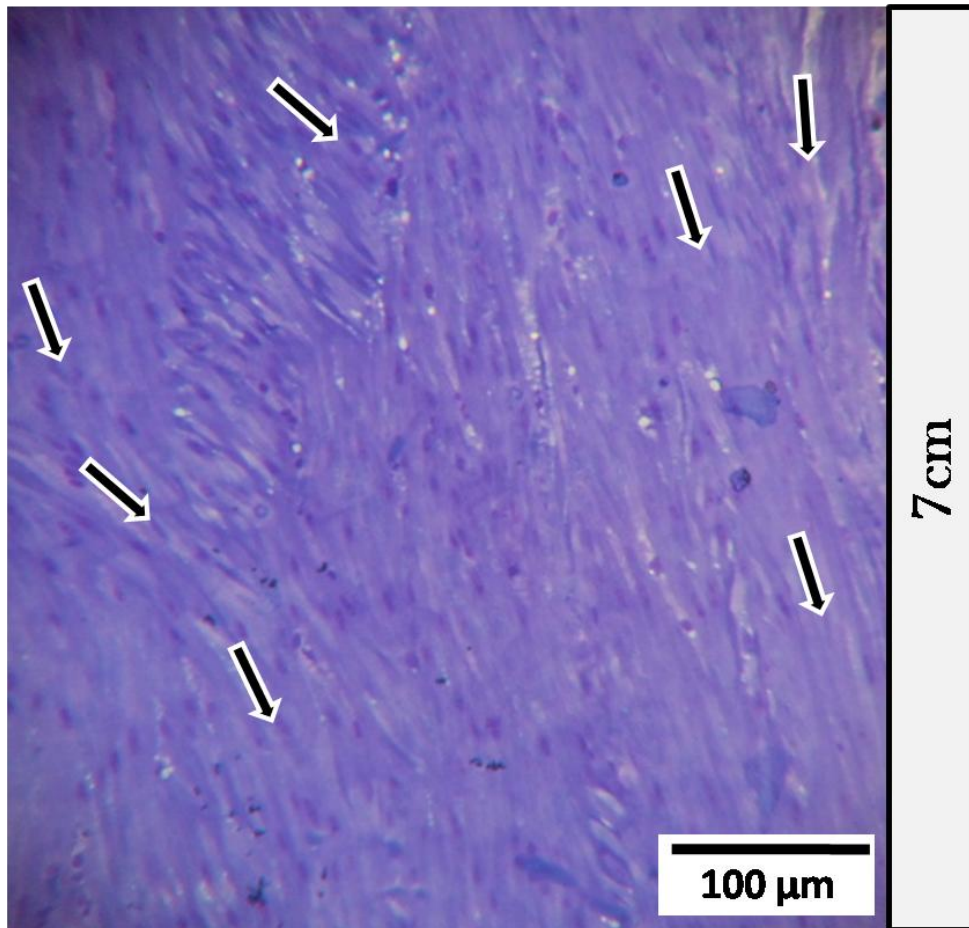


Figura 49. Corte longitudinal de musculatura lisa de la Muscularis de colon a 7 cm del borde tumoral de paciente tratado. Cambio anormal en la orientación de las fibras (flechas).

Hallazgos histológicos en la región peritumoral (8 cm):

Nuevamente, el tejido muscular liso presenta alteraciones. La Fig. 50 muestra un corte de tejido muscular con cambios en la orientación de las fibras.

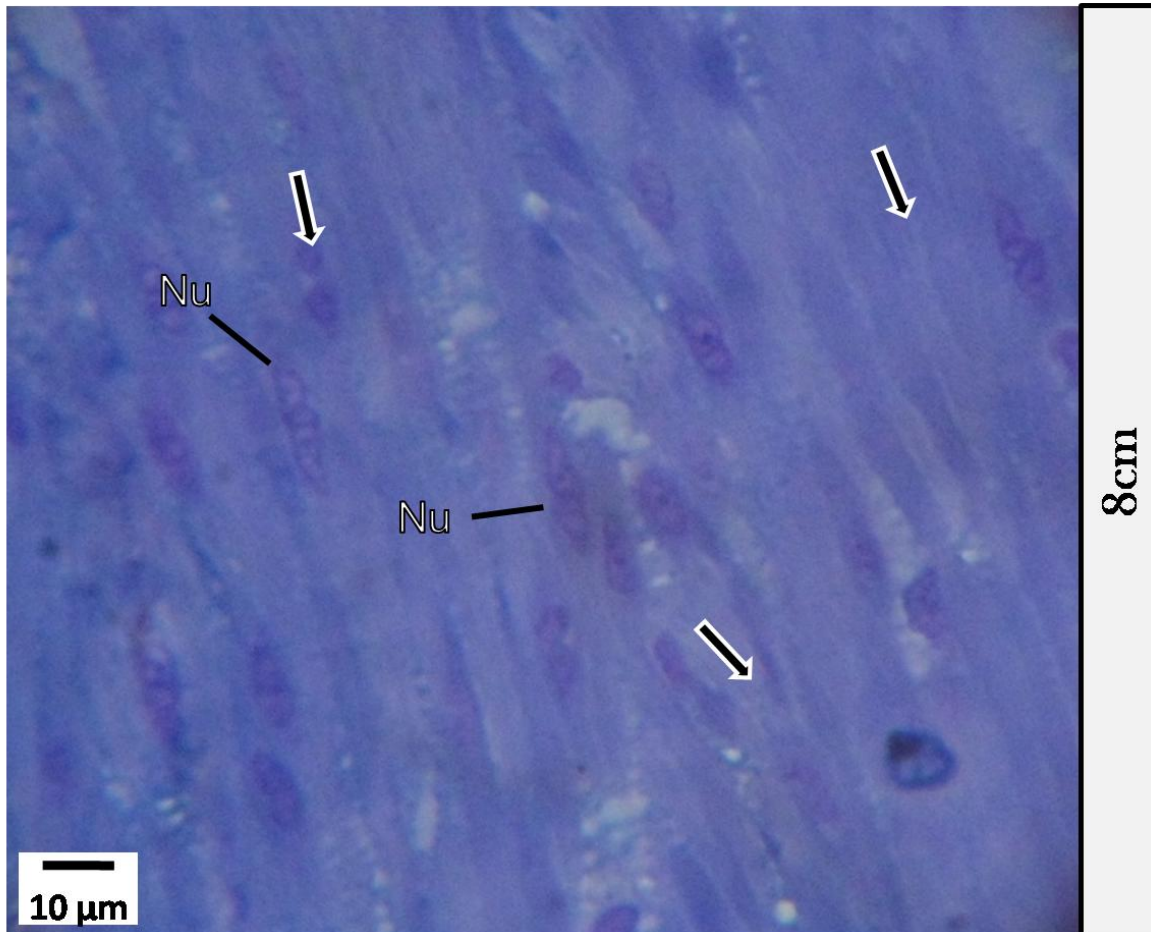


Figura 50. Corte longitudinal de musculatura lisa de la Muscularis de colon a 8 cm del borde tumoral de paciente no tratado. La orientación de las fibras cambia (flechas). Núcleos (Nu).

En la Fig. 51, se muestran los tejidos de la mucosa, a esta distancia, no se encontraron alteraciones relevantes, la morfología de los tejidos presentados se observa normal.

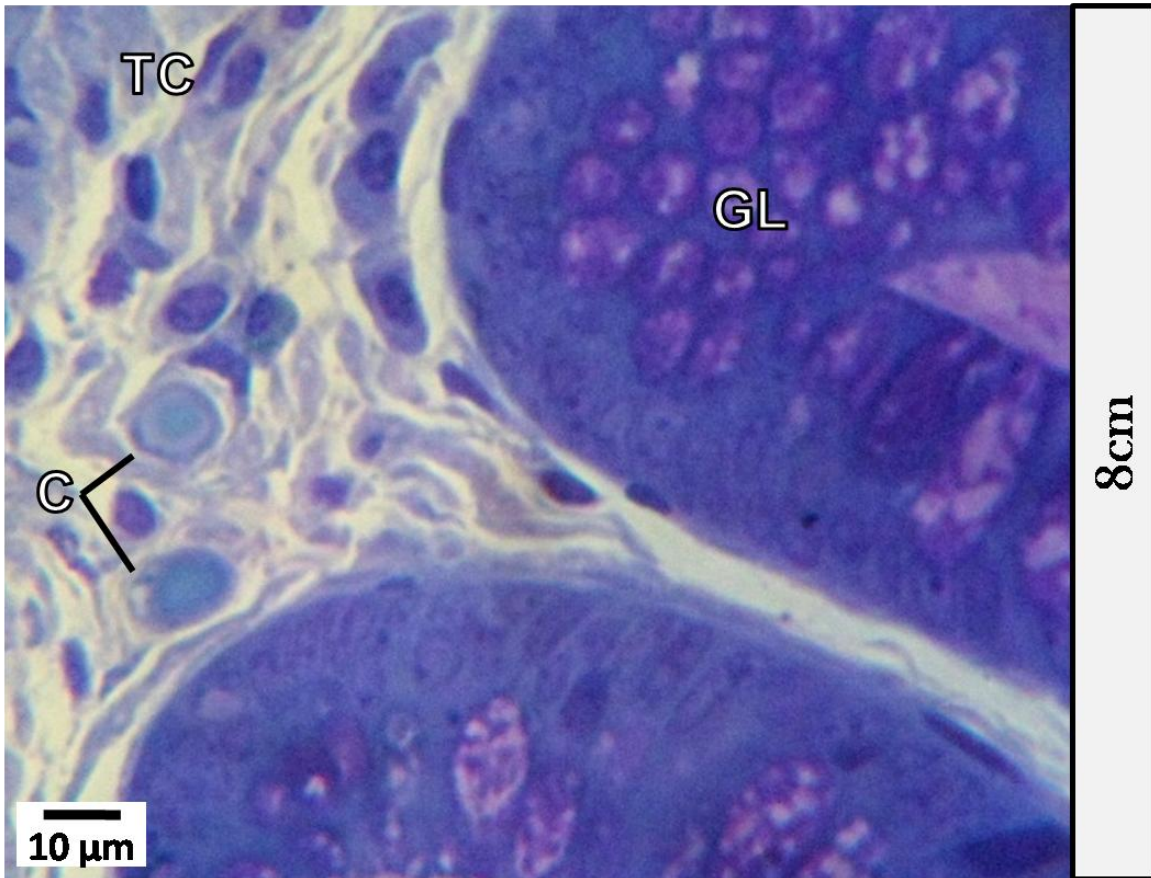


Figura 51. Corte longitudinal de la mucosa de colon a 8 cm del borde tumoral de paciente tratado. Glándulas de Lieberkuhn (GL). Tejido conectivo (TC). Capilar sanguíneo (C).

En la Submucosa se encontraron capilares sanguíneos alterados, en la Fig. 52 se muestra un ejemplo de capilar con fuerte engrosamiento de la membrana basal.

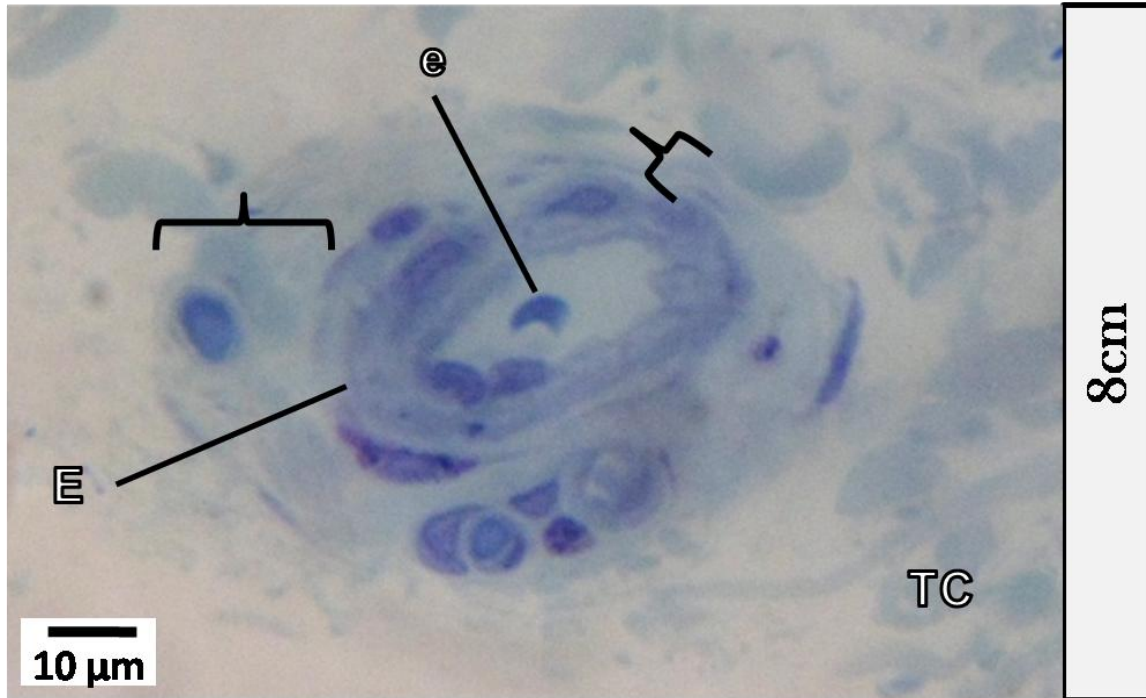


Figura 52. Corte transversal de capilar sanguíneo de la Submucosa de colon a 8 cm del borde tumoral de paciente no tratado. Engrosamiento significativo y heterogéneo de la membrana basal del vaso (llaves). Eritrocitos en circulación (e). Células endoteliales (E).

Hallazgos histológicos en la región peritumoral (9 cm):

En el punto muestreado más distante del tumor, no se detectaron alteraciones morfológicas en la mucosa del colon, esto se evidencia en la Fig. 53 en la que se presenta un corte longitudinal de la mucosa con características morfológicas normales.

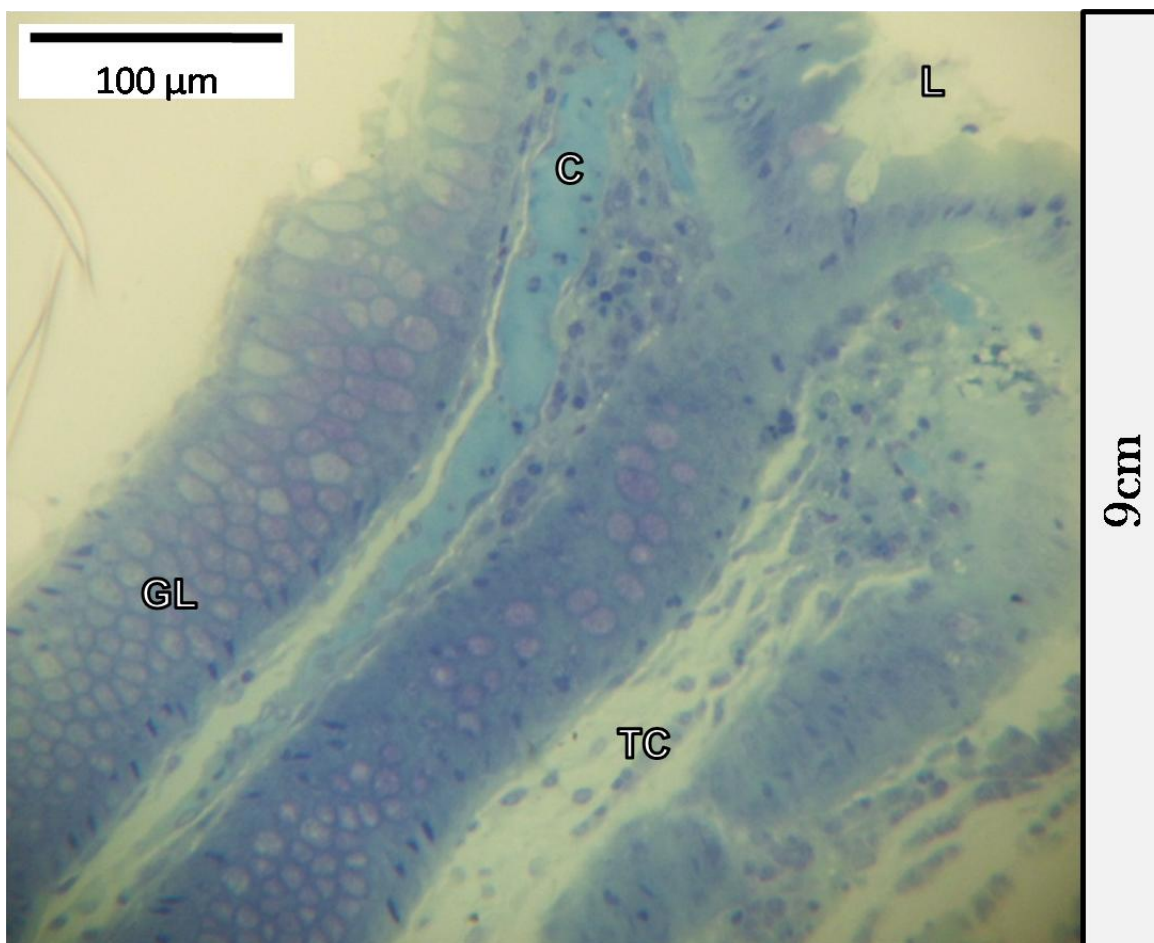


Figura 53. Corte longitudinal de la mucosa de colon a 9 cm del borde tumoral de paciente tratado. Glándulas de Lieberkuhn (GL). Tejido conectivo (TC). Capilar (C). Luz del intestino (L).

En ciertos casos de pacientes no tratados se pudo observar una gran cantidad de infiltrados a nivel de la mucosa (Fig. 54), esto siendo una característica común en presencia de un proceso inflamatorio cercano.

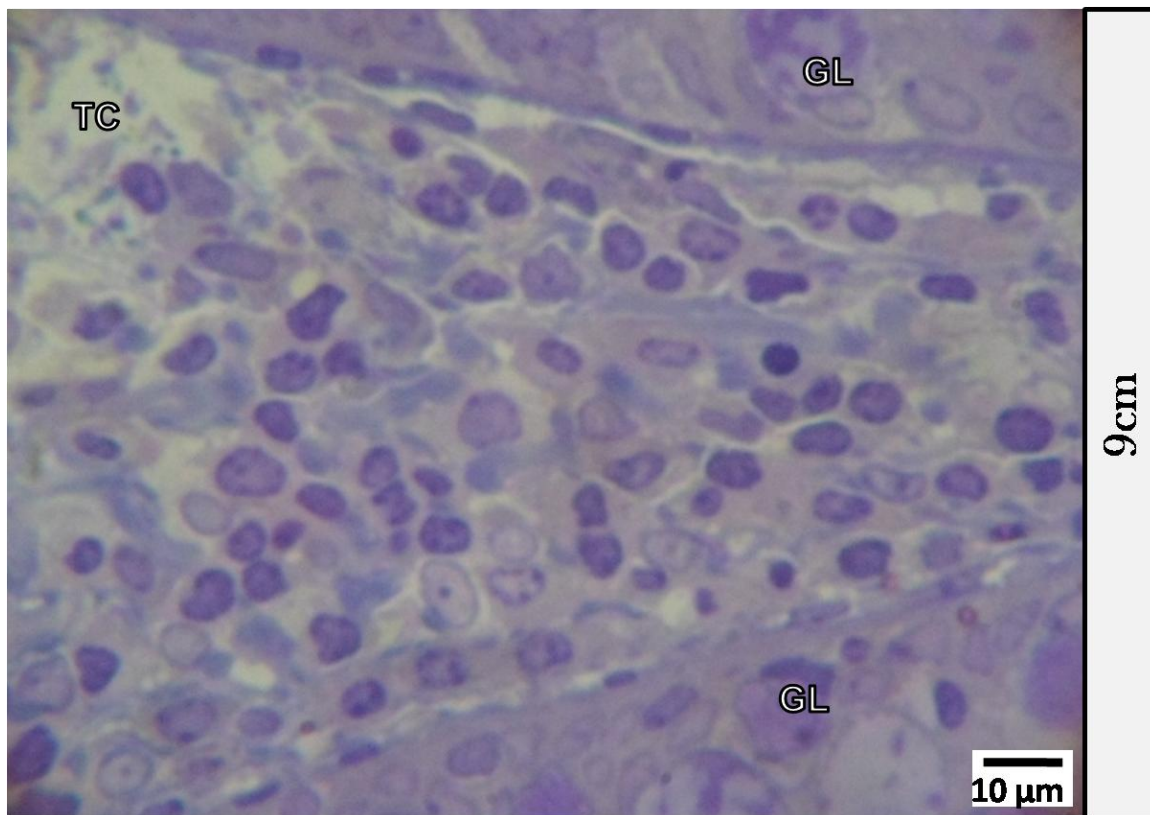


Figura 54. Corte longitudinal de mucosa de colon a 9 cm de el borde tumoral de paciente no tratado. Tejido conectivo (TC). Glándulas de Lieberkuhn (GL).

A esta distancia también se observó el engrosamiento de la membrana basal de los vasos sanguíneos (Fig. 55), haciendo de esta alteración, una de las más frecuentes a lo largo de todo el tejido estudiado.

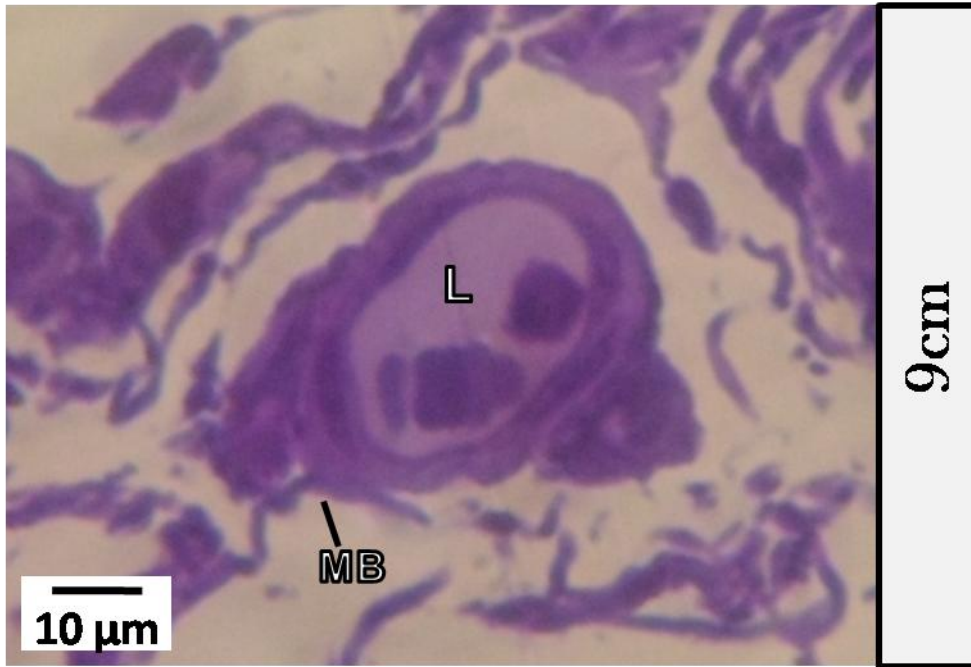


Figura 55. Corte transversal de capilar sanguíneo de la Submucosa del colon a 9 cm del borde tumoral de paciente no tratado. Membrana basal (MB). Luz del capilar (L).

Hallazgos ultraestructurales en la región peritumoral (9 cm):

Finalmente, la ultraestructura de este tejido mostro muy pocas alteraciones sub-celulares, sin embargo, en las células musculares lisas (Fig. 56) fue posible observar que a pesar de tener una morfología típica (con invaginaciones nucleares puntuales), todavía era posible observar algunas alteraciones organelares como edematización mitocondrial.

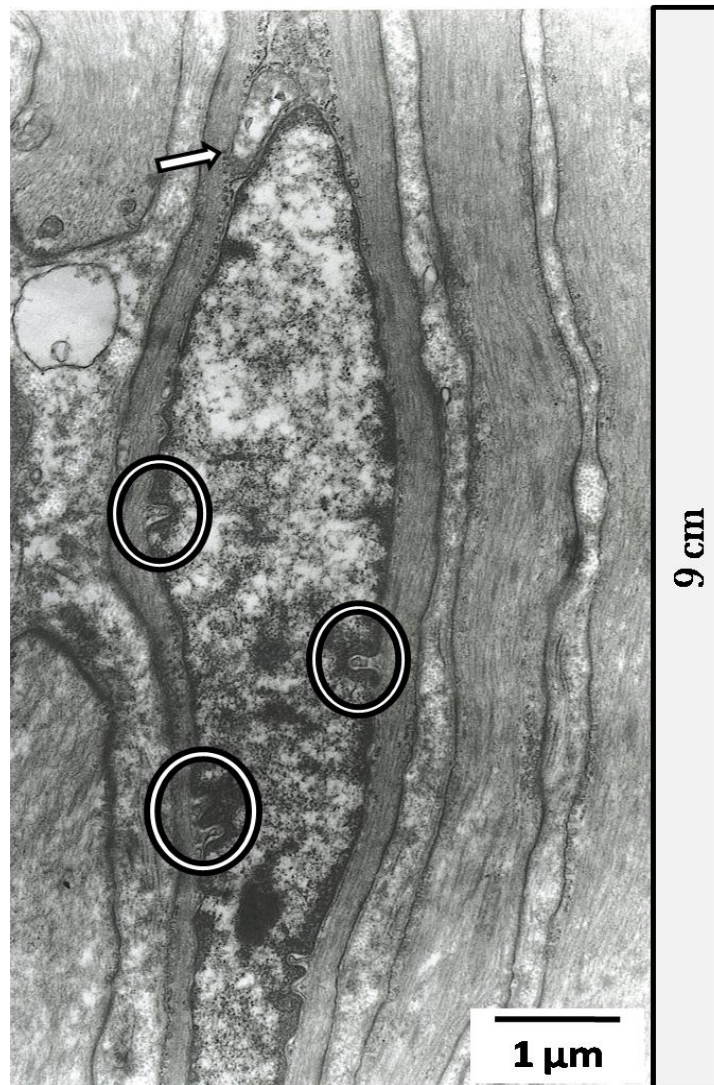


Figura 56. Micrografía de capilar sanguíneo a 9 cm del borde tumoral de paciente no tratado. Mitocondrias edematizadas (flecha). Invaginaciones nucleares (círculos).

Resultados estadísticos:

Técnicas de estadística descriptiva y analítica fueron utilizadas con el fin de realizar un análisis más completo sobre algunas de las alteraciones sub-celulares más comunes encontradas a lo largo de la extensión estudiada del colon.

En los gráficos 1 y 2 se puede apreciar que los valores correspondientes a la morfología de las mitocondrias y las cisternas de RER se comportan de manera similar.

En el caso del análisis del área mitocondrial (grafico 1) se observó inicialmente que en el tumor (cm 0) los valores de área obtenidos de pacientes tratados y no tratados son similares y se encuentran muy por encima del intervalo de referencia, indicando un incremento notable en el tamaño de las mitocondrias en el tumor que no parecía verse afectado por el tratamiento.

Al observar los valores recolectados de las muestras del tejido peritumoral (cm 1 a 4) se encontró que las mitocondrias de pacientes no tratados parecían cambiar drásticamente de tamaño, adoptando valores muy por debajo (cm 1), dentro (cm 2) y por encima (cm 3) del intervalo de referencia. En contraste con lo encontrado en pacientes no tratados, las mitocondrias de los pacientes tratados se mantuvieron ligeramente por debajo del intervalo de referencia, indicando la presencia de mitocondrias pequeñas a lo largo de los tejidos peritumorales (cm 1 al 4).

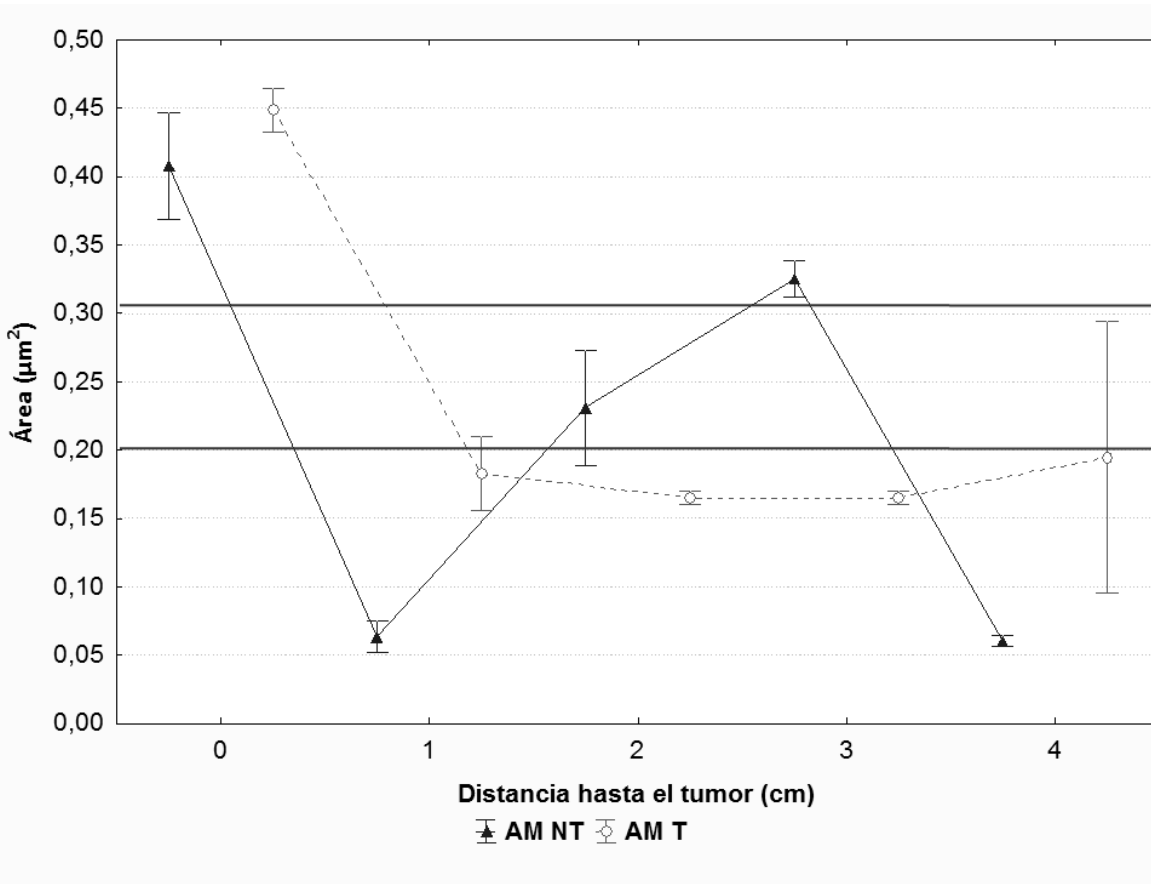


Grafico 1. Área mitocondrial vs distancia hasta el tumor. AM NT: datos de área mitocondrial de pacientes no tratados con quimioterapia o radioterapia. AM T: datos de área mitocondrial de pacientes tratados con radioterapia y quimioterapia. Líneas gruesas horizontales: rango de referencia para el área mitocondrial en condiciones normales. Bigotes/ Whiskers: representan un intervalo de 95% de confianza para el parámetro medido. Marcador: representa el valor de la media aritmética

Con relación al RER (grafico 2) se observó que el grosor de cisternas de retículo endoplasmático rugoso presentan un patrón similar al descrito para el área mitocondrial, es decir, que los valores de GR en el tumor (cm 0) para pacientes T y NT son muy elevados y similares entre sí mientras que en las zonas peritumorales evaluadas, las cisternas de los pacientes no tratados varían mucho en grosor dependiendo de la distancia al tumor, mientras que las de los pacientes tratados se mantienen con grosores más constantes a pesar de encontrarse dilatadas en comparación con el intervalo de referencia.

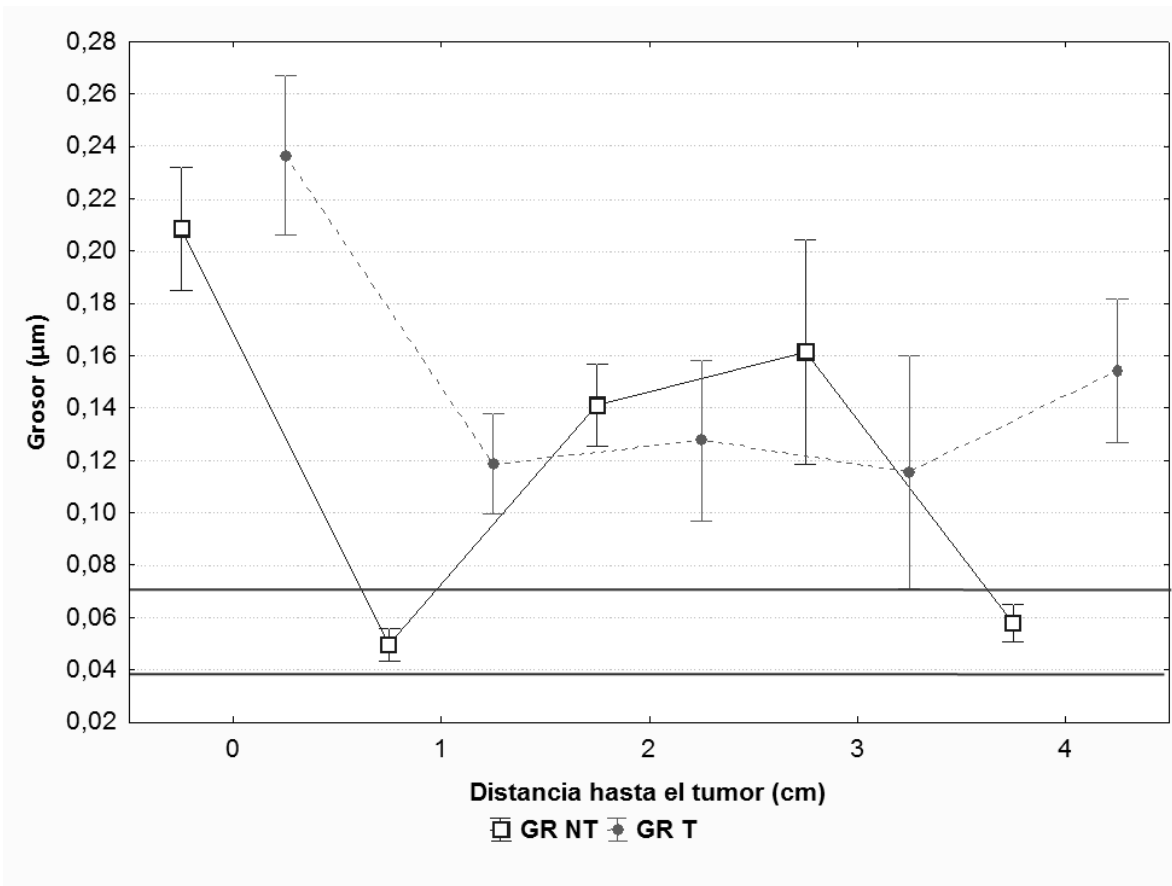


Grafico 2. Grosor de las cisternas de retículo endoplasmático rugoso (RER) vs distancia hasta el tumor. GR NT: Datos de grosor de RER de pacientes no tratados con quimioterapia o radioterapia. GR T: Datos de grosor de RER de pacientes tratados con radioterapia y quimioterapia. Líneas gruesas horizontales: rango de referencia para el grosor de RER en condiciones normales. Bigotes/ Whiskers: representan un intervalo de 95% de confianza para el parámetro medido. Marcador: representa el valor de la media aritmética.

Al realizar el análisis comparativo (ANOVA) tanto del área mitocondrial como del grosor de las cisternas de retículo (RER) en pacientes tratados y no tratados, encontramos que tanto en el caso de AM (Tabla 1) como en el de GR (Tabla 3), los valores recolectados del tumor revelan que con un $p > 0,05$, se aceptó la hipótesis nula y se pudo decir que el tratamiento no afecta el tamaño de las mitocondrias o el grosor de RER.

Al determinar el efecto del tratamiento y de la distancia sobre el AM mediante un ANOVA factorial (Tabla 2), se rechaza la hipótesis nula ($p < 0,05$) indicando que la distancia al tumor (DT) es el principal factor responsable por la variación en el tamaño de las mitocondrias.

Así mismo, se pudo evidenciar una interacción entre el tratamiento y la distancia al tumor, indicando que el efecto de DT es afectado por el tratamiento y cualquier efecto del tratamiento puede verse afectado por la DT.

Efecto	AM				
	SS	Grados de libertad	MS	F	p
Tratamiento	0,11381	1	0,11381	1,4548	0,228573
Error	27,53802	352	0,07823		

Tabla 1. Resultados de ANOVA de una vía para el parámetro AM (Área Mitocondrial) en la zona tumoral. SS= Suma de cuadrados. MS= Cuadrado de la Media. F= Estadístico F. p (0,05)= Probabilidad de comprobar la hipótesis nula con un nivel de significancia de 0,05.

Efecto	AM				
	SS	Grados de libertad	MS	F	p
Distancia al tumor (DT)	0,443413	3	0,147804	11,1288	0,000001
Tratamiento	0,001475	1	0,001475	0,1111	0,739190
DT*Tratamiento	0,660167	3	0,220056	16,5689	0,000000
Error	3,227334	243	0,013281		

Tabla 2. Resultados de ANOVA factorial para el parámetro AM (Área Mitocondrial) en la zona peritumoral. SS= Suma de cuadrados. MS= Cuadrado de la Media. F= Estadístico F. p (0,05)= Probabilidad de comprobar la hipótesis nula con un nivel de significancia de 0,05

En el caso de el GR, el ANOVA paramétrico (Tabla 4) indicó que con un $p < 0,05$ el tratamiento, la distancia al tumor y la presencia de una interacción entre estos últimos 2 factores (DT y Tratamiento) son todos elementos que causan cambios en el grosor de las cisternas de RER.

Efecto	GR				
	SS	Grados de libertad	MS	F	p
Tratamiento	0,008572	1	0,008572	0,3162	0,574488
Error	5,937030	219	0,027110		

Tabla 3. Resultados de ANOVA de una vía para el parámetro GR (Grosor de Retículo) en la zona tumoral. SS= Suma de cuadrados. MS= Cuadrado de la Media. F= Estadístico F. p (0,05)= Probabilidad de comprobar la hipótesis nula con un nivel de significancia de 0,05

Efecto	GR				
	SS	Grados de libertad	MS	F	p
Distancia al tumor (DT)	0,143840	3	0,047947	8,3772	0,000022
Tratamiento	0,033517	1	0,033517	5,8561	0,016059
DT*Tratamiento	0,162430	3	0,054143	9,4600	0,000005
Error	1,900181	332	0,005723		

Tabla 4. Resultados de ANOVA factorial para el parámetro GR (Grosor de Retículo) en la zona peritumoral. SS= Suma de cuadrados. MS= Cuadrado de la Media. F= Estadístico F. p (0,05)= Probabilidad de comprobar la hipótesis nula con un nivel de significancia de 0,05.

En los gráficos 3 y 4 se puede ver nuevamente una similitud en el patrón descrito por las alteraciones medidas. El grafico 3 correspondiente al parámetro área nuclear muestra una gran diferencia entre el tamaño de los núcleos de pacientes tratados y no tratados en el tumor, aquí los pacientes no tratados parecen tener núcleos muy agrandados, mientras que los tratados presentan un área nuclear dentro del intervalo de referencia. Lo mismo puede observarse en el grafico 4 en el caso del grosor de la membrana basal de capilares sanguíneos. En este caso en particular se observó que los pacientes tratados presentaron capilares con engrosamiento de la membrana basal, sin embargo, este grosor es menor al

encontrado en pacientes no tratados, indicando que los grupos estudiados en el tumor (t y NT) se observaron distintos pero aún por fuera del intervalo de referencia.

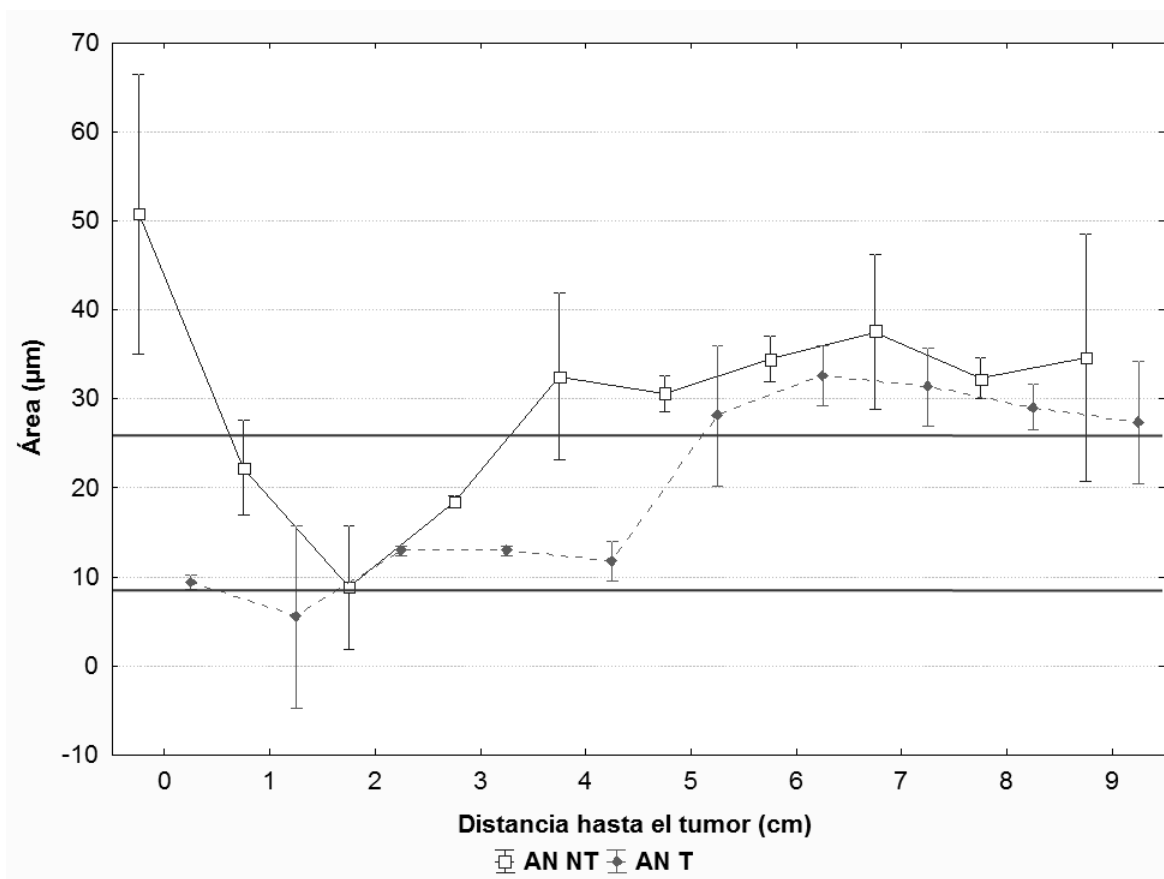


Grafico 3. Área nuclear vs distancia hasta el tumor. AN NT: datos de área nuclear de pacientes no tratados con quimioterapia o radioterapia. AN T: Datos de área nuclear de pacientes tratados con radioterapia y quimioterapia. Líneas gruesas horizontales: rango de referencia para el área nuclear en condiciones normales. Bigotes/ Whiskers: representan un intervalo de 95% de confianza para el parámetro medido. Marcador: representa el valor de la media aritmética

En el grafico 3 se observa que los núcleos de pacientes no tratados presentan valores más elevados que los de los tratados a partir del tercer centímetro peritumoral, sin embargo al incrementar la distancia al tumor, se puede notar que ambos grupos de interés (T y NT) comienzan a presentar valores similares (del cm 5 al 9).

En el grafico 4 puede verse que el grosor de membrana basal de los pacientes tratados parece mantenerse relativamente constante a lo largo del tejido peritumoral, sin embargo

presenta valores por fuera del intervalo de referencia, indicando una alteración de esta estructura. En el caso de los pacientes no tratados, se observa que el grosor de membrana basal varía más a lo largo del tejido, tal es el caso del segmento del cm 3 al 7 en donde hay una gran variación en el grosor con respecto a los pacientes tratados. A pesar de esto, al aproximarnos al cm 9 se puede ver que las membranas basales de los pacientes T y NT tienden a tener un grosor similar.

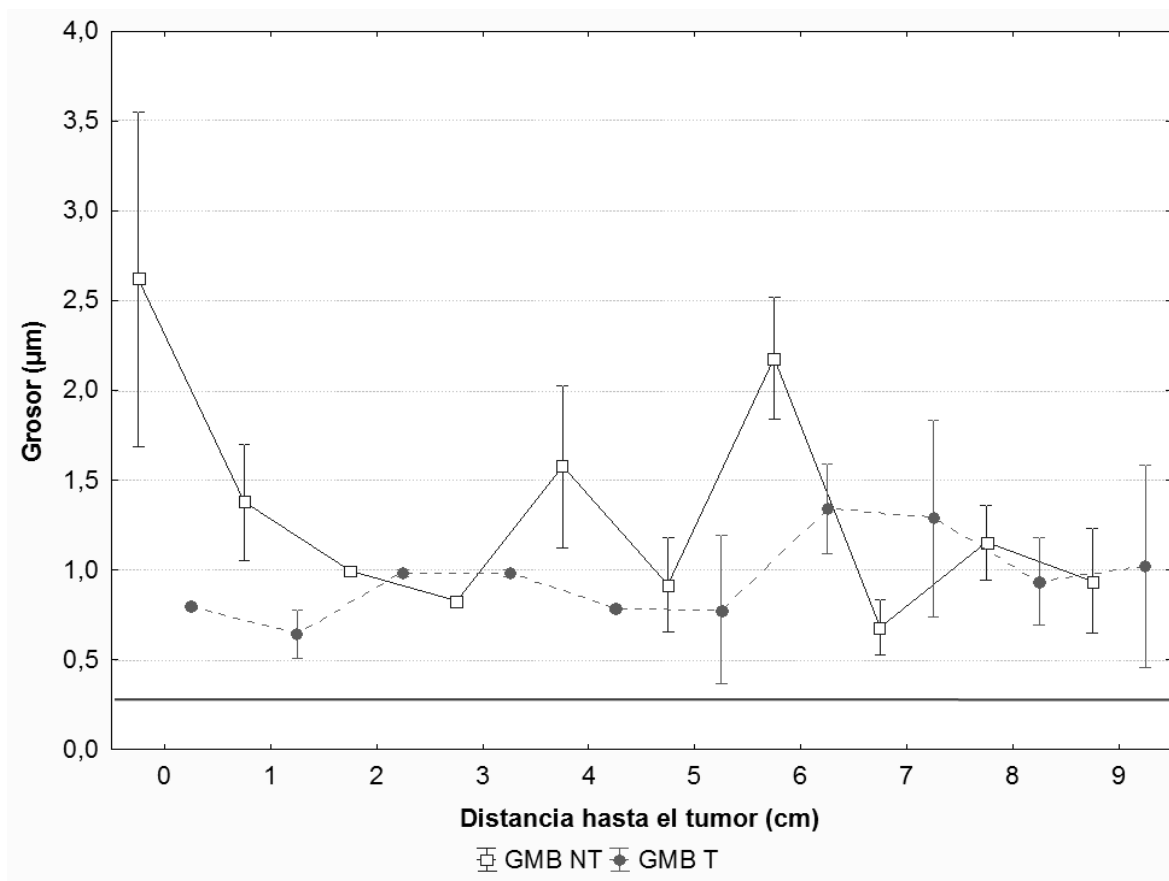


Grafico 4. Grosor de la membrana basal de capilares vs distancia hasta el tumor: *GMB NT*: Datos de grosor membrana basal de pacientes no tratados con quimioterapia o radioterapia. *GMB T*: Datos de grosor de membrana basal de pacientes tratados con radioterapia y quimioterapia. *Líneas gruesas horizontales*: rango de referencia para el grosor de la membrana basal de los capilares en condiciones normales. *Bigotes/ Whiskers*: representan un intervalo de 95% de confianza para el parámetro medido. *Marcador*: representa el valor de la media aritmética.

La estadística analítica de estas 2 alteraciones (AN y GMB) en el tumor (Tablas 5 y 7) reveló que con un $p < 0,05$ se rechaza la hipótesis nula, indicando que el tratamiento es el responsable por las diferencias en los valores de AN y GMB entre pacientes tratados y no tratados.

En el caso del tejido peritumoral los resultados para AN (Tabla 6) y GMB (Tabla 8) fueron iguales, con $p < 0,05$ se puede decir que el tratamiento, la distancia al tumor y la interacción entre estos últimos 2 factores son elementos que causan diferencias en el área nuclear y el grosor de la membrana basal de los capilares sanguíneos.

Efecto	AN				
	SS	Grados de libertad	MS	F	p
Tratamiento	26070,61	1	26070,61	29,87809	0,000001
Error	51481,41	59	872,57		

Tabla 5. Resultados de ANOVA de una vía para el parámetro AN (Área Nuclear) en la zona tumoral. SS= Suma de cuadrados. MS= Cuadrado de la Media. F= Estadístico F. p (0,05)= Probabilidad de comprobar la hipótesis nula con un nivel de significancia de 0,05.

Efecto	AN				
	SS	Grados de libertad	MS	F	p
Distancia al tumor	25589,4	8	3198,7	87,799	0,000000
Tratamiento	1614,4	1	1614,4	44,314	0,000000
DT*Tratamiento	2324,1	8	290,5	7,974	0,000000
Error	13443,4	369	36,4		

Tabla 6. Resultados de ANOVA factorial para el parámetro AN (Área Nuclear) en la zona peritumoral. SS= Suma de cuadrados. MS= Cuadrado de la Media. F= Estadístico F. p (0,05)= Probabilidad de comprobar la hipótesis nula con un nivel de significancia de 0,05.

Efecto	GMB				
	SS	Grados de libertad	MS	F	p
Tratamiento	10,2231	1	10,2231	1230,94	0,00
Error	1,1627	140	0,0083		

Tabla 7. Resultados de ANOVA de una vía para el parámetro GMB (Grosor de Membrana Basal) en la zona tumoral. SS= Suma de cuadrados. MS= Cuadrado de la Media. F= Estadístico F. p (0,05)= Probabilidad de comprobar la hipótesis nula con un nivel de significancia de 0,05.

Efecto	GMB				
	SS	Grados de libertad	MS	F	p
Distancia al tumor (DT)	53,3115	8	6,6639	27,579	0,000000
Tratamiento	1,2398	1	1,2398	5,131	0,023929
DT*Tratamiento	21,0414	8	2,6302	10,885	0,000000
Error	121,0563	501	0,2416		

Tabla 8. Resultados de ANOVA factorial para el parámetro GMB (Grosor de Membrana Basal) en la zona peritumoral. SS= Suma de cuadrados. MS= Cuadrado de la Media. F= Estadístico F. p (0,05)= Probabilidad de comprobar la hipótesis nula con un nivel de significancia de 0,05.

DISCUSIÓN

Cuando se comparan los resultados ultraestructurales, histológicos y estadísticos que se tienen hasta el momento, resulta evidente, que existen diferencias importantes tanto entre los pacientes tratados y no tratados, como entre la zona tumoral y la peritumoral.

La primera y más notable diferencia entre los grupos estudiados, puede observarse en el tumor. En este se lograron identificar varias estructuras asociadas con fenómenos de muerte celular (reducción e invaginación del núcleo, condensación de la cromatina, fragmentación del núcleo, autofagosomas de gran tamaño y diversa complejidad, pérdida de membrana plasmática limitante, cuerpos apoptóticos, entre otros).

De la misma manera, alteraciones comunes en procesos de muerte celular fueron encontradas a lo largo de la periferia tumoral estudiada, sin embargo, solo el cm 0 (Tumor) contuvo ejemplos para todas ellas y permitió detectar una tendencia entre los pacientes que han recibido el tratamiento y los que no.

Cuando se toman en cuenta los hallazgos ultraestructurales en el tumor, se encuentra que en ambos grupos de interés hay evidencias de procesos de muerte celular por apoptosis (cuerpos apoptóticos) y necrosis (ruptura de la membrana plasmática limitante). Sin embargo, la presencia de grandes cantidades de lisosomas y de autofagosomas de gran tamaño y variada complejidad (característica que es consistente con las señales del proceso de autofagia) solo han podido atribuírsele a las células de pacientes sin tratamiento y en la zona del tumor. Esto parece indicar que en los tejidos neoplásicos de pacientes tratados, es menos evidente un proceso autofágico.

El rol de la autofagia (también conocida como muerte celular tipo II) en el cáncer y su asociación con la muerte celular es controversial. Hasta el momento se considera que esta y la apoptosis existen como procesos con muchos elementos en común a nivel bioquímico, sin embargo, si la autofagia es en sí misma, un proceso de muerte celular, totalmente distinto de apoptosis y necrosis o si existe como una ruta alterna de muerte celular en ausencia de la apoptosis, todavía está en discusión (Edinger y Thompson, 2004).

Hoy en día se sabe que la autofagia tiende a ser desactivada en presencia de cáncer, aun cuando, mas y mas evidencia se acumula sugiriendo que el uso de quimioterapia y radioterapia en tumores en donde todavía hay actividad autofágica, promueve la liberación de ATP al medio extracelular, facilitando así la inmunogenicidad e incrementando la eficiencia neta del tratamiento (Michaud y col., 2011). Tomando esto en cuenta, pudiera considerarse que la presencia de un fuerte proceso autofágico en el tumor es una característica con implicaciones positivas para el paciente.

Al desplazarse del tumor a los primeros centímetros de tejido peritumoral, las señales más sugestivas de daño resultaron menos frecuentes. En lugar de displasia, pérdida de uniones intercelulares o la presencia simultánea de necrosis, apoptosis y autofagia, comenzaron a verse cambios a menor escala, como: pérdida de cuerpos densos en células musculares lisas, edematización mitocondrial, dilatación del retículo endoplasmático rugoso, disminución de vesículas en terminales nerviosos, entre otros. También se pudo observar la presencia de necrosis en el tejido peritumoral, sin embargo, la apoptosis y la autofagia no se detectaron.

La correlación microscópica es un método utilizado frecuentemente en aquellos casos en los que se desea tener información de una muestra, que una sola técnica de observación es incapaz de proveer. En este caso, el uso conjunto de la microscopía electrónica de transmisión y la microscopía de luz, permitió obtener información tanto de los distintos tejidos peritumorales, como de la ultraestructura de las células que los componen, facilitando así la evaluación de la condición de la muestra.

Al cotejar las observaciones histológicas y ultraestructurales, se revela que cada técnica presenta una realidad contrastante. Bajo el microscopio de luz, el tejido tumoral presenta características comunes para tejidos neoplásicos (displasia, núcleos anormales, frecuentes evidencias de mitosis, microvasculatura alterada, entre otros), sin embargo, el tejido peritumoral inmediato no presentó grandes alteraciones, con la excepción de algunos cambios en la morfología del núcleo como algunos bordes irregulares de la envoltura nuclear. La estructura del colon, así como la morfología de los tejidos que lo forman, no

parecen verse alterados, sin embargo, al evaluar a mayor distancia del tumor (entre 5 y 9 cm) se detectaron alteraciones, como él, engrosamiento de la membrana basal de capilares en la submucosa, cambios en la orientación de las fibras de musculo liso y una fuerte presencia de infiltrados en la mucosa, siendo este ultimo un indicador de un posible proceso inflamatorio.

La ultraestructura (en contraste con la histología) muestra que las áreas más próximas al tumor, presentan gran variedad de alteraciones e incluso revela la presencia de células que no se encuentran bien diferenciadas, indicando un posible proceso de invasión. Con esta técnica se pudieron detectar anomalías organelares que dentro del contexto del cáncer, han sido tomadas como importantes indicadores para el pronóstico del paciente como: la edematización mitocondrial y la dilatación del retículo endoplasmático rugoso (permiten evaluar la integridad de la capacidad de síntesis de proteínas y ATP, así como la disponibilidad de nutrientes en el medio) (Arismendi, 2012), presencia de prolongaciones citoplasmáticas no características (indicador de un proceso de invasión local), engrosamiento de la membrana basal de vasos sanguíneos (presencia de un elemento responsable de la muerte de múltiples generaciones de células endoteliales) entre otros.

La detección de células indiferenciadas a 1 cm del tejido tumoral, representa un hallazgo importante. Teniendo esto en cuenta, vale la pena mencionar que tanto la morfología como la organización (alineadas en una sola fila) de estas células son consistentes con las de células malignas invasoras en proceso de ingresar al torrente sanguíneo encontradas por en fibrohistiocitomas malignos (Finol y col, 1994).

Los hallazgos a nivel ultraestructural muestran que cuando nos alejamos del tumor, el tejido presenta pocas alteraciones sin embargo, fue posible encontrar unos pocos ejemplos de organelos alterados (mitocondrias), indicando que este tipo de alteraciones organelares pueden encontrarse a grandes distancias del tumor principal.

Las mediciones del área mitocondrial (AM) revelaron un comportamiento muy distinto entre el tumor y el tejido peritumoral. Inicialmente se observó que en el tejido neoplásico los resultados tanto en pacientes tratados (T) como en los no tratados (NT) revelan la

presencia de mitocondrias dilatadas, de entre estas, las más alteradas y menos diversas se encontraron en los pacientes tratados, sin embargo, desde el punto de vista estadístico, no se encontró diferencias significativas al comparar ambos grupos por lo que se puede decir que en el tumor la alteración del AM es más intensa que en cualquier otro punto estudiado y en esta zona, el tratamiento no parece producir cambios morfológicos relevantes.

Al igual que en el tumor, en el tejido peritumoral no hubo diferencias significativas entre pacientes T y NT, por efecto del tratamiento, sin embargo, hay variaciones significativas dependiendo del punto muestreado, indicando que la distancia entre el borde del tumor y el punto de muestreo afecta el AM. Esto se refleja en el Grafico 1, donde hay variación entre los valores en las diferentes zonas peritumorales de T y NT.

La edematización del área mitocondrial es una alteración ultraestructural muy común para muchas patologías. Se entiende que a medida que incrementa el área mitocondrial, se pierde la capacidad de sintetizar ATP e incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), lo cual en tejidos no neoplásicos es señal de una pronta muerte celular, fuerte estrés y un incremento en la probabilidad de daño al ADN, sin embargo, en el contexto de un tumor establecido, esta anomalía tiende a relacionarse con un incremento en la agresividad tumoral, cambio a un metabolismo basado solo en la glucólisis (Samudio y col., 2009) e incluso resistencia a ciertos tipos de quimioterapia y radioterapia (Trachootham y col., 2009), convirtiéndola entonces en una alteración que indica estrés oxidativo en el tejido y favorece la progresión del proceso neoplásico (Arismendi, 2012).

Poco es conocido sobre las consecuencias de la edematización mitocondrial dentro de las células en tejido peritumoral, más allá de su asociación con la disminución en la síntesis de ATP, sin embargo, se sabe que mitocondrias de pequeña área (a pesar de ser consideradas como anormales), todavía retienen su capacidad de síntesis de ATP (Arismendi, 2009), por lo que se puede decir que a pesar de que en los cm 1 y 4 del tumor se tienen evidencias de sub-poblaciones de mitocondrias muy pequeñas, estas puede que todavía posean un metabolismo basado en la fosforilación oxidativa.

La elongación de mitocondrias fue otra alteración encontrada en células musculares de la periferia tumoral, esta anomalía en particular han sido sugerida como un tipo de “preparación” para la autofagia, puesto que estas tienden a ser resistentes a la mitofagia y mantienen la viabilidad celular (Gómez y col., 2011). El encontrar esta alteración indica entonces que el medio se encuentra bajo en nutrientes y la célula pronto comenzará en consecuencia, la autodigestión.

En el tumor, al igual que el AM, el grosor de RER (GR) no mostró diferencias basadas en el tratamiento, sin embargo, en el área peritumoral se encontró diferencias en el GR, entre los pacientes T y NT; basadas en el tratamiento, la distancia al tumor y en la interacción entre estos 2 factores, indicando que las diferencias encontradas a una determinada distancia al tumor son causadas por el tratamiento y los efectos del tratamiento son influidos por la distancia al tumor. Vale la pena mencionar que en todo los pacientes evaluados, tanto el área mitocondrial como el grosor del RER, se mantienen alterados, sin embargo en los tratados, el GR de los pacientes tratados se mantiene más constante.

La excesiva dilatación del RER en el contexto del cáncer tiende a asociarse con la pérdida o inhibición de la ruta de señalización para la muerte celular iniciada por el estrés del retículo. Esta alteración tiende a producirse por el inapropiado doblamiento de las proteínas durante su maduración y la posterior acumulación de ellas en la luz de la cisterna como consecuencia (Ron y Walter, 2007). Tomando esto en consideración, puede decirse que los puntos muestreados con cisternas de mayor grosor pueden presentar alteraciones en su maquinaria de síntesis proteica.

En cuanto al grosor de la membrana basal de los vasos sanguíneos (GMB), se pudo observar que independientemente del punto muestreado o el grupo de pacientes, todos los valores resultaron superiores al valor de referencia. Nuevamente pudo observarse que los valores recolectados de los pacientes tratados se mantuvieron menos variables que los de los NT a lo largo del segmento de tejido estudiado. El análisis estadístico confirmó que los valores de T y NT tanto en el tumor como en la periferia se encuentran influenciados por el

tratamiento, la distancia al tumor (DT) y la interacción entre ambas variables (tratamiento y DT).

El incremento del GMB es una alteración muy común que puede ser detectada mediante histología o microscopía electrónica de transmisión. Esta se ha podido observar en casos en los que el endotelio, a causa de algún elemento de estrés, experimenta muerte celular sin que ocurra la degradación de la membrana basal que le daba soporte físico (Cooper y Goodman., 1974), siendo también engrosada en enfermedades autoinmunes o con compromiso autoinmune como el cáncer (Finol y col., 2005).

A pesar de ser una alteración muy común, poco se ha investigado sobre las causas o los mecanismos detrás del engrosamiento de la membrana basal de vasos sanguíneos, especialmente en tejidos peritumorales (Finol y col., 2003; Sierra y col., 2013), sin embargo, estudios relacionados con la vascularización tumoral han identificado este evento como “proliferación microvascular glomerular” y la han caracterizado como un apilamiento de múltiples capas de membrana basal, hiperpermeables y con poca irrigación, lo cual causa que haya poca trasvasación de plasma. Han sido asociados principalmente con un mal pronóstico para el paciente (Nagy y col., 2009).

Los resultados parecen apuntar a un tumor con fuerte engrosamiento de membrana basal y una periferia tumoral con eventos de engrosamiento menos severos y esporádicos, cuyos valores oscilan ampliamente en las zonas más cercanas al tumor y se estabilizan en los puntos más distantes.

El área nuclear también fue evaluada. Los núcleos de mayor tamaño se registraron en pacientes NT y se encontraron en el tumor, los T en este punto no presentaron valores alterados. En el tejido tumoral inmediato se detectaron valores normales, sin embargo, en los puntos muestreados más distantes, el AN de T y NT presentaron un comportamiento similar, con valores justo por encima del intervalo de referencia, nuevamente, los T presentaron valores con menor oscilación que los NT.

El análisis estadístico reveló que en el tumor y en la periferia, el tratamiento, la distancia al tumor y la interacción entre ambos elementos influyen en las diferencias entre T y NT. En este caso, las diferencias entre T y NT en el tumor son muy evidentes y por tanto es fácil el decir que el tratamiento parece haber tenido un efecto normalizador sobre el tejido tumoral.

Considerando que en múltiples casos, los valores obtenidos en los centímetros más distantes al tumor de los parámetros medidos tienden a presentar un comportamiento similar y ligeramente alterado, y el hecho de la presencia de evidencias de un proceso inflamatorio a lo largo de todo el tejido estudiado, vale la pena tomar en consideración a la inflamación como una posible fuente de alteraciones morfológicas en interacción con la influencia del tumor.

Al momento de observar las características histológicas y ultraestructurales del cáncer colorrectal, hay que tener en consideración que este, a nivel de alteraciones morfológicas, tiene mucho en común con diferentes manifestaciones de la respuesta inmune en el órgano de interés. Esto implica que al estudiar el tejido peritumoral, es natural el preguntarse si una alteración observada es directa consecuencia de la influencia del tumor en cuestión o simplemente de la inflamación crónica.

Algunas de las alteraciones morfológicas que han sido observadas en este estudio y que también se pueden observar (con algunas diferencias en magnitud y frecuencia) en procesos inflamatorios son: cambios en la arquitectura del tejido, infiltración de neutrófilos, dilatación del retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias edematizadas y reduplicación de la membrana basal (O'Connor, 1972).

El campo de la investigación que se concentra en la conexión entre el cáncer y la inflamación es uno que se desarrolla rápidamente. Desde principios del siglo 19 se sabe que existe una asociación entre los 2 procesos, sin embargo, solo recientemente se han empezado a revelar los mecanismos involucrados en esta relación. Entre las nociones que han surgido del análisis de la inflamación asociada al cáncer, se encuentra la idea de que para que todo grupo de células malignas puedan generar un tumor, deben primero adquirir un grupo de capacidades que les permitan prosperar en un microambiente de inflamación crónica (Cavallo y col., 2011).

Esto, unido al hecho de que la inflamación y el cáncer pueden encontrarse juntos aún sin la presencia de un estímulo inflamatorio externo o una causalidad epidemiológica y la tendencia a una sobreexpresión de citoquinas proinflamatorias por parte del estroma tumoral, se han convertido en fuertes evidencias para el argumento de la inflamación asociada al cáncer como la consecuencia de una relación íntima y parcializada entre las células tumorales y la respuesta inmune que favorece la progresión del proceso neoplásico (Colotta y col., 2009; Cavallo y col., 2011).

Se pudiese considerar entonces la inflamación, como un proceso que es promovido por el tejido tumoral, incrementa el riesgo de la aparición de neoplasias, favorece el progreso del cáncer y cuya interacción con este a nivel bioquímico es tal que el discernir entre los orígenes de las alteraciones (por influencia del tumor o influencia de la inflamación) únicamente por su morfología, es imposible.

Al reflexionar sobre las distintas evidencias de daño celular en el tumor y en el tejido adyacente y las distintas implicaciones y procesos asociados a las mismas, es evidente que un estudio de correlación microscópica (óptica y electrónica) es una herramienta muy útil para la detección de señales de riesgo en el tejido que pudiesen eventualmente traer problemas para el paciente, ya sea con el fin de diseñar un tratamiento más personalizado y eficiente o el de evaluar la extensión del daño para determinar la cantidad de tejido a resear y así evitar o disminuir la probabilidad de recurrencia local.

Como se mencionó anteriormente, en los puntos muestreados más distantes al tumor todavía fue posible detectar alteraciones histológicas y ultraestructurales. En casos de exanimación histopatológica rutinaria para operaciones de pacientes con cáncer colorrectal, la detección de alteraciones en el punto de corte tiende a ser razón suficiente como para ampliar los márgenes de resección puesto que idealmente se busca que el corte se realice sobre tejido totalmente sano. Sin embargo, se ha observado que la extensión de tejido peritumoral alterado puede ser muy amplia cuando se toma en consideración la dimensión ultraestructural, por tanto, el continuar utilizando el estándar anterior para los márgenes de resección puede (en ciertos casos) traer más consecuencias negativas para el paciente en lugar de ayudarle.

Lo anterior llama entonces a realizar una evaluación mas critica del daño del tejido para determinar el si es prudente el extraerlo del paciente, es decir, si luego de evaluar una longitud considerable del órgano, el tejido sigue presentando alteraciones, (con el fin de evitar causar un daño extensivo y permanente al paciente) puede que se vuelva necesario el realizar un compromiso en el cual, solamente la presencia de una alteración no sea suficiente como para incrementar la cantidad de tejido a remover, sino que también otros elementos deberían ser tomados en consideración como la intensidad de las anomalías detectadas, así como su frecuencia y diversidad, entendiéndose esta última punto como la presencia de otras alteraciones de distinta naturaleza que a su vez deberán ser evaluadas por los parámetros ya mencionados.

Con relación al tratamiento, se pudo observar que el tejido tumoral tratado con quimioterapia y radioterapia aún puede ser considerado como severamente alterado solamente tomando en cuenta los parámetros estadísticos evaluados (GR y AM), lo cual es esperado. Aun así, si se pudo detectar algunos cambios en estos parámetros a causa del tratamiento (GMB y AN), lo cual apoya la practica en la que el tejido tumoral tratado es extraído del paciente a pesar de haber reaccionado muy favorablemente a la quimioterapia y radioterapia.

Se pudieron determinar varios tipos de muerte celular en el tumor, la apoptosis, la necrosis y la autofagia. De entre estas la autofagia es la única que solo pudo encontrarse en pacientes no tratados y dentro del tumor. Considerando su asociación con un pronóstico positivo para el paciente, una evaluación ultraestructural con el fin de la determinación de la presencia o ausencia de este proceso pudiera ser recomendada.

Finalmente, con relación a las observaciones comparativas entre el tumor y la periferia tumoral, las dos zonas estudiadas se comportaron de maneras muy diferentes. En la zona tumoral se pudo observar una gran variedad de alteraciones, muy severas (muy por encima de el intervalo de referencia en el caso de AM, GR, AN y GMB) y frecuentes, en especial las anomalías de organelos. Los efectos del tratamiento resultaron, en ocasiones, en

cambios muy drásticos, los cuales causaban un registro de valores normales (dentro o muy cerca del intervalo de referencia) o no causaban ningún cambio apreciable.

En el caso del tejido peritumoral, las alteraciones variaron mucho en magnitud y frecuencia dependiendo del punto muestreado, así como del tratamiento, sin embargo, en esta extensión la frecuencia de alteraciones disminuyó significativamente y no pudo detectarse ninguna anomalía única que la diferenciase de la zona tumoral. Pudo observarse que a mayor proximidad del tumor, los valores medidos correspondientes a la morfología de estructuras subcelulares en los pacientes NT parecían variar más y viceversa. En los pacientes tratados no se observó el mismo fenómeno, el tratamiento en este caso parecía causar una estabilización en los valores. Esto pudiese interpretarse como el reflejo de un tejido alterado a consecuencia de un fuerte estrés crónico al cual se le ha removido una importante fuente de anomalías.

CONCLUSIONES

1. Aun cuando el paciente ha sido tratado, a nivel tumoral, el epitelio puede presentar características indicadoras de dediferenciacion típica del proceso neoplásico, así mismo en relación a la microvasculatura, se reflejan evidencias de estrés tisular.
2. En el tejido peritumoral de pacientes diagnosticados con Adenocarcinoma colorrectal y tratados con quimioterapia y radioterapia, las células musculares lisas pueden presentar múltiples evidencias de atrofia tanto a nivel histológico como ultraestructural, mientras que el epitelio puede no presentar señales que indiquen daños graves al tejido. El endotelio, sin embargo, parece mantenerse alterado.
3. En individuos que han sido tratados con quimioterapia y radioterapia, las evidencias de un intenso proceso autofágico en el tejido neoplásico parecen ser menos comunes
4. En el tejido periférico a los Adenocarcinomas colorrectales se pudieron detectar evidencias asociadas a procesos de muerte celular por necrosis (ruptura de membrana plasmática limitante).
5. El estudio puramente histológico en pacientes diagnosticados con Adenocarcinomas colorrectales es insuficiente para la detección de alteraciones en el tejido peritumoral de individuos tratados y no tratados con quimioterapia y radioterapia y puede llevar a la incorrecta clasificación de un paciente como sano, lo cual incrementa la probabilidad de recurrencia local.
6. Las alteraciones ultraestructurales en el tejido peritumoral de pacientes tratados y no tratados pueden encontrarse a grandes distancias del Adenocarcinoma.
7. El uso de radioterapia y quimioterapia tiene un efecto aparentemente positivo en el tejido tumoral y peritumoral, sin embargo, ambas zonas se mantienen alteradas aun después del tratamiento.

Recomendaciones.

1. Al establecer los márgenes de resección en pacientes con Adenocarcinoma de colon, pudiera ser necesario el considerar la presencia de un posible solapamiento entre las alteraciones ultraestructurales causadas por la influencia indirecta del tumor y aquellas generadas por efecto de la inflamación crónica en casos en los cuales la cantidad de tejido a extraer implique consecuencias negativas, graves y permanentes para el paciente.

ANEXOS

Planilla de consentimiento informado

CODIFICACIÓN	
---------------------	--

Consentimiento para la Participación en el Protocolo de Investigación:

ULTRAESTRUCTURA DE ADENOCARCINOMAS COLORECTALES Y SUS EFECTOS PERITUMORALES

Primera Parte: De la descripción de la propuesta de investigación.

1. El tratamiento más común empleado en pacientes con tumores de recto o colon es la extracción del tumor. Como el tamaño del tumor varía de caso en caso, es importante determinar la extensión de la zona afectada. La recolección de muestras de pacientes a los que se les ha aplicado tal cirugía y su observación bajo un microscopio electrónico permite detectar alteraciones tanto en el tumor como en sus alrededores que bajo el microscopio común serían difíciles de observar. La participación de pacientes en este proyecto, contribuirá a la obtención de conocimientos sobre alteraciones en el tejido peritumoral.
2. La recolección de muestras es un procedimiento realizado al tejido ya extraído y por lo tanto no implica ningún tipo de riesgo agregado para el paciente, así también se aclara que la investigación no incluye pruebas con fármacos de ninguna clase. Se asegura también que los datos personales del paciente serán tratados como confidenciales mediante el uso de un sistema de codificación a fin de proteger su identidad y el guardado de toda la información referente en un lugar de almacenamiento seguro. La participación del paciente en la investigación es absolutamente voluntaria y su decisión de no participar en ella no traerá ninguna consecuencia negativa ni pérdida de algún beneficio.
3. El participante estará amparado por: La constitución de la República Bolivariana de Venezuela, la ley del código civil, ley de ejercicio de la medicina y en caso de ser menor de edad por la ley orgánica para la protección de niños, niñas y adolescentes.

Objetivos específicos de la investigación:

- Determinar las alteraciones presentes en las células epiteliales, microvasculatura e innervación en el tumor de pacientes afectados por tumores colorrectales.

A continuación, se presenta la descripción detallada del procedimiento de investigación

Historia Clínica

Se realizará una encuesta médica con formato de historia clínica según el modelo del Hospital Universitario de Caracas para recolectar datos personales, familiares, epidemiológicos y clínicos. La

información contenida en esta historia clínica es absolutamente confidencial, la información referente al paciente se colocara bajo una codificación específica y será almacenada bajo llave.

Toma de Muestra

Las resecciones locales serán colectadas al momento de la intervención quirúrgica por el cirujano, los procedimientos de toma de muestras no implican ningún riesgo agregado para el paciente.

Personal responsable

Los pacientes que decidan participar en el presente estudio se encontraran bajo la responsabilidad del Dr. Carlos Sardiñas de la Unidad de Coloproctología del Hospital Universitario de Caracas. Tlf.0212-606(5350/72187826) en horario de 8 a.m a 11 a.m. En caso de que el paciente desee tener acceso a los resultados originados de su muestra, deberá ponerse en contacto con el personal responsable ya mencionado en este párrafo.

4. Plan de trabajo:

Recopilación estándar de los datos clínicos por parte del médico responsable y recolección de las primeras muestras de tejido resecado. Procesamiento de las mismas de acuerdo a los protocolos de microscopia electrónica para muestras biológicas.

Este estudio no comprende pruebas con fármacos ni procedimientos quirúrgicos.

El estudio consiste solamente en el análisis del tejido recolectado mediante observaciones bajo el microscopio y por tanto, no se realizaran protocolos ajenos a eso.

Su participación es voluntaria y puede, con todo su derecho, tomar la decisión de retirarse en cualquier momento de la investigación sin que ello conlleve represalias o pérdida de algún beneficio.

Todos los datos mantendrán el compromiso de confidencialidad y sin causar identificación o daño personal mediante los métodos descritos anteriormente (codificación y almacenamiento bajo llave).

Cuando el paciente así lo desee, podrá solicitar la información obtenida de su muestra de tejido al médico responsable.

Segunda Parte: De la comprensión del proyecto de investigación por parte del participante y su **CONSENTIMIENTO** informado.

Declaro que se me ha explicado el propósito y los términos de mi participación en el proyecto de investigación **“Ultraestructura De Adenocarcinomas Colorrectales Y Sus Efectos Peritumorales”**.

Declaro entender también que mi participación es voluntaria y que en cualquier momento de la investigación, puedo retirarme de la misma si así lo deseo, sin que mi decisión conlleve a represalias o a la pérdida de cualquier beneficio como producto de la investigación.

Así lo declaro y firmo a los ____ días del mes de _____ del año 20____.

<u>DEL PACIENTE</u>	
Firma	
Huella (en caso de no poder firmar)	
<u>DEL TESTIGO O RESPONSABLE</u>	
Relación con el paciente	
Firma	
Huella (en caso de no poder firmar)	
<u>DEL DOCTOR</u>	
Nombre y apellido	
Cédula de Identidad	

Firma	
Especialidad	

BIBLIOGRAFÍA

- **Abulafi, A. M., Williams, N. S. 1994.** Local recurrence of colorectal cancer: the problem, mechanism, management and adjuvant therapy. *Brit. J. Surg.* **81**: 7-19.
- **Adami, H. O., Ekobom, A., Helmick, C., Zack, M. 1990.** Increased risk of large bowel cancer in Cohn's disease with colonic involvement. *Lancet.* **336**: 357-359.
- **Ahlquist, D., Harrington, J., Burgart, L., Roche, P. 2000.** Morphometric analysis of the mucocellular layer overlying colorectal cancer and normal mucosa: Relevance to exfoliation and stool screening. **31**: 51-57.
- **Alvaro, A., Bigas, M. R., Petrelli, N. J., Weber, T. K. 1996.** Adenosquamous carcinoma of the colon and rectum. *Dis. Colon and Rectum.* **39**: 1265-1268.
- **Arai, T., Kino, I. 2008.** Morphometrical and cell kinetics studies of normal colorectal mucosa. *Pathol. Int.* **39**: 725-730.
- **Arborgh, B., Bel, P., Brunk, U., Collins, V. P. 1976.** The osmotic effect of glutaraldehyde during fixation. A transmission electron microscopy, scanning electron microscopy and cytochemical study. *J Ultrastruct. Res.* **56**: 339-250.
- **Arismendi, G. 2009.** Electron microscopy morphology of the mitochondrial network in human cancer. *Int J Biochem Cell B.* **41**: 2062-2068.
- **Arismendi, G. 2012.** Mitochondrial Network in Glioma's Invadopodia Displays an Activated State Both in Situ and in Vitro: Potential Functional Implications. *Ultrastruct Pathol.* **36**: 409-414.
- **Armengol, J. G., Garcia-Granero, E., Lledó-Matoses, S. 2003.** Tratamiento quirúrgico y resultados del cáncer de recto. *Cir. Esp.* **73**: 25-29.

- **Bodian, C., Gupta, B. R., Harpaz, N., Hossain, S., Izkowitz, S., Kornbluth, A., Matula, S., Ullman, T. 2007.** Histologic Inflammation Is a Risk Factor for Progression to Colorectal Neoplasia in Ulcerative Colitis: A Cohort Study. *Gastroenterology*. **133**: 1099-1105.
- **Bozzola, J. J., Russell, D. L. 1999.** Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists. Jones and Barlett Books, Segunda Edicion, Ontario, Canada.
- **Bujko, K., Chmielik, E., Guttmejer, N. A., Huzarski, T., Karmolinski, A., Kepka, L., Nowacki, Marek. 2006.** Distal intramural spread of rectal cancer after preoperative radiotherapy: the results of a multicenter randomized clinical study. *Radiation. Oncology. Biol. Phys.* **65**: 182-188.
- **Burdette, J. W. 1970.** Carcinoma of the colon and antecedent epithelium. *Cancer. Res.* **30**: 253-256.
- **Caffarey, S. M., Cawthorn, S. J. 1990.** Extent of mesorectal spread and involvement of lateral resection margin as prognostic factors after surgery for rectal cancer. *Lancet*. **335**: 1055-1059.
- **Camma, C., Cottone, M., Craxi, A., Fiorica, F., Pagliaro, L. 2000.** Preoperative radiotherapy form resectable rectal cancer. *J. Am. Med. Assoc.* **284**: 1008-1015.
- **Carey, F. A., Leslie, A., Pratt, N. R., Steele, R. J. 2002.** The colorectal adenoma – carcinoma sequence. *Brit. J. Surg.* **89**: 845-860.

- **Cass, A. W., Million, R. R., Pfaff, W. W. 1976.** Patterns of recurrence following surgery alone for Adenocarcinoma of the colon and rectum. *Cancer*.**37**: 2861-2865.
- **Cavallo, F., De Giovanni, C., Nanni, P., Forni, G., Lollini, P. 2011.** 2011: The immune hallmarks of cáncer. *Cancer. Immunol. Immuother.* **60**:319-326.
- **Cervantes, A., Chirivella, I., Garcia-Granero. 2003.** Cáncer de colon y recto: Concepos actuales en la patogenia, diagnostico precoz, estudio de extensión, pronostico y tratamiento. *Rev. Med. Univ. Navarra.* **47**: 64-68.
- **Chiriva-Internati, M., Frezza, N. N. Wachtel, M. S. 2005.** Influence of obesity on the risk of developing colon cancer. *Gut.* **55**: 285-291.
- **Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., Mantovani, A. 2009.** Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis.* **9**: 1073-1081.
- **Cooper, P., Goodman, D. 1974.** Multilayering Of The Capillary Basal Lámina In The Granular Cell Tumor. *Hum Pathol.* **5**: 327-338.
- **Dominguez, I. F. 2004.** Como puede evaluar el patólogo si la exéresis del meso-recto y del carcinoma rectal ha sido adecuada. *Oncología.* **27**: 217-219.
- **Edinger, A., Thompson, C. 2004.** Death by desing: Apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell. Biol.* **16**: 663-669.
- **Fielding, L. P. 1988.** Clinical-pathological staging of large bowel cancer: A report of the ASCRS committee. *Dis. Colon. Rectum.* **31**: 204-209.

- **Finol, H. J., Gledhill, T., Parada, D., Lopez, C., Moreira, O. 2003.** Ultrastructural pathology of smooth muscle tissue surrounding prostatic adenocarcinoma. *Microsc. Microanal.* **9** (supl): 1400-1401.
- **Finol, H. J., Marquez, A., Bello, B., Rivera, H., 1994.** Ultrastructure of skeletal muscle alterations surrounding malignant fibrous histiocytoma. *J. Exp. Clin. Cancer. Res.* **13**: 381-384.
- **Finol, H., Tonino, P., Cedeño, F. 2005.** Microvasculature ultrastructure in premalignant and malignant lesions of oral mucosa. *Acta. Odontol. Venez.* **44**: 25-28.
- **Galiano de Sánchez, M. T. 2005.** Cancer colorrectal (CCR). *Rev. Col. Gastroenterol.* **20**: 43-53.
- **Gill, S., Goldberg, M., Thomas, R. R. 2003.** Review article: colorectal cancer chemotherapy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **18**: 683-692.
- **Gomez, L., Di Benedetto, G., Scorrano, L. 2011.** During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat. Cell. Biol.* **13**: 589-598.
- **Grizzi, F., Bianchi, P., Malesci, A., Laghi, L. 2013.** Prognostic value of innate and adaptative immunity in colorectal cáncer. *World. J. Gastroentero.* **19**: 174-183.
- **Hajdu, S. 2011.** A note from history: Landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer.* **117**: 1097-1102.
- **Hanahan, R., Weinberg, R. A. 2000.** The hallmarks of cancer. *Cell.* **100**: 57-70.

- **Heinz, D. 1988.** Rudolf Virchow and modern aspects of tumor pathology. *Path. Res. Pract.* **183**: 356-364.
- **Henry, J., Dive, C., Martiou, J., James, D. 2012.** Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. *Oncogene.* **23**: 2850-2860.
- **Herold, K. E., Rasooly, A. 2012.** Biosensors and molecular technologies for cancer diagnostics. CRC press. Primera edición. London, England.
- **Karbowski, M., Youle, R.J. 2003.** Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Nature.* **10**: 870-880.
- **Karnovsky, M. J. 1965.** A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* **27**: **137**.
- **Kiernan, J. A. 2000.** Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What are they and what they do. *Microsc. Today.* **1**: 8-12.
- **Lanza, G., Messerini, L., Gafa, R., Risio, M. 2011.** Colorectal tumors: The histology report. *Digest. Liver. Dis.* **43**: 344-355.
- **Latarjet, M., Ruiz, A. I. 2004.** Anatomía Humana. Editorial Médica Panamericana. Cuarta Edición. Mexico D.F, Mexico.
- **Michaud, M., Martins, I., Sukkurwala, A., Adjemian, S., Ma, Y., Pellegatti, P., et al. 2011.** Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science* **334**:**1573–7**.
- **Millonig, G. A. 1961.** A modified procedure for lead staining of thin sections. *J. Biophys. Biochem Cytol.* **32**: 1637.
- **Nagy, J., Chang, S., Dvorak, A., Dvorak, H. 2009.** Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? *Brit. J. Cancer.* **100**: **865 – 869**.

- **O'Connor, J. 1972.** An electron microscopy study of inflammatory colonic disease. *Dis. Col & Rect.* **15:** 265-277.
- **Pierce, G., Nakane, P., Martinez-Hernandez, A., Ward, J. 1976.** Ultrastructural comparison of differentiation of stem cells of Adenocarcinomas of colon and breast with their normal counterparts. *J. Int. Canc. Inst.* **58:** 1329-1345.
- **Porter, K. R., Kallman, F. 1952.** The properties and effects of osmium tetroxide as a tissue fixative with special reference to its use for electron microscopy. *Exp. Cell. Cell. Res.* **4:** 127-141.
- **Rhodin, J. 1968.** Ultrastructure of mammalian venous capillaries, venules, and small collecting veins. *J. Ultra. R.* **25:** 452-500.
- **Riddell, R. H; L., Levin, B. 1977.** Ultrastructure of the “transitional mucosa adjacent to large bowel carcinoma. *Cancer.* **40:** 2509-2522.
- **Ron, D., Walter, P. 2007.** Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Bio.* **8:** 519-529.
- **Ruddon, R. W. 2007.** *Cancer Biology.* Oxford University Press. Cuarta Edicion. University of Michigan Medical School Ann Arbor, Michigan.
- **Samudio, I., Fiegl, M., Andreeff, M. 2009.** Mitochondrial uncoupling and the Warburg Effect: Molecular basis for the reprogramming of cancer cell metabolism. *Cancer. Res.* **69:** 2163-2166.
- **Schwerzmann, K., Hoppeler, H., Kayar, S.R., Weibel, E.R. 1989.** Oxidative capacity of muscle and mitochondria: correlation of physiological, biochemical, and morphometric characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86:** 1583-1587.
- **Sierra, S. 2009.** Ultraestructura de Adenocarcinomas y sus efectos peritumorales en pacientes tratados con quimioterapia y radioterapia. Tesis de licenciatura. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

- **Sierra, S. Finol, H. J., Gonzalez, R., Sardiñas, C. 2013.** Ultraestructura peritumoral de pacientes tratados con quimioterapia y radioterapia. *Acta. Microsc.* **22:** 210-217.
- **Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A., Allavera, P. 2009.** Tumor associated macrophages as major players on the cancer related inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **86:** 1065-1073.
- **StatSoft, Inc. (2007).** STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com.
- **Tonino, P., Finol, H., Sosa, L., Hidalgo, C., Correa, M. 1996.** Efectos peritumorales de un carcinoma gástrico sobre la ultraestructura de las células musculares lisas. *Acta. Cient. Venez.* **48** (supl): 226.
- **Trachootham, D., Alexandre, J., Huang, P. 2009.** Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?. *Nature.* **8:** 579-591.
- **Welsch, U., Sobotta, J. 2009.** Histología. Editorial médica panamericana, Segunda edición, Madrid, España.
- **Yadav, P. R. 2003.** Histology. Discovery publishing house. Primera edición. Nueva Delhi, India.
- **Yaffe, M. 1999.** Dynamic mitochondria. *Nat. Cell. Biol.* **1:** 149-150.
- **Yee, J. 2008.** Virtual Colonoscopy. Lippincott and Wilkins. Primera edición. 530 Walnut Street, Philadelphia, Estados Unidos.
- **Zuñiga, S. R. 1973.** Adenocarcinoma del Colon y el Recto. *Rev. Med. Hondur.* **41:** 62-92.

Recursos electrónicos

- American Cancer Society. Cáncer colorrectal. [en línea]. 2013. [Consulta: 10 de Julio del 2013]. Disponible en:
<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002290-pdf.pdf>
- College of American Pathologist. Colon Adenocarcinoma. [en línea]. 2011. [Consulta: 12 de Abril de 2013] Disponible en:
<http://www.cap.org/apps/docs/reference/myBiopsy/ColonAdenocarcinoma.doc>
- Electron microscopic atlas of tissues and organs in the internet. [en línea]. 1998. [Consulta: 10 de Agosto]. Disponible en:
<http://www.unimainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/EMAtlas.html>
- <http://conemaugh.kramesonline.com/spanish/HealthSheets/3,S,88501> [Consulta: 30 de Mayo de 2013]
- http://fisio4tle6.blogspot.com/2010/04/caracteristicas-histologicas-del_06.html [Consulta: 6 de Mayo de 2013]
- <http://insidesurgery.com/2011/04/lynch-syndrome-hereditary-nonpolyposis-colon-cancere/> [Consulta: 1 de Diciembre de 2013]
- <http://megamedicina.blogspot.com/2011/06/uabp-4.html> [Consulta: 1 de Mayo de 2013]
- <http://www.clinicadam.com/imagenes-de-salud> [Consulta: 15 de Mayo de 2013]
- http://www.hopkinscoloncancercenter.org/CMS/CMS_Page.aspx [Consulta: 15 de Mayo de 2013]
- <http://www.palmagyar.com/webfiles/fotos/flourouracilo%20250mg.jpg> [Consulta: 20 de Diciembre de 2013].

- <http://www.periodicoelpulso.com/html/1009sep/general/general-02.htm> [Consulta: 6 de Diciembre de 2013]
- <http://www.sociedadanticancerosa.org.ve/index.php?route=movil/estadisticas> [Consulta: 10 de Abril de 2013]
- Ministerio del Poder popular para la Salud. Venezuela Anuario de Mortalidad 2010. [en línea]. 2012. [Consulta: 10 Mayo de 2013]. Disponible en: <http://www.bvs.org.ve/anuario/Anuario2010.pdf>
- World Cancer Research Fund International. [en línea]. 2013. [Consulta: 10 de Abril de 2013] Disponible en: http://www.wcrf.org/cancer_statistics/cancer_frequency.php