

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA



Ultraestructura de adenocarcinomas y sus efectos  
peritumorales en pacientes tratados con  
quimioterapia y radioterapia.

Trabajo especial de grado  
presentado ante la ilustre  
Universidad Central de Venezuela  
por la bachiller Sandra D. Sierra A.  
como requisito para optar al título  
de Licenciado en Biología.

Tutor: Dr. Héctor J. Finol

Caracas, Venezuela

Julio- 2009

## **DEDICATORIA**

**A ti, Dios, por estar siempre presente.**

**A mis padres, porque esto no hubiese sido posible sin ellos.**

**A mi abuelo, por ser mi inspiración.**

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por siempre estar a mi lado, escucharme e iluminarme el camino cuando estaba más oscuro.

A la Universidad Central de Venezuela, por haberme recibido y haber hecho de mí lo que soy ahora; por compartir conmigo todo el conocimiento que encierra en sus paredes y por ser el lugar ideal para conocer amistades inolvidables con quienes lloré, reí, y salí adelante.

A mis padres y hermanos, que nunca me han faltado, y que siempre me han guiado y apoyado en mis decisiones.

A mis abuelos, por ser parte de mi inspiración y siempre darme sus manos en los momentos más difíciles.

Al profesor Héctor Finol, por ser mi maestro, por quien además de admiración siento un profundo cariño. Por haber estado dispuesto a ayudarme ante cualquier problema, por compartir conmigo sus conocimientos y enseñarme una manera distinta de ver la vida.

Al Dr. Carlos Sardiñas, por haberme brindado su ayuda en todo momento y por estar siempre dispuesto a colaborar en lo que estuviera en sus manos para que esta investigación se llevara a cabo con el mayor éxito.

A la profesora Lorena Márquez, por haber ofrecido su tiempo para leer, juzgar, escuchar y calificar este trabajo.

A Roschman, por ser una de las personas con quien compartí la mayor parte de mi carrera y que siempre me brindó su ayuda incondicional aún cuando el camino se hacía más estrecho.

A Christian, por estar conmigo, aún cuando fue difícil, en los momentos que hasta ahora han sido los más importantes de mi vida. Por apoyarme, aconsejarme, ayudarme, y quererme tanto como lo hace.

A Gianni, por ser la persona quien innumerables veces me impulsó a seguir adelante, con quien compartí muchas experiencias en la carrera y en mi vida, y que fueron las que ayudaron a cultivar nuestra amistad.

A Lucia, por brindarme su ayuda y a enseñarme a ser “mi peor jurado”.

A todos mis compañeros que sin duda alguna han marcado una parte especial de mi vida y carrera; Lori, Rubén, Arturo, Elea, Aurelio, Orlando, Moises y Juan; a todos, gracias.

A todos los profesores que compartieron su conocimiento conmigo durante estos cinco años de mi vida.

A mis compañeros de laboratorio, Roberto, Alicia, Douglimar, José, Luis, y todos los miembros del Centro de Microscopía Electrónica de la UCV, quienes sin duda alguna compartieron conmigo los momentos más estresantes de mi TEG, y me ayudaron a llegar hasta aquí.

A todo aquel, que con o sin intención quitó una piedra de mi camino.

**A TODOS, MUCHAS GRACIAS!!**

## **TABLA DE CONTENIDO**

TABLA DE CONTENIDO-----	V
ÍNDICE DE FIGURAS-----	VII
ÍNDICE DE GRÁFICAS-----	IX
ÍNDICE DE TABLAS-----	X
RESUMEN-----	XI

### **CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN, ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN**

INTRODUCCIÓN-----	14
ANTECEDENTES-----	25
JUSTIFICACIÓN-----	26

### **CAPÍTULO II. OBJETIVOS**

OBJETIVOS-----	28
1.1 OBJETIVO GENERAL-----	28
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS-----	28

### **CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS**

MATERIALES Y MÉTODOS-----	30
1.3 MATERIAL BIOLÓGICO-----	30
1.4 DISEÑO EXPERIMENTAL-----	30
1.4.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN-----	31
1.4.2 MANEJO ESTADÍSTICO-----	33

### **CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

RESULTADOS-----	35
1.5 ULTRAESTRUCTURALES CUALITATIVOS-----	35
1.6 ULTRAESTRUCTURALES CUANTITATIVOS-----	72

DISCUSIÓN-----87

**CAPÍTULO V. CONCLUSIÓN**

CONCLUSIÓN-----98

**CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA**

BIBLIOGRAFÍA-----100

## ÍNDICE DE FIGURAS

### **ZONA TUMORAL**

- Figura 1. (Control negativo).** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente no tratado con quimio y radioterapia a nivel de la zona tumoral.-----36
- Figura 2. (Control negativo).** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente no tratado con quimio y radioterapia a nivel de la zona tumoral.-----37
- Figura 3.** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a nivel de la zona tumoral.-----38
- Figura 4.** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a nivel de la zona tumoral.-----39
- Figura 5.** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a nivel de la zona tumoral.-----40
- Figura 6.** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a nivel de la zona tumoral.-----41

### **ZONA DISTAL DEL TUMOR**

- Figura 7. (Control negativo).** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente no tratado con quimio y radioterapia a 1 cm de la zona distal del tumor.-----43
- Figura 8. (Control negativo).** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente no tratado con quimio y radioterapia a 1 cm de la zona distal del tumor.-----45
- Figura 9.** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a 1 cm de la zona distal del tumor.-----46
- Figura 10.** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a 1 cm de la zona distal del tumor.-----47
- Figura 11.** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a 1 cm de la zona distal del tumor. -----48
- Figura 12.** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a 1 cm de la zona distal del tumor.-----49

### **ZONA PROXIMAL DEL TUMOR**

- Figura 13. (Control negativo).** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente no tratado con quimio y radioterapia a 1 cm de la zona proximal del tumor.-----50

<b>Figura 14. (Control negativo).</b> Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente no tratado con quimio y radioterapia a 1 cm de la zona proximal del tumor.-----	51
<b>Figura 15.</b> Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a 1 cm de la zona proximal del tumor.-----	52
<b>Figura 16.</b> Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a 1 cm de la zona proximal del tumor.-----	53
<b>Figura 17.</b> Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a 1 cm de la zona proximal del tumor.-----	54
<b>Figura 18.</b> Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a 1 cm de la zona proximal del tumor.-----	55
<b>Figura 19. (Control negativo).</b> Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente no tratado con quimio y radioterapia a 2 cm de la zona proximal del tumor.-----	56
<b>Figura 20. (Control negativo).</b> Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente no tratado con quimio y radioterapia a 2 cm de la zona proximal del tumor.-----	57
<b>Figura 21.</b> Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a 2 cm de la zona proximal del tumor.-----	58
<b>Figura 22.</b> Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a 2 cm de la zona proximal del tumor.-----	59
<b>Figura 23.</b> Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a 2 cm de la zona proximal del tumor.-----	60
<b>Figura 24.</b> Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a 2 cm de la zona proximal del tumor.-----	61
<b>Figura 25. (Control negativo).</b> Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente no tratado con quimio y radioterapia a 3 cm de la zona proximal del tumor.-----	62
<b>Figura 26. (Control negativo).</b> Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente no tratado con quimio y radioterapia a 3 cm de la zona proximal del tumor.-----	63
<b>Figura 27.</b> Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a 3 cm de la zona proximal del tumor.-----	64
<b>Figura 28.</b> Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a 3 cm de la zona proximal del tumor.-----	65
<b>Figura 29.</b> Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a 3 cm de la zona proximal del tumor.-----	66

<b>Figura 30.</b> Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a 3 cm de la zona proximal del tumor.-----	67
<b>Figura 31. (Control negativo).</b> Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente no tratado con quimio y radioterapia a 4 cm de la zona proximal del tumor.-----	68
<b>Figura 32. (Control negativo).</b> Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente no tratado con quimio y radioterapia a 4 cm de la zona proximal del tumor.-----	69
<b>Figura 33.</b> Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a 4 cm de la zona proximal del tumor.-----	70
<b>Figura 34.</b> Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a 4 cm de la zona proximal del tumor.-----	71
<b>Figura 35.</b> Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a 4 cm de la zona proximal del tumor.-----	72
<b>Figura 36.</b> Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a 4 cm de la zona proximal del tumor.-----	73

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Errores estándar del diámetro mayor del núcleo.-----	74
<b>Gráfica 2.</b> Errores estándar del diámetro menor del núcleo.-----	75
<b>Gráfica 3.</b> Errores estándar del diámetro mayor de la mitocondria.-----	76
<b>Gráfica 4.</b> Errores estándar del diámetro menor de la mitocondria.-----	77
<b>Gráfica 5.</b> Errores estándar del número de placas densas.-----	78
<b>Gráfica 6.</b> Errores estándar del porcentaje de vacuolas autofágicas.-----	79
<b>Gráfica 7.</b> Errores estándar del diámetro mayor de terminales nerviosos.-----	80
<b>Gráfica 8.</b> Errores estándar del diámetro menor de terminales nerviosos.-----	81
<b>Gráfica 9.</b> Errores estándar del diámetro mayor de terminales axónicos.-----	83
<b>Gráfica 10.</b> Errores estándar del diámetro menor de terminales axónicos.-----	84
<b>Gráfica 11.</b> Errores estándar del engrosamiento de la membrana basal del vaso.-----	85
<b>Gráfica 12.</b> Errores estándar del engrosamiento del endotelio.-----	86
<b>Gráfica 13.</b> Errores estándar del porcentaje de oclusión de la luz del vaso.-----	87
<b>Gráfica 14.</b> Errores estándar del porcentaje de infiltrados.-----	88

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Análisis de la varianza del diámetro mayor del núcleo.-----	75
<b>Tabla 2.</b> Análisis de la varianza del diámetro menor del núcleo.-----	76
<b>Tabla 3.</b> Análisis de la varianza del diámetro mayor de la mitocondria.-----	77
<b>Tabla 4.</b> Análisis de la varianza del diámetro menor de la mitocondria.-----	78
<b>Tabla 5.</b> Análisis de la varianza del número de placas densas.-----	79
<b>Tabla 6.</b> Análisis de la varianza del porcentaje de vacuolas autofágicas.-----	80
<b>Tabla 7.</b> Análisis de la varianza del diámetro mayor de terminales nerviosos.-----	81
<b>Tabla 8.</b> Análisis de la varianza del diámetro menor de terminales nerviosos.-----	82
<b>Tabla 9.</b> Análisis de la varianza del diámetro mayor de terminales axónicos.-----	83
<b>Tabla 10.</b> Análisis de la varianza del diámetro menor de terminales axónicos.-----	84
<b>Tabla 11.</b> Análisis de la varianza del engrosamiento de la membrana basal del vaso.-----	85
<b>Tabla 12.</b> Análisis de la varianza del engrosamiento del endotelio.-----	86
<b>Tabla 13.</b> Análisis de la varianza del porcentaje de oclusión de la luz del vaso.-----	87
<b>Tabla 14.</b> Análisis de la varianza del porcentaje de infiltrados.-----	88

## ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL SOBRE LA MUERTE CELULAR EN EL TEJIDO PERITUMORAL DE PACIENTES CON ADENOCARCINOMAS DE COLON Y RECTO.

<sup>1</sup>Sierra, S., <sup>1</sup>Roschman-Gonzalez, A., <sup>2</sup>Sardiñas, C., <sup>1</sup>Finol, H.

<sup>1</sup>Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias, UCV. <sup>2</sup>Unidad de Coloproctología del Hospital Universitario de Caracas.  
E-Mail: hector.finol@ciens.ucv.ve

Los tejidos no invadidos que circundan al tumor primario han sido considerados como normales, aún cuando también se ha señalado la presencia de anormalidades en los mismos. Con el presente trabajo se intenta estudiar los procesos de autofagia, apoptosis y necrosis que conforman cuadros de muerte celular en el tejido peritumoral de pacientes con adenocarcinomas de colon y recto. A tal efecto, se obtuvieron 5 biopsias de pacientes (2 femeninos y 3 masculinos), de edades comprendidas entre 40 y 70 años de edad, diagnosticados con adenocarcinoma de colon y recto, tratados previamente a la cirugía con quimio y radioterapia. Adicionalmente, se tomaron 4 biopsias de pacientes no tratados con ningún tipo de droga antineoplásica ni radioterapia (controles negativos). Las biopsias se procesaron de acuerdo al método rutinario para la Microscopía Electrónica de Transmisión. Las alteraciones observadas en nuestra investigación incluyeron: cuadros de atrofia en células musculares lisas con incremento significativo de vacuolas autofágicas, presencia de cuadros apoptóticos en linfocitos, degeneración con subsiguiente necrosis en las células musculares lisas, en la inervación amielínica y en algunos infiltrados celulares. Aún cuando los capilares mostraron diferentes alteraciones (engrosamiento del endotelio, prolongaciones del mismo hacia la luz del vaso, oclusión de la luz, engrosamiento y reduplicación de membrana basal), en los mismos no se observó necrosis. Estos resultados apoyan a otras investigaciones en el sentido de que los tejidos que rodean a diferentes tipos de tumores primarios no son normales, siendo sumamente importante estudiar su ultraestructura para un mejor conocimiento del proceso tumoral.

Palabras claves: tejidos peritumorales, muerte celular, ultraestructura.

**CAPÍTULO I.**  
**INTRODUCCIÓN, ANTECEDENTES Y**  
**JUSTIFICACIÓN**

## INTRODUCCIÓN

---

El conocimiento que se tiene sobre el cáncer es muy antiguo, habiendo sido descritos los hallazgos de la primera disección de un cuerpo humano con tumores desde hace 500 años A.C. En esa disección se describía la presencia de una protuberancia superficial grande y con ulceraciones que no podían ser curadas, conocida actualmente como neoplasia. Cien años mas tarde (400 años A.C.), Hipócrates y sus discípulos le asignaron el nombre de cáncer (cangrejo) a la enfermedad por su similitud con las extremidades de los cangrejos (Manzanilla,2005). El término de neoplasia significa “nuevo crecimiento”, habiéndose empleado para identificar procesos tanto malignos como benignos (Alberts y col., 1994).

Las ideas fundamentales concernientes al cáncer fueron introducidas a finales del siglo XVIII, por Biichart, quien fue el primero en describir el cáncer como tejido anormal desarrollado de una manera similar a los tejidos normales del cuerpo. Mas tarde, Virchow en sus observaciones microscópicas encontró una alta correlación entre el cáncer y la inflamación e irritación crónica. El perfeccionamiento del microscopio, la creación de la teoría celular de Schleiden y Schwann y la invención del microtomo suministraron las bases metodológicas y conceptuales para la realización de un estudio adecuado sobre aspectos estructurales de las neoplasias (Correa, 1996).

De esta manera, el cáncer es una enfermedad caracterizada por la proliferación incontrolada e inadecuada de células que morfológica y funcionalmente son inmaduras y aberrantes, con capacidad para invadir los tejidos adyacentes y diseminarse a distancia (Fidler y Hart, 1982; Paweletz y Boxberger, 1994, Mira y col., 2000, Tonino, 2004). En el cáncer, las células comienzan a prosperar de forma individual y a expensas de sus vecinas, culminando en la destrucción y muerte tisular generalizada.

## ETIOLOGÍA Y PATOGENIA DEL CÁNCER

La etiología de esta enfermedad se encuentra asociada a un amplio espectro de factores ambientales y condiciones del individuo dentro de las que se encuentran la predisposición genética y la condición inmunológica (Correa, 1996; Risques, 2001; Alazzouzi, 2006). El proceso evolutivo y la progresión del tumor pueden generar diversidad biológica rápidamente, surgiendo así un comportamiento invasivo, llamado también infiltración de la célula tumoral y subsecuentemente, la producción de metástasis (Liotta y col. ,1983; Correa y col., 1998; Finol y col., 2001).

Las neoplasias contienen una variedad de subpoblaciones de células con comportamiento biológico diferente, siendo las células tumorales heterogéneas en relación a características metabólicas, grados de radiosensibilidad, receptores hormonales, cinética y crecimiento celular e inmunogenicidad. Por otro lado, las células tumorales pueden lograr mantener su crecimiento anatómico por dos vías: activación de oncogenes promotores de crecimiento o por inactivación de genes supresores de tumores (Duffy y col., 2008). Los primeros promueven el crecimiento celular, y los segundos lo inhiben mediante la codificación de proteínas que actúan como barreras para la proliferación celular induciendo el proceso de apoptosis (Risques, 2001). Este último proceso también es llamado “muerte celular programada” y está regulado genéticamente, siendo provocado por la presencia de anomalías celulares que ocurren tanto en el interior como en exterior celular, como por ejemplo daños al ADN, proliferación aberrante, y condiciones de anoxia. En la apoptosis se describen los siguientes procesos morfológicos: contracción celular, condensación de la cromatina, fragmentación del ADN, y formación de cuerpos apoptóticos limitados por membrana plasmática, lo que impide el escape de su contenido al espacio extracelular y conservación de organelos (DeVita y col., 2008). Estudios recientes destacan la importancia de estudiar el proceso de señalización de proteínas apoptóticas como biomarcadores pronósticos en cáncer colorrectal (Suzanne y Jochen, 2009).

La evidencia sugiere que las células tumorales en las que se ha desactivado el proceso apoptótico pueden ser desviadas a la necrosis, que tradicionalmente ha sido considerada como una forma de muerte no programada de las células implicadas en los estados patológicos (DeVita y col., 2008). La necrosis es una forma de muerte celular que resulta de un proceso pasivo, accidental y que es consecuencia de la destrucción progresiva de la estructura con alteración definitiva de su función. Este daño es desencadenado por cambios ambientales como la isquemia, temperaturas extremas, traumatismos mecánicos e infección. En este proceso se describe hinchazón rápida de la célula, alteración morfológica y funcional de los organelos, pérdida de la integridad de la membrana plasmática, y liberación del contenido celular al medio exterior lo que desencadena una respuesta inflamatoria aguda (DeVita y col., 2008).

Un segundo programa de muerte celular programada, es denominado autofagia, el cual parece desempeñar un papel clave en la eliminación de células indeseables en diversos tejidos en todo el cuerpo. Este programa suele ser activado cuando las células sufren deficiencia de nutrientes, por lo que digieren sus propios orgánulos intracelulares en vacuolas autofágicas con el fin de reciclar y recoger

diversas especies químicas que pueden ayudar en su supervivencia (DeVita y col., 2008; Suzanne y Jochen, 2009).

La célula tumoral tiene una amplia flexibilidad para adaptarse a los requerimientos de su ambiente, siendo más indiferenciada que la célula normal adulta (Paweletz y Boxberger, 1994). Por otro lado, no sólo la flexibilidad de la célula tumoral individual es la que interviene, sino también la variabilidad de la población completa de células tumorales, haciendo a las células tumorales más adaptables que las células normales.

## **CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER**

En general la tasa de crecimiento de los tumores está correlacionada con su nivel de diferenciación, de manera que los tumores malignos crecen más rápido que los benignos, existiendo en este sentido un amplio rango de comportamiento que va desde las lesiones más agresivas y repentinas a las que entran en período de dormancia. Existe una amplia variedad de tipos tumorales clasificados en distintas categorías de acuerdo con los criterios utilizados, por ejemplo, la histogénesis (tejido de origen y tipo celular), el comportamiento biológico (benigno o maligno), el grado de diferenciación, la ubicación anatómica (órgano o región), objetivos descriptivos relacionados con forma y función (papilar), así como algunos tumores se clasifican eponímicamente (sarcoma de Swing, linfoma de Hodgkin y otros) (Correa, 1996).

Los cánceres provenientes del tejido mesenquimal (tejido conectivo o músculo) son llamados sarcomas, cuyo significado etimológico proviene de la palabra griega “sar” (fibroso). Los neoplasmas malignos que se originan de células epiteliales, son llamados carcinomas, siendo la forma más común de la diseminación inicial a través del sistema linfático para posteriormente hacer metástasis (Alberts y col., 1994; Stevens y Lowe, 1997; Longatto-Filho y col., 2008). Cerca del 90% de los cánceres humanos son carcinomas, quizás porque la mayor parte de la proliferación celular ocurre en los epitelios o porque el tejido epitelial está expuesto con frecuencia a varias formas de daños, tanto físicos como químicos que podrían favorecer el desarrollo de este tipo de cáncer (Alberts y col., 1994).

Dentro de los carcinomas más frecuentes encontramos los adenocarcinomas, los cuales son tumores de células epiteliales malignas, originándose del epitelio glandular de las mismas (Stevens y Lowe, 1997, Thackery, 2002).

## **IMPORTANCIA**

El cáncer es la segunda causa de muerte en Venezuela, siendo sólo superado por enfermedades del corazón (Capote, 2006,2008). A nivel mundial, el carcinoma del sistema digestivo constituyó para el año 2001 la principal causa de muerte por cáncer, siendo el carcinoma de colon y recto, una de las malignidades con mayor prevalencia (Andrade y Pereira ,2007; Longatto-Filho y col., 2008). El cáncer de colon y recto representa en nuestro país la mayor incidencia después de los tumores de pulmón, próstata y estómago en los hombres, y luego de cuello uterino y mama en mujeres. En el año 2007 el cáncer de colon y recto para la población masculina tuvo una mortalidad estimada de 588 casos dentro de 9257 muertes a causa de cáncer, y para la población femenina, un total de 645 muertes dentro de 9300 casos de muertes estimadas por cáncer (Capote 2008).

Alrededor del 40% de los tumores malignos de colon están situados en el recto (Rosito y col., 2005) y es la tercera causa de muerte por cáncer en el mundo con una tasa de incidencia 10 veces mayor en países desarrollados que en países en desarrollo (Páramo y col. ,2005).

## **CARACTERÍSTICAS GENERALES**

El recto es la sección del tracto gastrointestinal donde las heces son retenidas antes de ser expulsadas del organismo a través del ano, por lo que representa el segmento preterminal del tubo digestivo, alojado en la excavación pelviana. Mide de 10 a 15 cm de longitud y se extiende desde el colon sigmoideo hasta el diafragma pélvico (Wolpin y col., 2007); está ligeramente dilatado en su parte inferior formando la ampolla rectal. Los últimos 2 cm del recto constituyen el canal anal (Figura 1) (Fawcett, 1995).

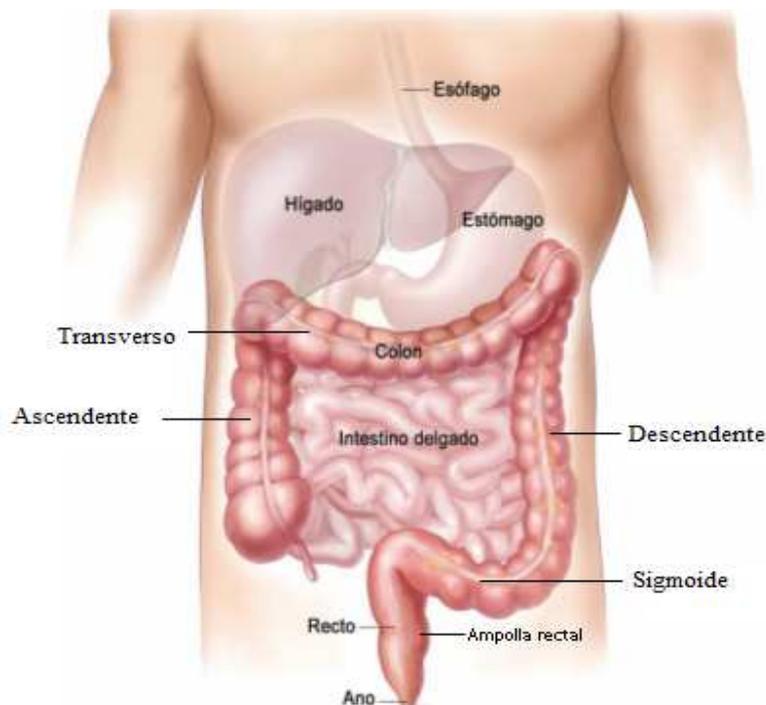


Figura 1. Anatomía del aparato digestivo inferior. (Modificado de <http://www.cáncer.gov/espanol/pdq/tratamiento/recto/patient>)

La mucosa es el tejido del epitelio que tapiza el interior del recto y que está asociada a numerosas glándulas secretoras de moco. La mucosa del recto es semejante a las del colon, pero sus criptas (criptas de *Lieberkunhn* o glándulas intestinales) son algo más largas (Fawcett, 1995). Esta capa interna es lisa, ya que no hay pliegues ni vellosidades como en el intestino delgado.

La lámina propia es un tejido conjuntivo laxo que ocupa los intersticios que quedan entre las criptas de *Lieberkunhn* (Fawcett, 1995); contiene numerosos vasos sanguíneos y linfáticos. En la lámina propia siempre hay algunos nódulos linfoides dispersos que pueden penetrar profundamente en la submucosa.

Por su parte, la *muscularis mucosae* mide en promedio 38  $\mu\text{m}$  de grosor y está formada por redes de fibras elásticas y por dos capas, una circular interna y otra longitudinal externa, de músculo liso. Ésta puede enviar delgados fascículos de células musculares hacia la superficie de la mucosa (Fawcett, 1995). Por su parte, los linfáticos que acompañan a la *muscularis mucosae* no se extienden hacia la lámina propia.

La submucosa está compuesta por tejido conectivo moderadamente denso y poco ordenado, es rica en vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. En el recto no existe serosa, pero una gruesa capa de grasa lo adhiere a la capa muscular denominada adventicia.

Actualmente se sabe que la mayoría de los cánceres de recto comienzan como un pólipo, una masa de tejido que sobresale de la membrana mucosa del recto y crece hacia el centro del mismo. Estos

últimos son conocidos como adenomas, precursores del carcinoma (Risques, 2001), los cuales son tumores benignos que progresan gradualmente a través del incremento de tamaño, displasia y la adquisición de prolongaciones (Fearon y col., 1990, Shih y col., 2001).). Más del 95% de los tumores cancerosos del recto son adenocarcinomas (Marcello y Schoetz, 1997; Kang y col., 2007; Chen y Lai, 2009), los cuales se originan en el epitelio glandular de la mucosa colorrectal, invaden la pared, se infiltran hacia la lámina propia, *muscularis mucosae*, la submucosa, y capas más externas.

## **GRUPOS DE ALTO RIESGO Y MANIFESTACIONES**

Existen diferentes condiciones de predisposición que pueden incrementar el riesgo de desarrollar cáncer de recto, entre las cuales se encuentran:

- Tener 50 años de edad o más (Risques, 2001).
- Historia familiar de cáncer del colon o del recto (Correa, 1996).
- Historia de colitis ulcerosa como enfermedad asociada.
- Colitis granulomatosa como enfermedad asociada.
- Historia de cáncer genital femenino o de mama (Ransohoff y Lang, 1991; Fuchs y col., 1994)
- Ciertas condiciones hereditarias, tales como poliposis adenomatosa familiar y cáncer de colon hereditario sin poliposis (HNPCC; síndrome de Lynch) (Thorson y col., 1999; Risques, 2001; Smith y col., 2001; Alazzouzi, 2006)
- Sobrepeso/ obesidad (Páramo y col., 2005; Chen y Lai, 2009).

De manera adicional se ha demostrado experimentalmente que en presencia de tránsito lento de las heces, los ácidos biliares pueden ser carcinógenos. Durante la retención prolongada de las heces aumenta el tiempo de contacto de la mucosa del intestino con estas sustancias, incrementando su acción sobre las células epiteliales, lo que puede provocar en ellas la transformación cancerosa (Correa, 1996).

El adenocarcinoma de recto crece lentamente (Chen y Lay, 2009), para luego de un tiempo prolongado alcanzar el tamaño en el que se producen los síntomas. Durante esta fase asintomática el diagnóstico depende de un examen sistemático, y cuando aparecen los síntomas, éste depende de la localización de la lesión, del tipo de tumor y de la extensión del mismo (Correa, 1996). Los tumores de recto se presentan con dolor local, proctorragia macroscópica (hemorragia anal), y tenesmo con

sensación rectal de evacuación incompleta. Los tumores rectales que han avanzado más allá de los ganglios linfáticos locales, pueden mostrar una invasión perineural con dolor molesto (Correa, 1996).

Entre las pruebas que se utilizan para diagnosticar cáncer del recto se encuentran examen digital del recto, enema de bario, sigmoidoscopia, colonoscopia y biopsia (Del Castillo, y col., 2002; Piero y col., 2005; DeVita y col., 2008).

Los procedimientos de extensión comprenden tomografía computarizada, resonancia magnética de pelvis, uso de marcadores tumorales y ecografía endoscopia (Snady y Merrick, 1998; Del Castillo, y col., 2002; Siddiqui y col., 2006; DeVita y col., 2008).

## **DISEMINACIÓN DEL CÁNCER**

El cáncer crece por la invasión progresiva y destrucción de los tejidos adyacentes a los tumores primarios o por metástasis (Correa y col., 1998; Finol y col., 2001). La invasión del tumor puede ser definida como la migración activa de las células neoplásicas fuera del tejido de origen y dentro de tejidos adyacentes de diferentes tipos (Liotta y col., 1983).

La metástasis o dispersión del cáncer desde el tumor primario hacia órganos distantes (Ruoslahti, 1996; Yamaguchi y col., 2005; Duffy y col., 2008, Longatto-Filho y col., 2008), es la principal causa de muerte en pacientes con malignidad. La metástasis ha sido resumida como una serie de procesos secuenciales e interrelacionados que incluyen disociación de las células malignas en el tumor primario, invasión local, angiogénesis (formación de nuevos vasos a partir de los preexistentes), invasión de las células dentro de la vasculatura o sistema linfático, supervivencia en estos canales, extravasación, y proliferación a sitios distantes (Duffy y col., 2008; Caruso y col., 2008).

## **ESTADIOS DEL CÁNCER DE RECTO**

El pronóstico del cáncer rectal está claramente relacionado con el grado de penetración del tumor a través de la pared intestinal y la presencia o ausencia de complicación ganglionar (Nelson y col., 2001). Estas dos características forman la base para todos los sistemas desarrollados para clasificar esta enfermedad.

En este sentido, las clasificaciones más utilizadas en cáncer colorrectal son: la de DUKES modificada en 1974 por Gunderson y Sosin, el sistema TNM, y la clasificación Astler y Coller. (Piero y

col., 2005; Andrade y col., 2007). En específico, para el caso de cáncer de recto el sistema de DUKES detallado a continuación, es el mayormente utilizado para su clasificación.

Clasificación de Dukes modificada por Gunderson y Sosin (1974):

En la figura 2 se muestra un esquema donde se representan los diferentes estadios según esta clasificación en la evolución del cáncer de recto, pudiéndose apreciar algunos de los siguientes estadios:

- A → Tumor limitado a la mucosa, no invade los ganglios linfáticos. (Estadio I).
- B1 → Tumor más allá de la mucosa pero limitado a la pared intestinal, no invade los ganglios linfáticos (Estadio II).
- B2 → Tumor más allá de la pared intestinal, no invade los ganglios linfáticos. *B2m*: extensión microscópica.
- B3 → Tumor invade órganos adyacentes al igual que ganglios linfáticos.
- C1 → B1 con invasión a ganglios linfáticos
- C2 → B2 con invasión a ganglios linfáticos. *C2m:B2m* con invasión a ganglios linfáticos. (Estadio III).
- C3 → B3 con invasión a ganglios linfáticos.
- D → Metástasis a distancia (Estadio IV).

Es importante señalar que el caso del estadio 0 representado en la figura 2 se encuentra representado por células anormales en el revestimiento más interno del recto sin invasión de la lámina propia. Estas células anormales se pueden volver cancerosas y diseminarse hasta el tejido cercano normal. El estadio 0 también se llama carcinoma *in situ*.

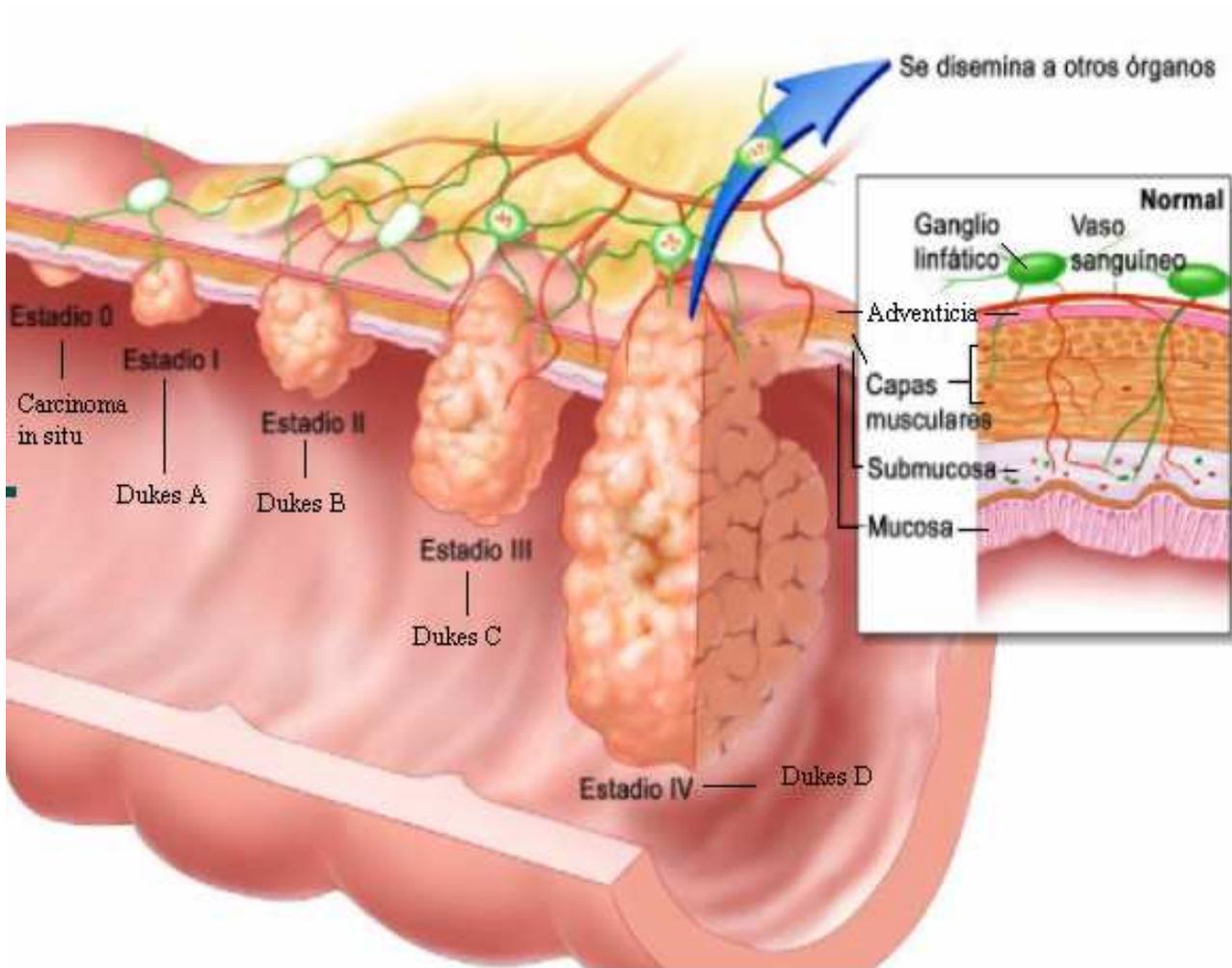


Figura 2. Evolución del cáncer de recto. Las células cancerosas penetran en las capas que forman la pared del recto y se diseminan hacia los ganglios linfáticos y otros órganos. (Modificado de <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/recto/Patient/page2#>)

## CÁNCER DE RECTO RECURRENTE

Cáncer del recto recurrente significa que el cáncer ha vuelto (reaparecido) después de haber sido tratado. Puede volver al recto o a otras partes del cuerpo, como el colon, la pelvis, el hígado o los pulmones.

Después del tratamiento, las evaluaciones periódicas pueden conducir a la pronta identificación y control de la enfermedad recurrente (Khoury y col., 1996). Sin embargo, el impacto de tal seguimiento en la mortalidad general de los pacientes con cáncer rectal recurrente está limitado por la proporción de pacientes en quienes se encuentran metástasis localizadas potencialmente curables.

## ASPECTOS GENERALES DE LAS OPCIONES DEL TRATAMIENTO

Existen diferentes tipos de tratamientos para todos los pacientes con cáncer del recto, utilizándose principalmente tres tipos de tratamiento estándar (Chen y col., 2009):

### Cirugía

La cirugía es el tratamiento más común para todas las etapas de cáncer del recto (Chen y Lay, 2009). El abordaje quirúrgico del tratamiento varía según la localización, el estadio y la presencia o ausencia de características de alto riesgo y puede incluir los siguientes procedimientos (Balch y col., 2006):

Excisión local: si el cáncer se encuentra en una etapa inicial o pólipo (Mellgren y col., 2000; Piero y col., 2005), la operación se denomina polipectomía (Bailey y col., 1992; Seitz y col., 2004).

Resección: si la magnitud del cáncer es mayor, el médico hará una resección del recto. Luego, el médico realizará una anastomosis, que consiste en unir con costuras las partes sanas del recto, uniendo lo que quedó del recto al colon o cosiendo el recto al ano (Figura 3) (DeVita y col., 2008).

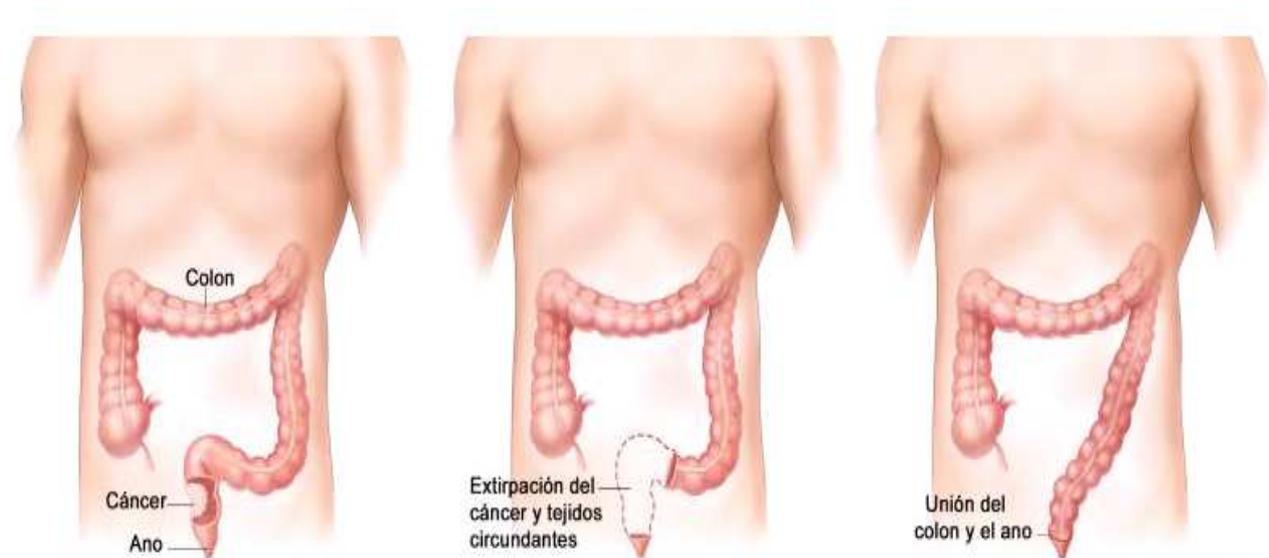


Figura 3. Cirugía del cáncer de recto con anastomosis. Se extirpa el recto y parte del colon y luego se une el colon al ano (Modificado de <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/recto/Patient/page4>).

Resección y colostomía: si el médico no puede coser el recto, hará una abertura (estoma) en una parte exterior del cuerpo para permitir el paso de desechos. Esta operación se llama colostomía (Thackery, 2002).

## **Radioterapia**

La radioterapia consiste en el uso de fotones (rayos X, gamma) o partículas (protones, electrones), con producción de alta cantidad de energía para eliminar células cancerosas y reducir tumores (DeVita y col., 2008). El ADN es el blanco crítico de esta terapia. La radiación puede provenir de fuera del cuerpo (radiación externa) o de materiales radiactivos colocados directamente en el tumor (braquiterapia o radiación interna o de implante).

Una vez decidido someter al paciente a radioterapia, se deben llevar a cabo una serie de procesos previos. Primero debe conocerse exactamente la localización del volumen blanco, así como la dosis límite y los tejidos normales atravesados. La tomografía computarizada (TC), ha contribuido enormemente a la localización de los tumores, permitiendo conocer con mayor detalle la localización de los tejidos normales (Thackery, 2002; DeVita y col., 2008).

Los tejidos normales que limitan la dosis de radiación a administrar pueden estar tan unidos al tumor que cualquier volumen de irradiación del tumor puede incluir a estos tejidos normales, lo que contribuye a una complicación. La alta aceleración de los electrones que acompañan a los rayos  $\gamma$  le permiten atravesar la molécula de ADN en alrededor de  $10^{-18}$  segundos y en  $10^{-14}$  segundos a la célula. Los efectos secundarios, como la muerte celular, es compensada por la proliferación de las células, y esto ocurre tanto en los tejidos normales como en los tumores. La proliferación celular en el tejido normal es contraria a la del tumor, altamente organizada y controlada (Gordon, 2002).

Durante una tanda de irradiación fraccionada, la respuesta del tumor y del tejido normal depende de la posible existencia de proliferación celular entre las fracciones, con lo que aumentaría el número de células expuestas a la radiación. Una célula afectada por la irradiación puede dividirse una vez o más antes de que toda su progenie se convierta en estéril; lo que significa que la célula irradiada no parecerá alterada hasta que se lleve a cabo por lo menos la primera división.

La irradiación y la cirugía pueden combinarse de muchos modos distintos, y la razón general de ello es que la falla de estas dos técnicas ocurre a niveles diferentes. La irradiación raramente falla en la periferia de los tumores donde las células son escasas en número y bien vascularizadas, en tanto que es

frecuente la falla en el centro del tumor, donde hay una gran cantidad de células tumorales a menudo en condiciones hipóxicas. Por el contrario, la cirugía se halla frecuentemente limitada por la necesidad de preservar los tejidos sanos adyacentes al tumor. La irradiación puede darse antes o después de la cirugía (Dahlberg, 1999, Thackery, 2002; DeVita y col., 2008).

## **Quimioterapia**

La quimioterapia consiste en el uso de fármacos para eliminar células cancerosas (Thackery, 2002). Puede tomarse en forma de píldoras o administrarse en el cuerpo por vía intravenosa o intramuscular. Casi todos los fármacos anticancerosos comparten dos propiedades comunes: actúan sobre la síntesis de ADN y no afectan a las células en reposo a no ser que dichas células se dividan inmediatamente después de la exposición al fármaco.

El efecto destructor de los agentes quimioterapéuticos del cáncer tiene una selectividad definida para las células cancerosas respecto a las células normales del huésped. Sin embargo, investigadores como Bruce y col. (1966), determinaron que este efecto variaba considerablemente dependiendo de si actuaban durante una fase específica del ciclo celular o afectaban también a las células en fase de reposo, por lo tanto, la interrelación entre la farmacocinética del fármaco anticanceroso y la cinética celular es primordial para la quimioterapia anticancerosa (DeVita y col., 2008)

En general, la exposición a estos fármacos presupone un conocimiento básico sobre los constituyentes celulares, el esquema fundamental de la síntesis de ADN, ARN, proteínas, y los principios fundamentales sobre el transporte, metabolismo y excreción de los mismos para así realizar un ajuste de las dosis.

Finalmente, dado que la mayor ventaja de la quimioterapia es que se distribuye ampliamente por todo el cuerpo, la combinación de la radioterapia y la quimioterapia puede aumentar el índice terapéutico (Labianca y col., 1997). Al igual que la combinación de la cirugía y la irradiación, los volúmenes efectores de la quimioterapia son diferentes, y en el caso del colon, puede aumentar la supervivencia porque la quimioterapia es efectiva para micrometástasis ocultas fuera del campo de la irradiación (Thackery, 2002).

## ANTECEDENTES

---

Los tejidos no invadidos que circundan al tumor primario (peritumorales), son considerados usualmente como tejidos normales (Paweletz y Boxberger, 1994). Estos mismos autores sugieren las mismas características para el caso de los tejidos aledaños a las metástasis. Sin embargo, otros autores reportan lo contrario en diferentes tipos de tumores como en fibrohistiocitoma maligno (Finol y col., 1994), en donde se observaron alteraciones del músculo esquelético como desorganización de los sarcómeros, asociaciones de túbulos T, vacuolización evidente, mitocondrias edematizadas, cuerpos laminares, degeneración de los terminales axónicos, engrosamiento de la membrana basal de capilares, con hipertrofia endotelial y oclusión de la luz. Dos años más tarde, en carcinomas gástricos (Tonino y col., 1996), se evidencian alteraciones como incremento de retículo endoplasmático rugoso (RER), disminución de elementos del sistema contráctil, mitocondrias edematizadas, mionúcleos con pleomorfismo y en algunos casos pignóticos, membrana basal interrumpida y disminución aparente de desmosomas.

En el año 2001, estudios realizados en carcinoma espinocelular de lengua (Lamura y col., 2001), reportan la presencia de proliferación de organelos como vacuolas autofágicas, lisosomas de tipo primario y gránulos de lipofucsina. Las mitocondrias se mostraron con formas irregulares y edematizada tanto en el sistema contráctil como en el sarcotubular exhibiendo un aspecto desorganizado, desaparición de miofibrillas y núcleo con bordes irregulares con abundante heterocromatina.

Luego, en adenocarcinomas de próstata (Finol y col., 2003); se presentan en las zonas no invadidas o “normales” alteraciones significativas ultraestructuralmente dentro de las cuales se reporta atrofia en las células musculares lisas, disminución de caveolas, mitocondrias edematizadas, pérdida parcial de polisomas, abundantes figuras mielínicas, vacuolas autofágicas, interrupción y pérdida de la membrana basal y alteraciones antes reportadas a nivel de la vasculatura. Con respecto a las metástasis en adenocarcinomas de colon, en hígado se han descritos efectos de las células metastásicas sobre los hepatocitos de parénquima no invadido designados como efectos perimetastásicos (Correa y col., 1998), donde se observan entre otras alteraciones antes mencionadas, mitocondrias con inclusiones paracrystalinas con marcado pleomorfismo, cuerpos multivesiculares y gránulos de lipofucsina.

En relación a los trabajos mencionados anteriormente, cabe destacar que los pacientes de quienes provinieron las biopsias no fueron tratados con radio y/o quimioterapia, por lo que se consideró interesante realizar el presente trabajo después de los tratamientos.

## JUSTIFICACIÓN

---

Este trabajo constituye una continuación de las investigaciones que sobre la ultraestructura de los adenocarcinomas y leiomiomas gastrointestinales se han venido haciendo en el Centro de Microscopía Electrónica de la UCV. Las mismas han incluido efectos peritumorales (Tonino y col., 1996), ultraestructura de metástasis de leiomiomas en hígado (Finol y col., 1997) y efectos perimetastásicos de adenocarcinomas (Correa y col., 1998). Adicionalmente, con este trabajo se intenta ampliar el conocimiento que sobre la ultraestructura de los tumores gastrointestinales existe actualmente, conocimiento que es importante dado la alta incidencia actual de los tumores gastrointestinales en Venezuela.

En vista de lo referido en la sección de “Antecedentes”, dada la carencia de estos estudios en pacientes tratados con radio y/o quimioterapia, se consideró importante realizar el trabajo en biopsias provenientes de ese tipo de pacientes.

**CAPÍTULO II.**  
**OBJETIVOS**

---

## OBJETIVOS

---

### **Objetivo General:**

- Describir las alteraciones ultraestructurales en el tumor y regiones peritumorales en pacientes tratados con Quimioterapia y Radioterapia afectados con Adenocarcinomas (ADC) de recto medio y bajo.

### **Objetivos Específicos:**

- Determinar las alteraciones presentes en las células epiteliales, microvasculatura e innervación en el tumor de pacientes tratados con Quimioterapia y Radioterapia afectados por ADC de recto medio y bajo. Adicionalmente, se establecerán comparaciones con tejidos de pacientes con tumores no tratados.
- Determinar las alteraciones de la musculatura lisa, tejido conectivo, microvasculatura e innervación presentes en regiones peritumorales en pacientes tratados con Quimioterapia y Radioterapia afectados por ADC de recto medio y bajo. Así mismo, se establecerán comparaciones con tejidos peritumorales de pacientes no tratados.
- Evaluar la presencia del infiltrado celular mononuclear en las áreas tumorales y peritumorales de pacientes tratados y no tratados.
- Estudiar la posible presencia de procesos apoptóticos y necróticos en las áreas tumorales y peritumorales de pacientes tratados y no tratados.

**CAPÍTULO III.**  
**MATERIALES Y MÉTODOS**

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material Biológico.

Para la realización del presente trabajo de investigación se emplearon 5 biopsias de recto provenientes de 2 pacientes femeninos, y 3 masculinos, con edades comprendidas entre 40 y 70 años, diagnosticados con Adenocarcinomas (ADC) de recto medio y bajo con estadios C y D correspondientes a la clasificación de DUKES (modificada en 1974 por Gunderson y Sosin), quienes fueron remitidos al Hospital Universitario de Caracas, recibiendo tratamientos de quimio y radioterapia previos a la cirugía.

Por su parte, los controles negativos (pacientes no tratados) utilizados para esta investigación, correspondieron a 4 biopsias de colon provenientes de pacientes de sexo masculino, con edades comprendidas entre 45 y 75 años, diagnosticados con Adenocarcinomas (ADC) de colon con estadios C y D.

Las tomas se realizaron en el momento en que los pacientes fueron intervenidos quirúrgicamente y fueron mantenidas en solución fijadora hasta llegar al laboratorio donde fueron procesadas todas las muestras.

### Diseño Experimental

Luego de obtenidas las biopsias, fueron seccionadas las muestras a diferentes profundidades de la zona tumoral, así como también diferentes profundidades y distancias a nivel peritumoral como se muestra en la Figura 4. Seguidamente las muestras fueron procesadas para microscopía electrónica de transmisión.

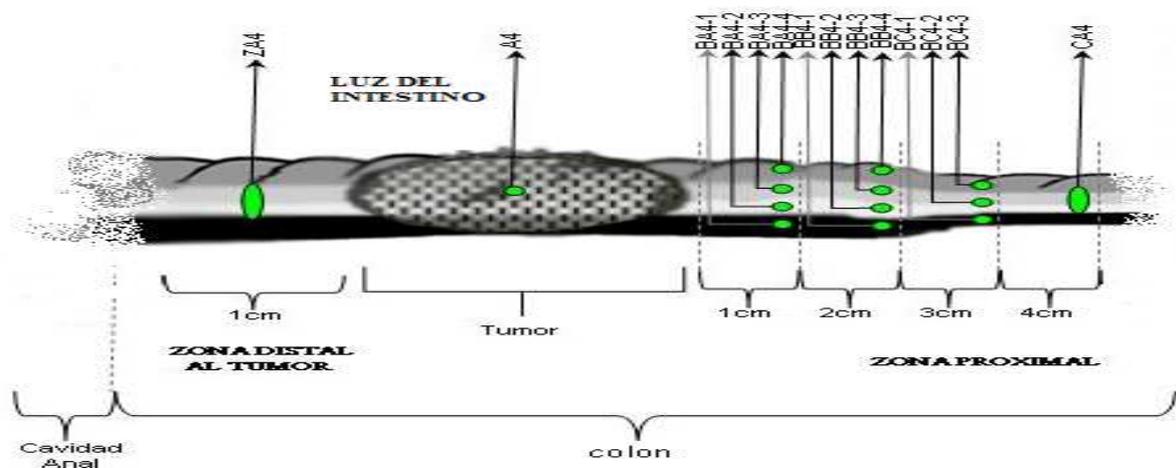


Figura 4. Esquema representativo del corte de las secciones para el corte fino.

## **Microscopía electrónica de transmisión:**

La técnica de corte fino consta de los pasos de fijación, deshidratación, infiltración, inclusión, corte y contrastación.

### **Fijación**

La fijación se realiza con la finalidad de conservar las células y tejidos en un estado similar, en morfología y composición química, al estado vivo. Para esto, una de las cualidades que debe tener un fijador es la rapidez; las células se deben matar y fijar antes de que aparezcan los fenómenos autolíticos. Además, el fijador debe poseer alto poder de penetración para asegurar la fijación correcta de las capas más profundas del tejido a ser preservado, conservando en lo posible, los detalles que presentaban *in vivo*.

Como primer fijador se empleó la solución de Karnovsky (glutaraldehído al 2,5% y formaldehído al 37%) en buffer fosfato Millonig (Millonig, 1961), siendo el pH de 7,4 y la osmolaridad 320 mOsm. Se empleará una osmolaridad mayor que la del plasma de los mamíferos, por cuanto en el rango utilizado no se advierte daño tisular, y además, se evita que la solución fijadora que alcanza las regiones centrales de la muestra esté muy diluida. No se incluye en la osmolaridad total, la contribución del glutaraldehído, ya que no constituye factor importante en la presión osmótica efectiva (Arborgh y col., 1976). El glutaraldehído como agente fijador tiene como finalidad establecer puentes de entrecruzamiento con las proteínas. Se enlaza a los grupos amino de las proteínas. Específicamente, el grupo aldehído reacciona con el grupo amino de la lisina ubicada en proteínas adyacentes originando así los puentes de entrecruzamiento (Bozzola y Russell, 1992).

Una vez extraídas las muestras del tejido se sujetaron a una superficie de corcho en donde se fijaron por 5 minutos, luego se cortó el tejido en trocitos de 1mm x 2mm continuándose la fijación en frasquitos de 10ml hasta completar los 45 minutos requeridos. Al cabo de ese tiempo, las muestras se lavaron en buffer fosfato y se postfijaron en tetraóxido de osmio al 1% en el mismo buffer y bajo las mismas condiciones de osmolaridad y pH. La postfijación se prolongó durante 1 hora, prosiguiendo con un lavado en agua destilada. El postfijador reacciona con las moléculas lipídicas de la membrana plasmática.

El uso de agua destilada para lavar el material luego de la fijación en OsO<sub>4</sub> se justifica por cuanto la técnica de corte fino incluye un paso de contrastación con acetato de uranilo al 3% en agua, siendo

bien sabido que el  $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  reacciona con los grupos fosfatos del buffer (Ginsburg y Wolosin, 1979; Ting-Beall, 1980).

### **Deshidratación**

La deshidratación es un proceso de sustitución del agua intracelular por un líquido que actúa a modo de solvente entre el medio celular acuoso y la resina de inclusión. Utilizaremos etanol como agente deshidratante, siguiendo el protocolo:

Etanol al 50% en agua.....2 cambios (5min/cambio).

Etanol al 75% en agua.....1 cambio (5min.).

Etanol al 95% en agua.....1 cambios (5min).

Etanol al 100%.....2 cambios (5min/cambio).

### **Infiltración**

Puesto que el etanol es poco soluble en la resina epóxica, la infiltración logra, mediante un compuesto intermedio entre el etanol y el epón, tal miscibilidad. Los pasos a seguir son:

Óxido de propileno.....2 cambios (15min/cambio).

Óxido de propileno-epón (1:1).....1 cambio (30min).

### **Inclusión**

El proceso de inclusión, consiste en la sustitución de la mezcla óxido de propileno-epón por la mezcla de la resina que polimeriza bajo condiciones particulares. La inclusión de la muestra en un soporte sólido permite obtener cortes finos. Antes de la inclusión, se efectuaron 4 cambios en resina de 30 minutos cada uno (Luft, 1961). La resina consta de los siguientes componentes: EMBED-812 (EMS, HARTFIEL, PA), NMA, DDSA y DMP-30.

Tanto para los pacientes tratados como para los no tratados (control negativo), se obtuvieron 50 bloques.

### **Corte y contraste**

Los cortes ultrafinos (60–90 nm) fueron obtenidos con cuchilla de diamante acoplada a un ultramicrotomo Porter–Blum MT2–B. Las secciones finas se contrastaron con acetato de uranilo (Watson, 1958) y citrato de plomo (Reynolds, 1963).

El modo de acción de estos contrastantes no se conoce con exactitud. No obstante, se acepta que los iones uranilo reaccionan con los grupos fosfato contenidos en los ácidos nucleicos y las proteínas, las cuales se tiñen de modo importante. Asimismo, los iones plomo se enlazan a componentes cargados negativamente, tales como los grupos hidroxilo, así como a las áreas en las que previamente se había enlazado el osmio. Los grupos fosfatos también podrían estar implicados en este proceso.

Los cortes se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión marca Jeol, modelo JEM-1011, con voltaje de aceleración de 80 kV. El registro permanente se efectuó en negativos de 8,3×10,2 cm. Se obtuvieron para pacientes tratados un total de 150 micrografías electrónicas y para no tratados un total de 50.

### **Análisis Estadístico:**

Para el estudio de las variables: diámetro mayor y menor del núcleo, diámetro mayor y menor de las mitocondrias, porcentaje de vacuolización, número de placas densas, engrosamiento de la membrana basal y citoplasma endotelial del vaso, oclusión de la luz del vaso, diámetro mayor y menor de terminales nerviosos, diámetro mayor y menor de axones, y la presencia de infiltrados; se realizaron gráficas de error estándar que permitieron visualizar las tendencias y comportamientos de estas variables en el tumor, a diferentes distancias del mismo y la influencia del tratamiento.

Para establecer si los cambios y variaciones observados fueron estadísticamente significativos, se empleó una prueba de Análisis de la Varianza (ANOVA) de dos factores. El primer factor de variación fue la condición: tratados y no tratados; y el segundo factor de variación correspondió a la zona (tumoral, 1cm distal del tumor y 1, 2, 3 y 4 cm proximales del tumor). La prueba se elaboró con un margen de confianza del 95%. Con el uso de programa Statistica V.8.0 (<http://www.statsoft.com/>).

**CAPÍTULO IV.**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## RESULTADOS

---

### CUALITATIVOS

A continuación se presenta una secuencia de micrografías que evidencian, en términos cualitativos, los cambios ultraestructurales que experimentan no solo los tejidos tumorales sino también los tejidos que rodean al tumor en pacientes que previo a la cirugía fueron sometidos a tratamientos de radio y quimioterapia. Así mismo, fueron comparadas con nuestros controles negativos, pacientes que no recibieron ningún tipo de tratamiento antineoplásico previo a la cirugía.

#### Zona tumoral

Tanto en los pacientes tratados como en los no tratados, mostraron células epiteliales con abundante RER (Figura 3), gránulos de secreción, lípidos extraídos (Figura 1), pérdida de desmosomas de punto (Figura 4), mitocondrias edematizadas (Figuras 1, 3, 4 y 5), con baja densidad electrónica y desaparición de espacios intercrestas (Figura 3); cabe destacar que algunas de estas mitocondrias se encontraron asociadas a RER y vacuolas (Figura 4). La vacuolización en estos tejidos fue bastante extensa, evidenciándose abundantes vacuolas autofágicas complejas (Figuras 1,3 4 y 5), figuras mielínicas (Figura 3) y gránulos de lipofucsina. Los núcleos presentaron forma irregular, hipercromáticos (Figuras 3, 4 y 5), apreciándose en algunos casos una disposición irregular de los mismos en el citoplasma celular y con pseudoinclusiones (Figura 4).

En los pacientes tratados con quimioterapia y radioterapia, se evidenciaron luces de aspecto coloidal rodeadas por células epiteliales neoplásicas dispuestas de forma irregular y con pocas microvellosidades (Figura 4). Así mismo, fueron apreciados algunos eventos apoptóticos en estos mismos pacientes, los cuales incluyeron la presencia de linfocitos apoptóticos fagocitados por células neoplásicas (Figura 5) y cuerpos apoptóticos en el citoplasma celular.

La musculatura lisa tanto en pacientes tratados como en nuestros controles negativos, presentó un proceso necrótico marcado. Este proceso incluyó desaparición y desorganización total de los elementos contráctiles (Figuras 2 y 6), abundante vacuolización (Figuras 2 y 6), ribosomas libres (Figura 2), mitocondrias degeneradas con pérdida de densidad electrónica, figuras mielínicas, gránulos de lipofucsina, desaparición de placas densas y cuerpos Z, pérdida de la integridad de las membranas celulares (membrana plasmática y membrana basal), núcleos con contornos irregulares e hipercromáticos en la mayoría de los casos.

Por su parte, la microvasculatura de ambos tipos de pacientes, presentó alteraciones significativas ultraestructuralmente dentro de las cuales se encuentran el engrosamiento del citoplasma endotelial, prolongaciones del mismo hacia la luz, proliferación de organelos, mitocondrias edematizadas y degeneradas, núcleos alterados, oclusión de la luz del capilar, engrosamiento y reduplicación de la membrana basal. Igualmente, en el caso de la inervación, se observó degeneración tanto de los terminales nerviosos como de los axones, incluyendo la disminución de vesículas sinápticas en el caso de los terminales y distribución irregular de los neurofilamentos en los axones. El infiltrado celular estuvo constituido mayormente por neutrófilos y linfocitos.

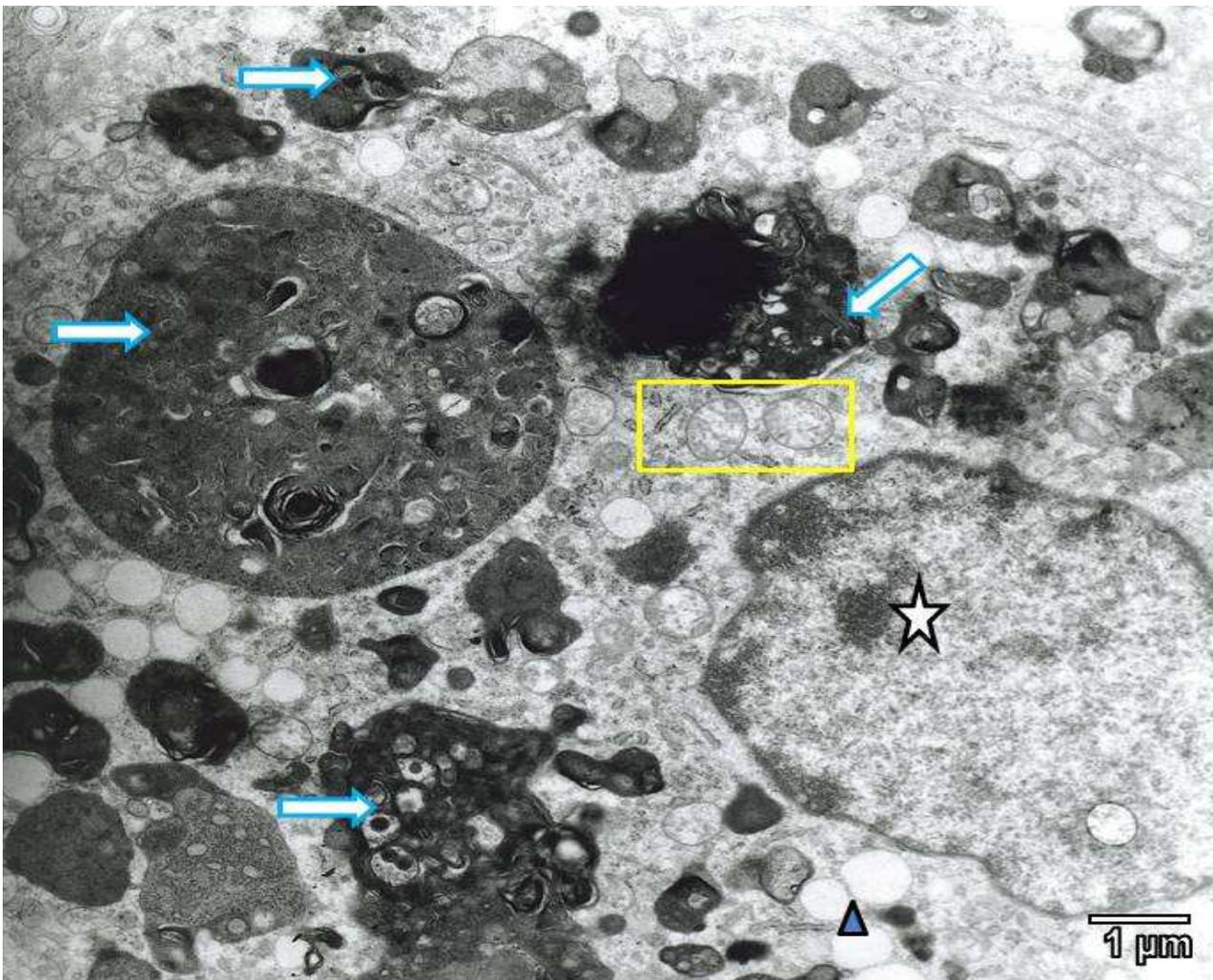


Figura 1. Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente no tratado con quimio y radioterapia (control negativo) en la **ZONA TUMORAL**. En las células epiteliales, se observan abundantes fagolisomas (flechas) distribuidos en todo el citoplasma celular, lípidos (triángulo), mitocondrias edematizadas (rectángulo) y núcleo (estrella).

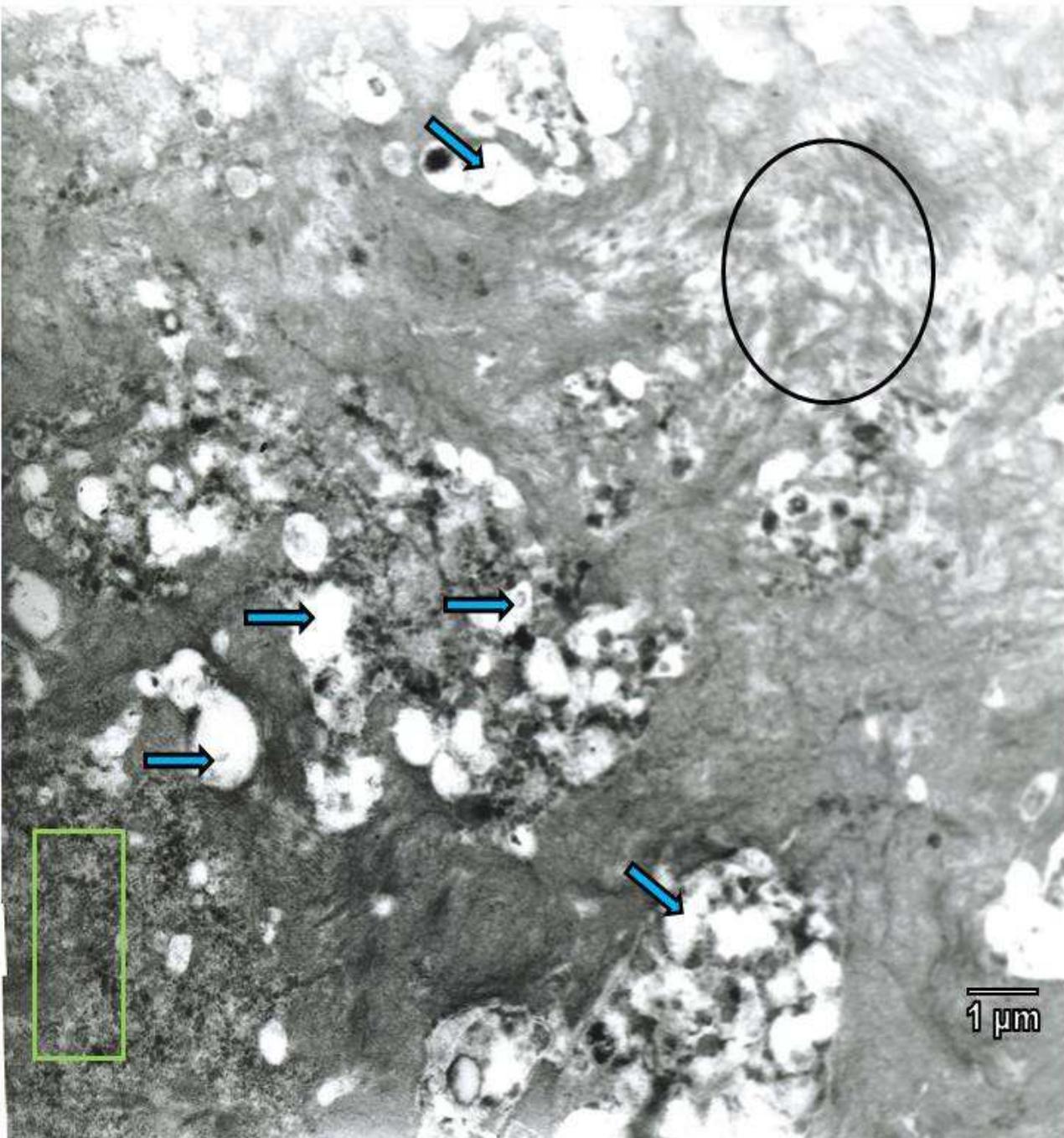
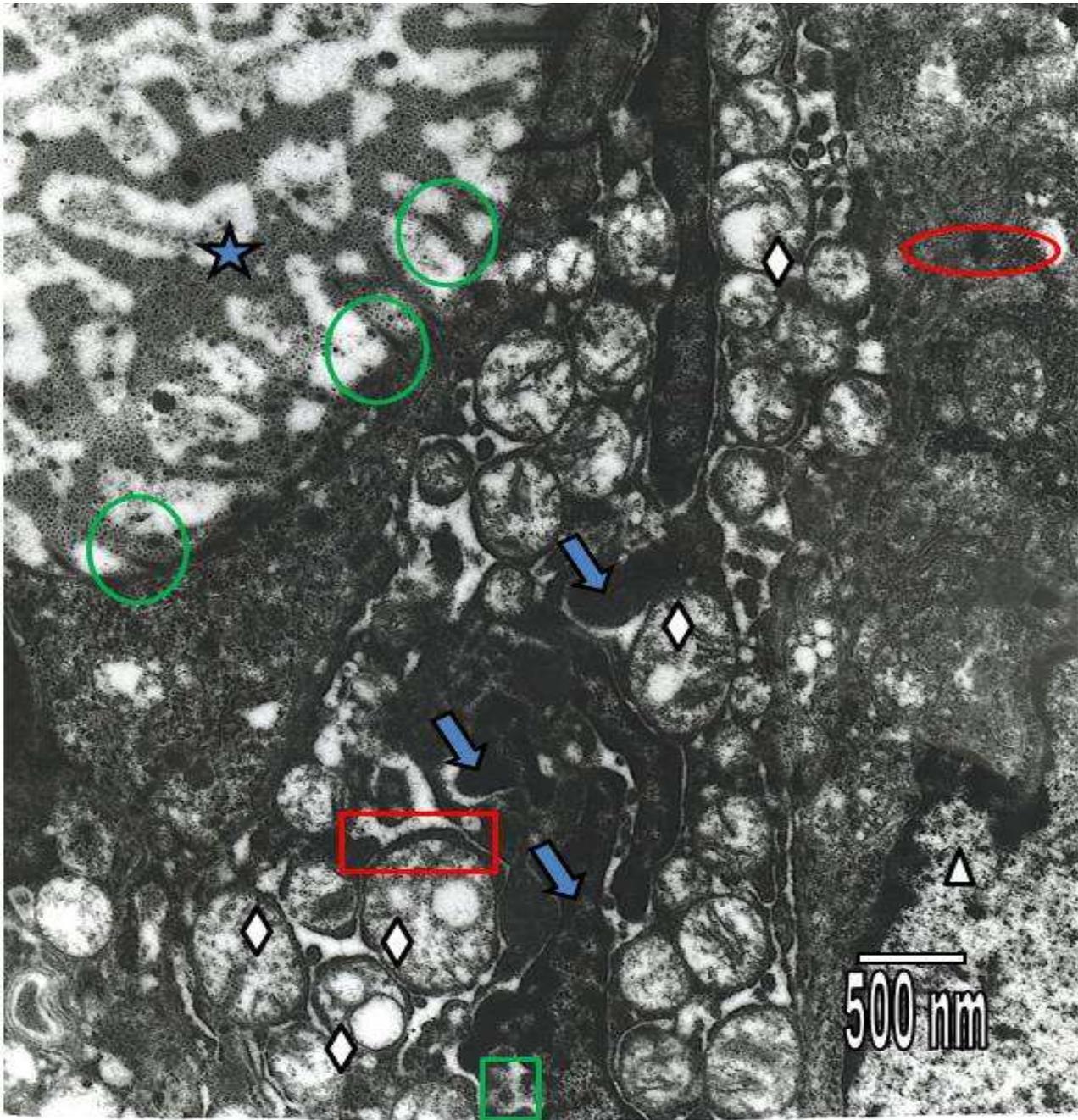


Figura 2. Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente no tratado con quimio y radioterapia (control negativo) en la **ZONA TUMORAL**. Se aprecia un proceso necrótico con desaparición y desorganización total de los elementos contráctiles (círculo) de las células musculares lisas. Así mismo, se evidencian abundantes restos celulares en el citoplasma (flechas) y abundantes ribosomas (rectángulo).



**Figura 3.** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia en la **ZONA TUMORAL**. Nótese a nivel de las células de la mucosa abundante RER (círculos), así como también procesos autofágicos (flechas) y figuras mielínicas (rombo). Sus núcleos también fueron evidentes (estrellas). Las mitocondrias se encuentran edematizadas, con disminución de crestas y baja densidad electrónica (triángulos).



**Figura 4.** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia en la **ZONA TUMORAL**. Nótese la presencia de luces rodeadas por células epiteliales neoplásicas con pocas microvellosidades (círculos). El contenido de estas luces es de aspecto coloidal (estrella). La disposición de las células endoteliales es irregular, con mitocondrias edematizadas, desaparición de espacios intercrestas y vacuolización (rombos); algunas se encuentran asociadas a RER (rectángulo). Los núcleos se presentan de forma irregular (triángulo) y algunos hiper cromáticos (flechas) y con pseudo inclusiones (cuadrado). Los desmosomas de punto (macula adherens) son muy escasos (elipse).

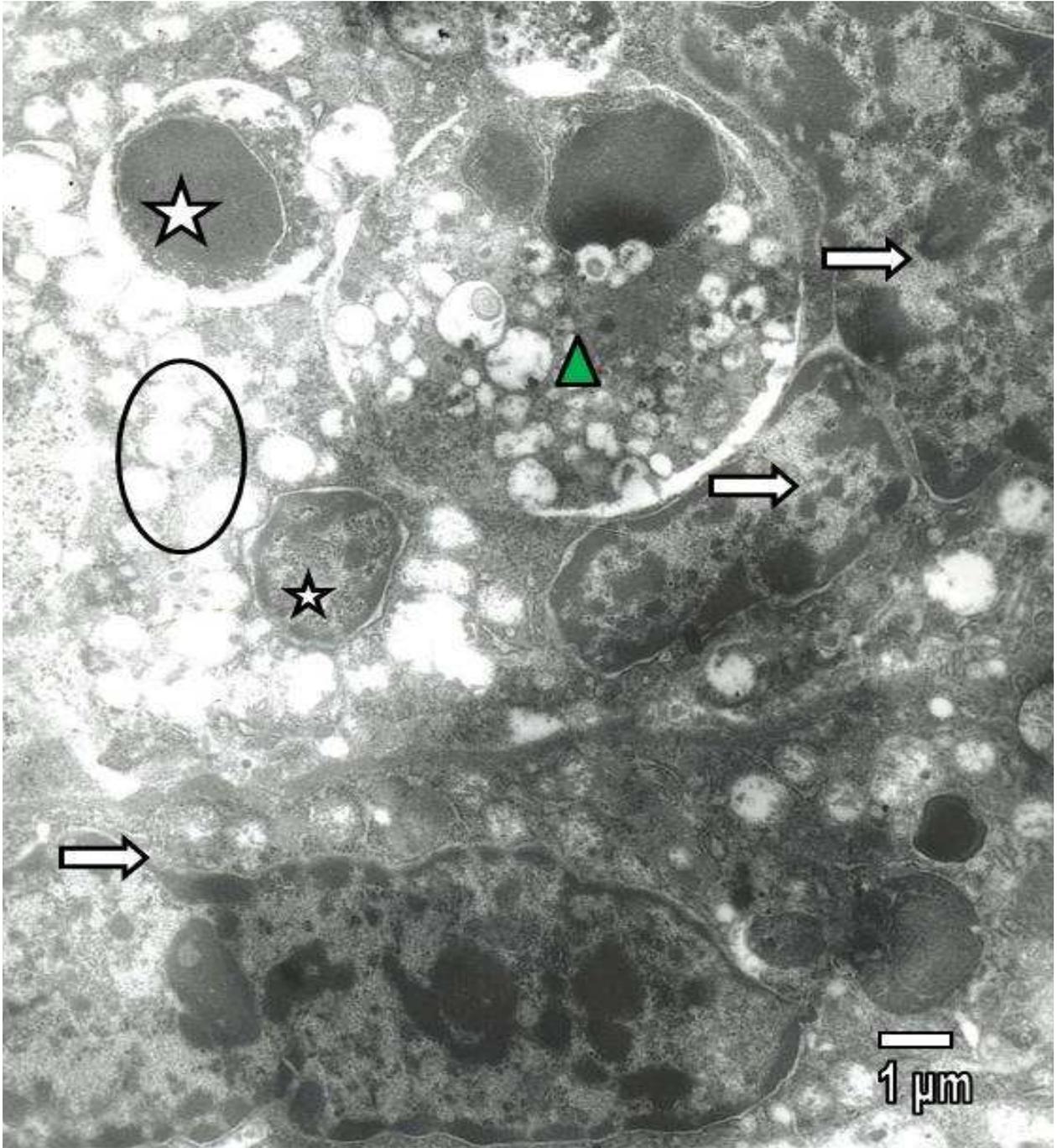
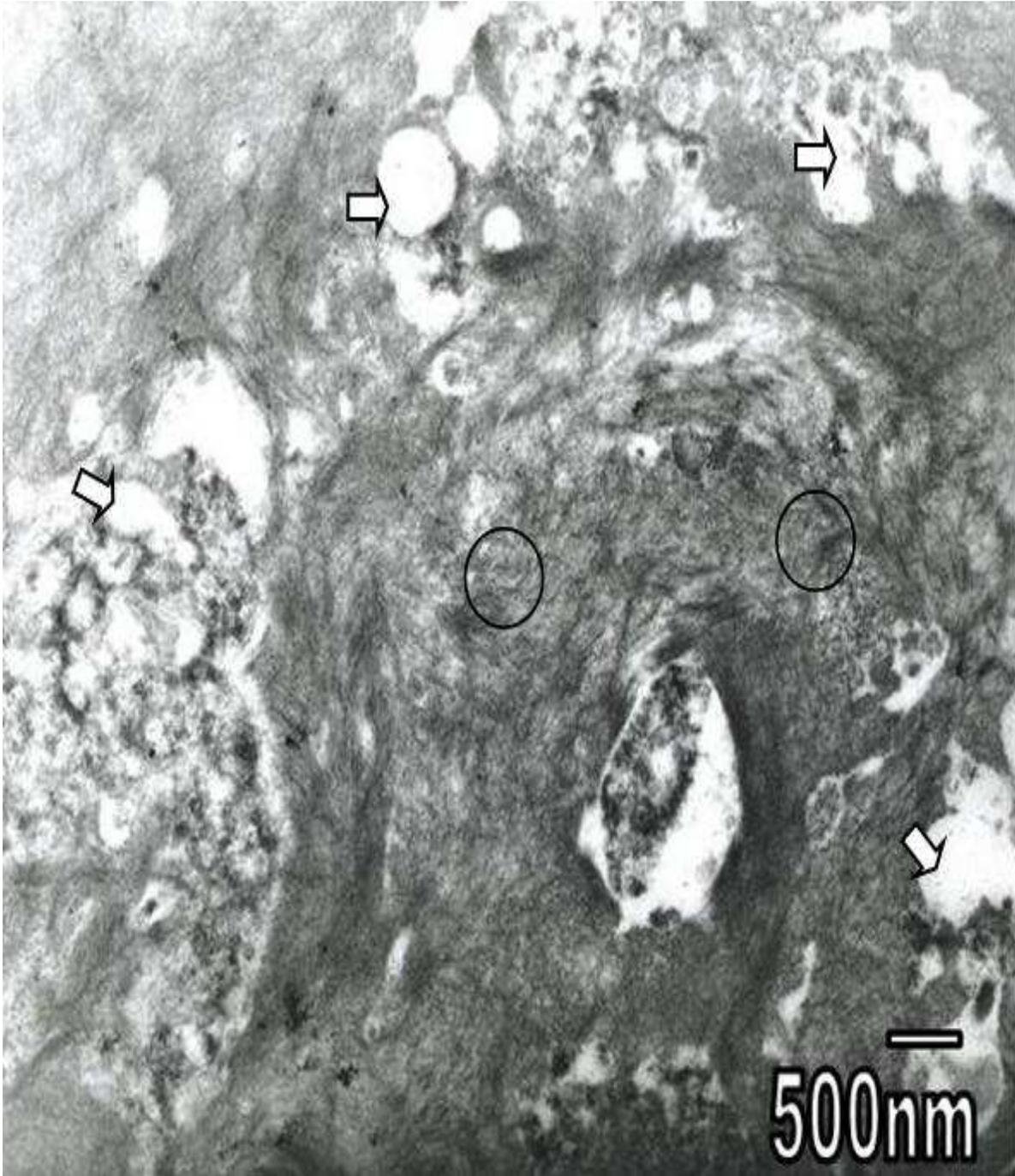


Figura 5. Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia en la **ZONA TUMORAL**. Se aprecian linfocitos apoptóticos (estrellas), los cuales se encuentran siendo fagocitados por las células tumorales. Igualmente se pueden observar los núcleos de estas células neoplásicas (flechas), fagolisosoma (triángulo) y mitocondrias edematizadas (elipse).



**Figura 6.** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia en la **ZONA TUMORAL**. Se puede observar un proceso necrótico muy marcado con elementos contráctiles de las células musculares lisas totalmente desorganizados (círculo), notándose una disposición circular de los mismos. La formación de vacuolas autofágicas también fue evidente (flechas).

### **A nivel peritumoral**

Las células musculares lisas tanto en los pacientes tratados como en los controles negativos, presentaron un proceso necrótico muy marcado incluso en las mayores distancias tomadas (a 4 cm de la zona proximal del tumor), los cuales incluyeron alteraciones como desaparición y desorganización de los elementos contráctiles (Figuras 10, 16, 19, 33, y 34), en algunos casos se pudo observar zonas desprovistas de elementos contráctiles ocupadas por abundante glucógeno (Figura 31), disminución de cuerpos Z y placas densas (Figuras 7, 15, 16, 20, 21, 26, 27, 28, y 29), pérdida característica de membranas celulares (Figuras 7, 15, 16, 20, y 32), engrosamiento de la membrana basal (Figura 22), mitocondrias edematizadas y degeneradas, con desaparición de espacios intercrestas (Figuras 7, 19, 21, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 32, y 33), vacuolización evidente (Figuras 10, 15, 20, 25, 26, y 30), gránulos de lipofucsina (Figura 14), cuerpo multivesicular (Figura 27), figuras mielínicas, pocas vesículas pinocíticas y caveolas encontrándose algunas edematizadas (Figuras 25, 28, y 29). El núcleo de estas células también presentó alteraciones significativas incluyendo contornos irregulares, hipercromasia, dilatación y pérdida de la envoltura nuclear (Figuras 10, 15, 19, 20, 21, y 28).

Así mismo, fue observado abundante colágeno en el espacio extracelular (Figuras 22, 26, 27, 34, 35, y 36), material necrotizado (Figura 21), macrófagos (Figuras 9, 13, 28, 30, 35, y 36), células plasmáticas (Figura 9), plasmocitos (Figura 17), célula citotóxica natural o Natural Killer (Figura 24), mastocitos (Figura 30), y neutrófilos.

La microvasculatura, al igual que en la zona tumoral, tanto en los pacientes que recibieron tratamiento antineoplásico como en los que no, presentó alteraciones como engrosamiento del endotelio (Figuras 12, 21, y 22), algunas uniones endoteliales (Figura 22), proliferación de organelos (Figura 12), mitocondrias edematizadas y degeneradas (Figuras 12, 13, y 32), prolongaciones del endotelio hacia la luz del capilar (Figuras 14, 17 y 29), núcleo con forma irregular con heterocromatina periférica (Figuras 11 y 13), membrana basal engrosada y reduplicada (Figuras 8, 9, 11, 14 y 32), oclusión de la luz (Figura 12), y algunos pericitos pocos alterados (Figuras 14 y 29).

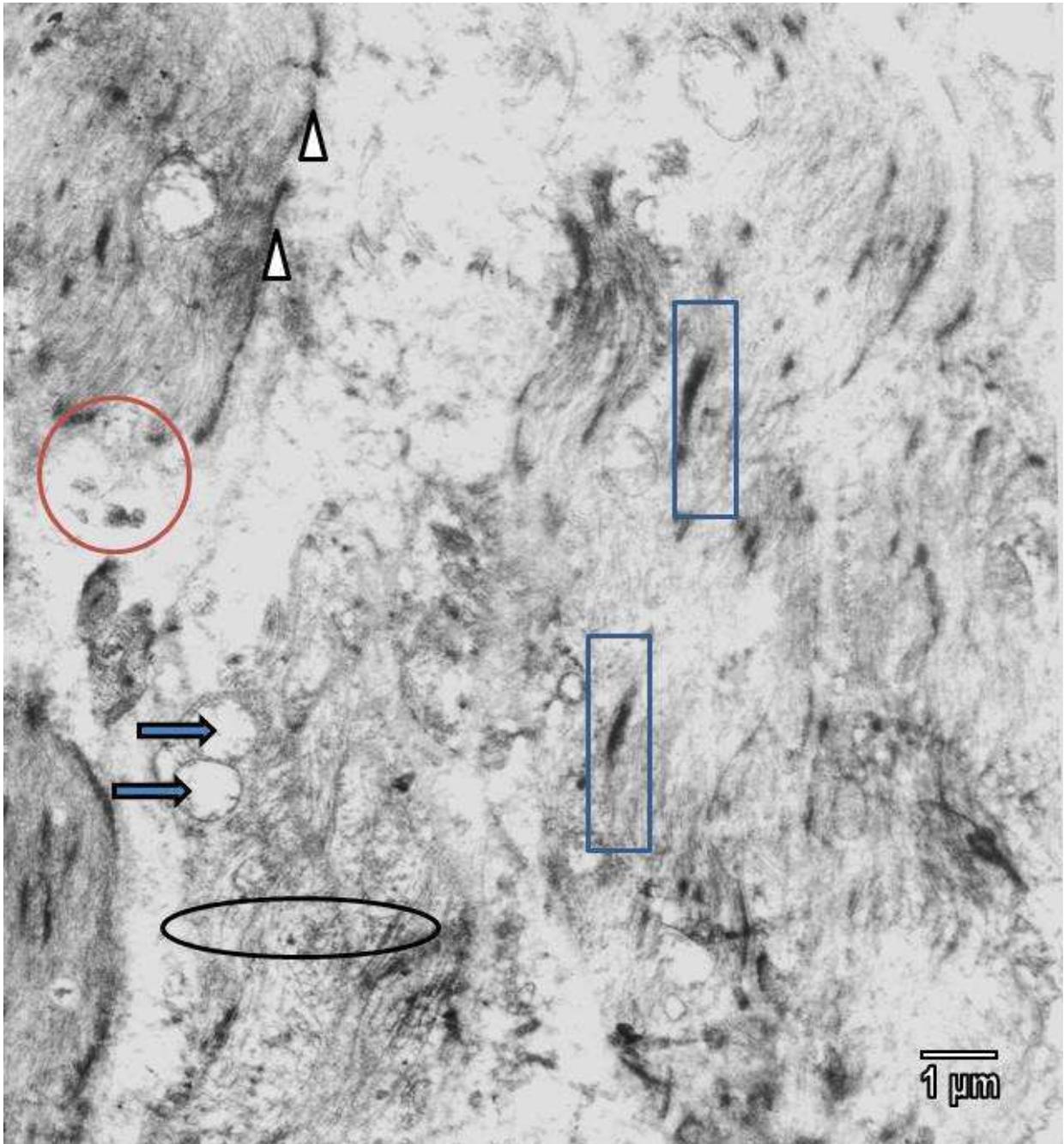
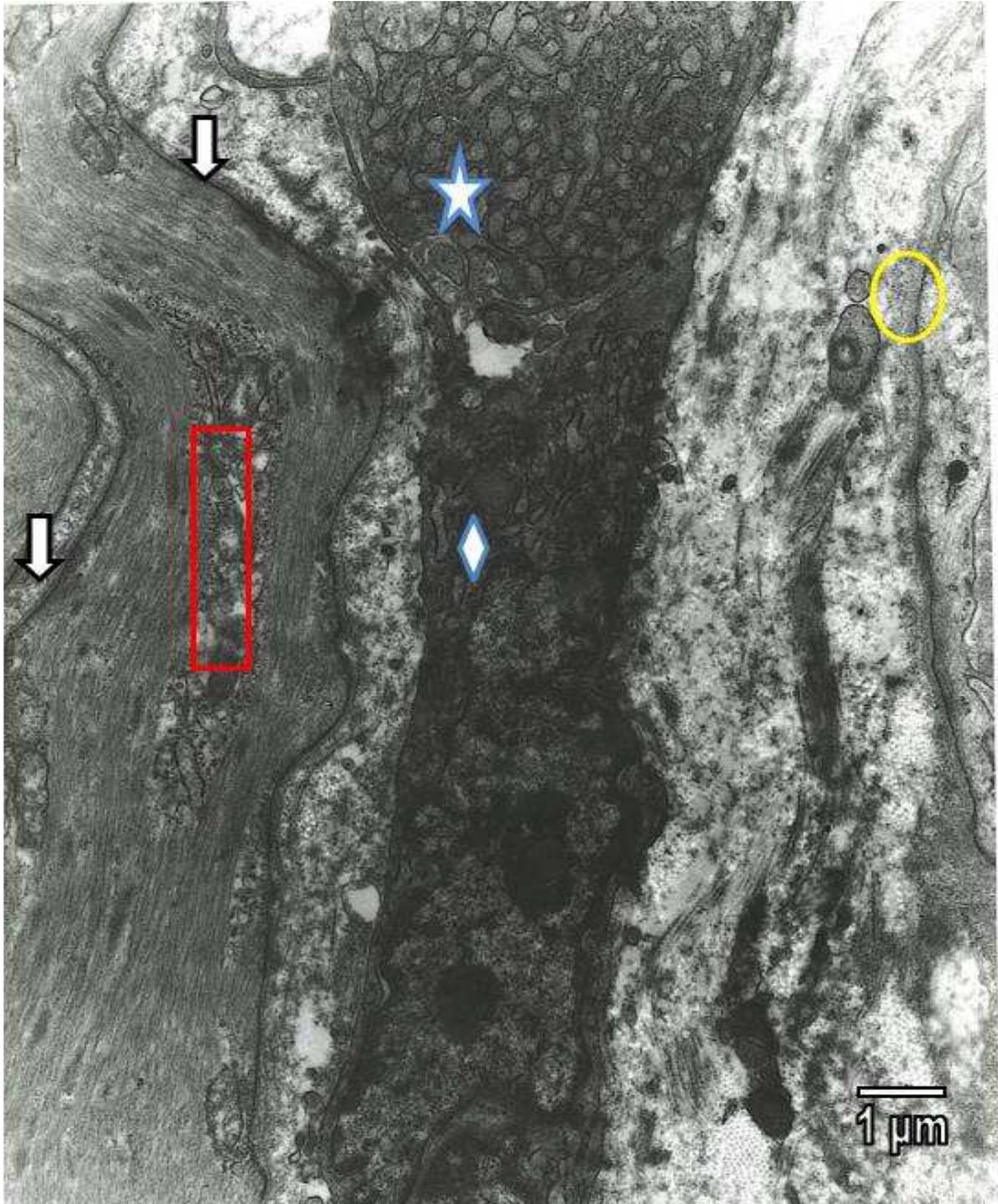


Figura 7. Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente no tratado con quimio y radioterapia (control negativo) a **1 CM DE LA ZONA DISTAL DEL TUMOR**. Se puede observar un proceso de degeneración con evidente pérdida y desorganización de los elementos contráctiles de las células musculares lisas con disminución de cuerpos Z (rectángulos), placas densas (triángulo), y pérdida de la membrana plasmática y basal de estas células (círculo). Por su parte, se observan axones con disposición irregular de neurofilamentos (elipse), y mitocondrias degeneradas (flechas) en las células d Schwann que los rodean.

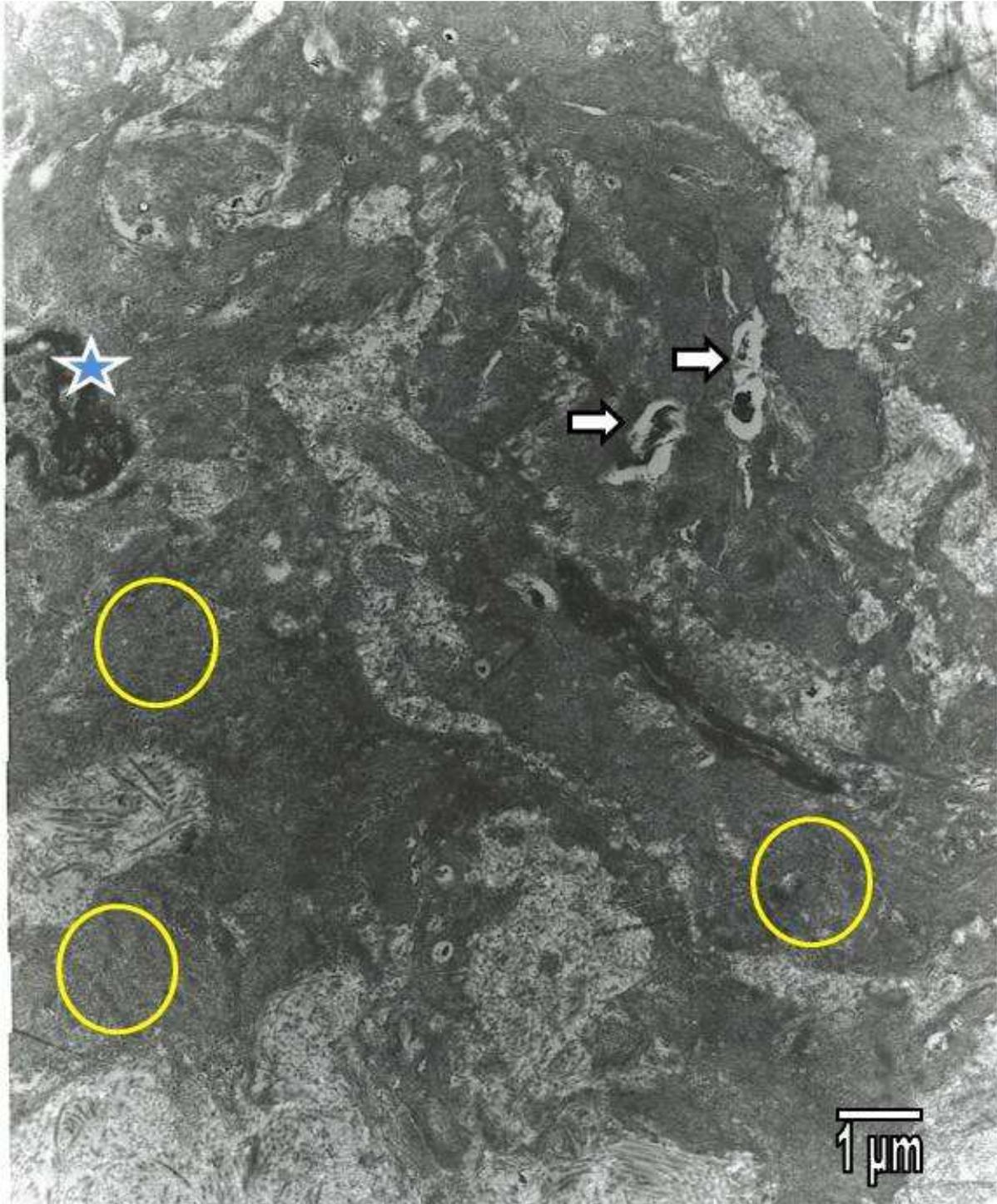
En el caso de la inervación, en ambos pacientes, se apreció no solo la degeneración de los terminales nervioso junto con la disminución de las vesículas sinápticas (Figuras 12, 18, 23, 25, 32 y 35) y pérdida de membranas (Figura 18), sino también la degeneración de los axones amielínicos que incluyeron la asociación con vacuolas (Figura 23), desaparición y desorganización de los neurofilamentos y neurotúbulos (Figuras 7, 23, 25, 27 y 35). Las células de Schwann presentaron degeneración en algunos casos, con mitocondrias edematizadas (Figuras 7 y 25).



Figura 8. Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente no tratado con quimio y radioterapia (control negativo) a **1 CM DE LA ZONA DISTAL DEL TUMOR**. Nótese la presencia de un vaso con membrana basal engrosada (rectángulo) y reduplicada (círculo). Se observan igualmente gránulos de lipofuscina (flecha) en el endotelio vascular, así como también núcleo con forma muy irregular (estrella), y eritrocitos en la luz del vaso (E).



**Figura 9.** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a **1 CM DE LA ZONA DISTAL DEL TUMOR**. Se aprecia célula muscular lisa con placas densas (flechas), y edematización de mitocondrias (rectángulo). La membrana basal de un capilar se encuentra engrosada (círculo) y en el espacio extracelular se observa un macrófago (rombo) en contacto con una célula plasmática (estrella).



**Figura 10.** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a **1 CM DE LA ZONA DISTAL DEL TUMOR.** Nótese un proceso de degeneración con núcleo pignótico (estrella), vacuolización evidente (flechas) y desorganización de elementos contráctiles (círculos) de las fibras musculares lisas.

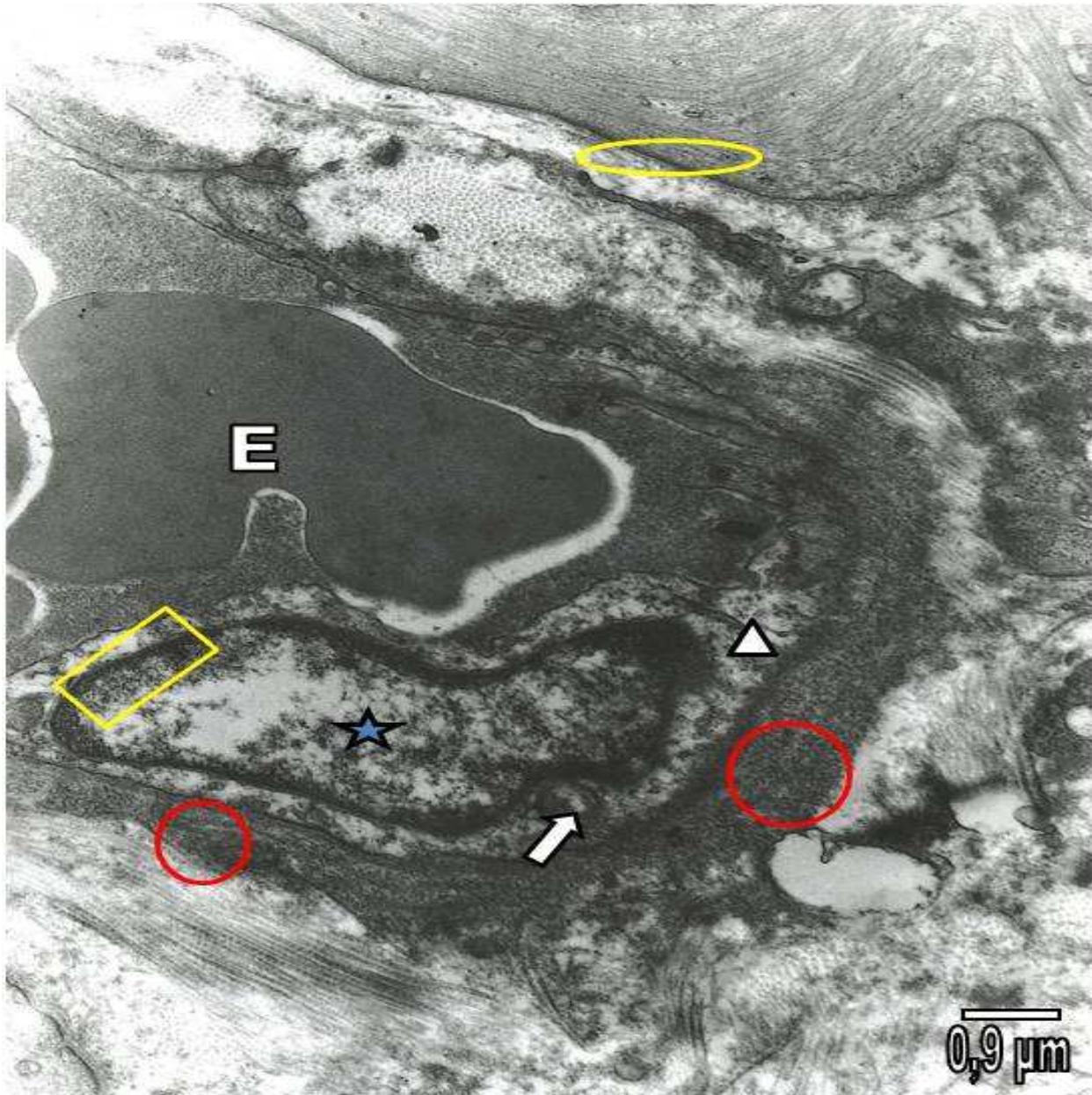


Figura 11. Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a **1 CM DE LA ZONA DISTAL DEL TUMOR**. Se aprecia capilar con eritrocito (E) en su interior, citoplasma endotelial se encuentra muy electrotransparente (triángulo), membrana basal reduplicada (círculos), núcleo endotelial con heterocromatina periférica (rectángulo) y nucleoplasma con material particulado (estrella). Igualmente se puede observar parte de una célula muscular con placas densas (elipse) y cuerpos Z no evidenciados.

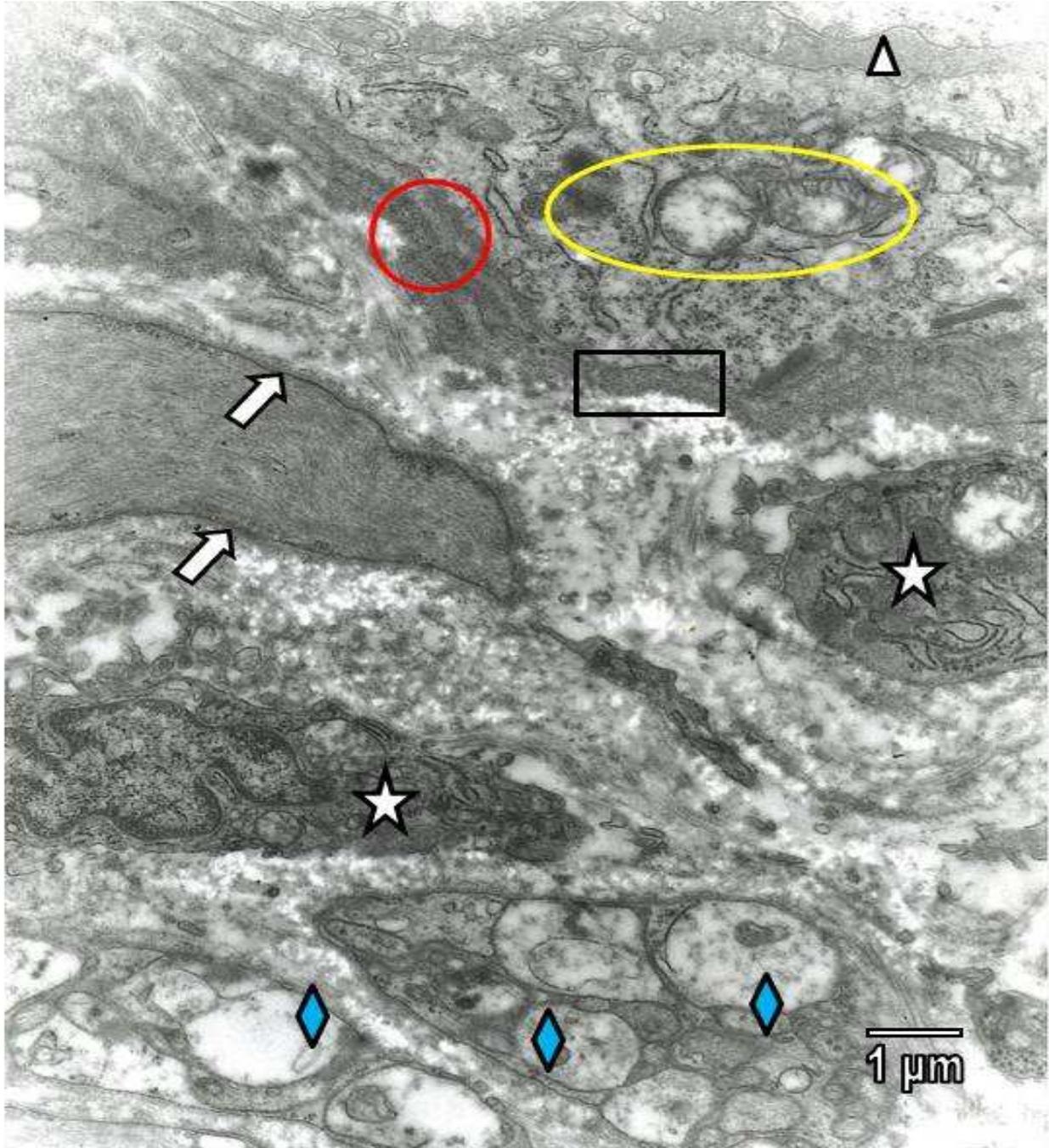
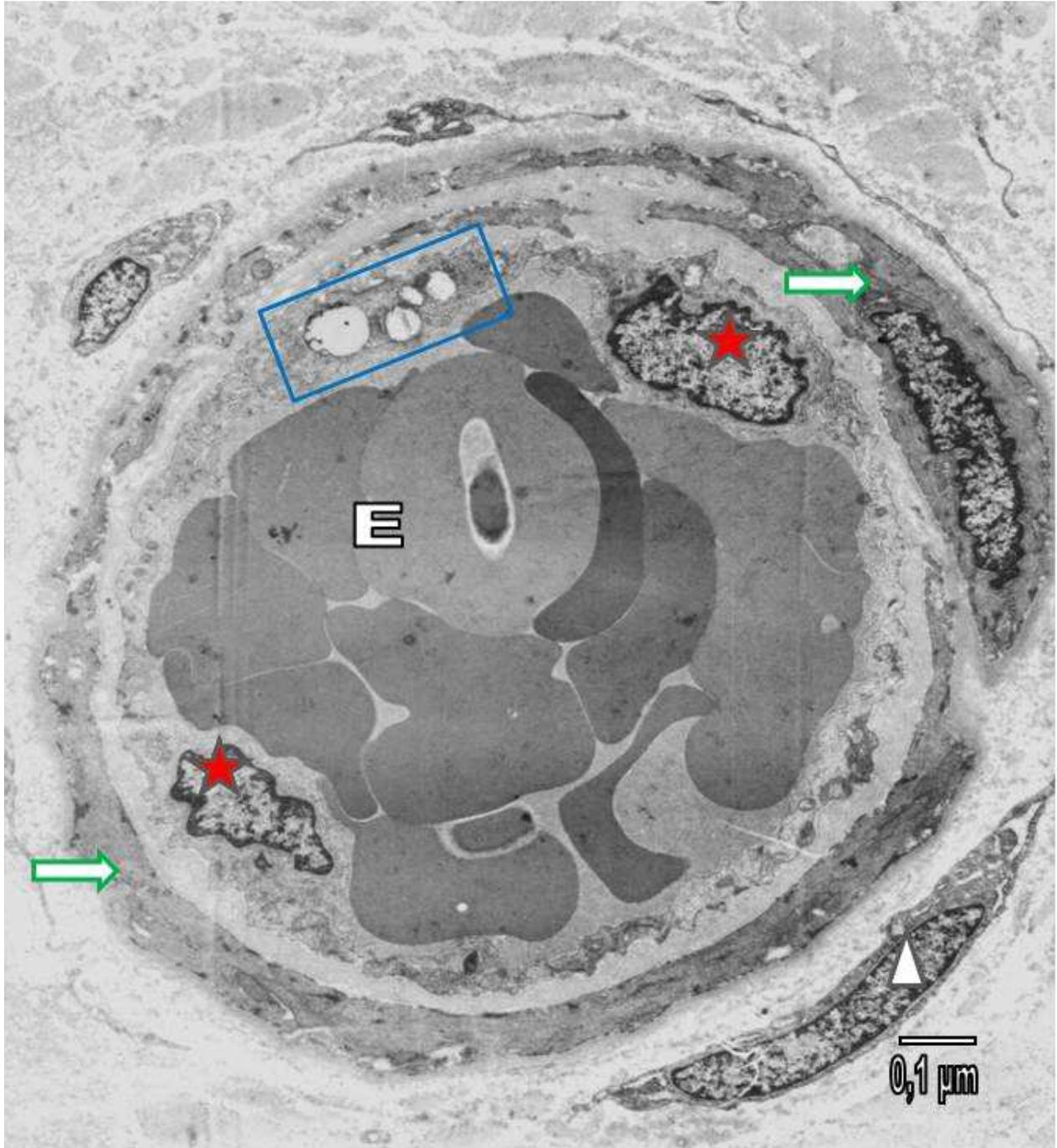
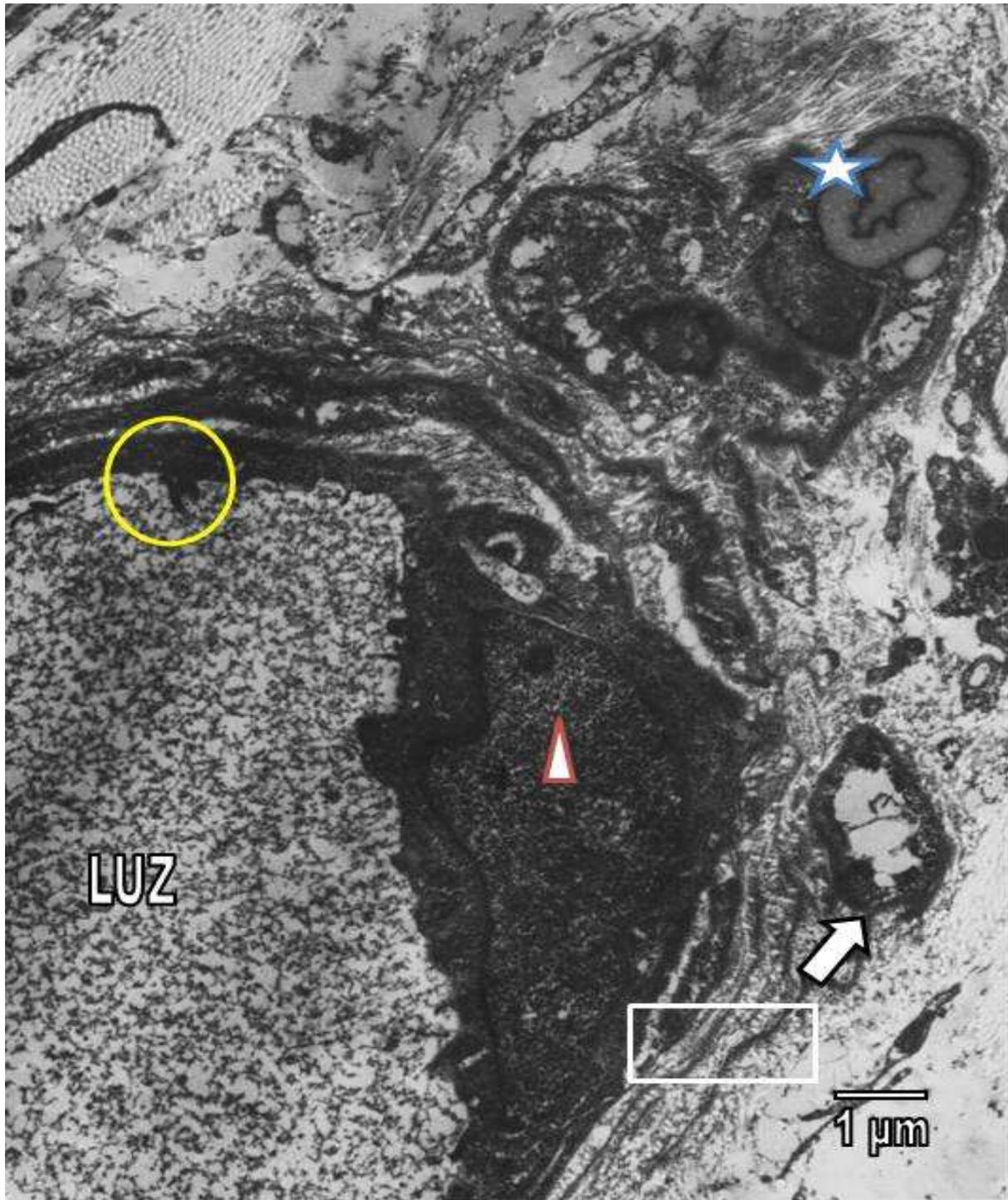


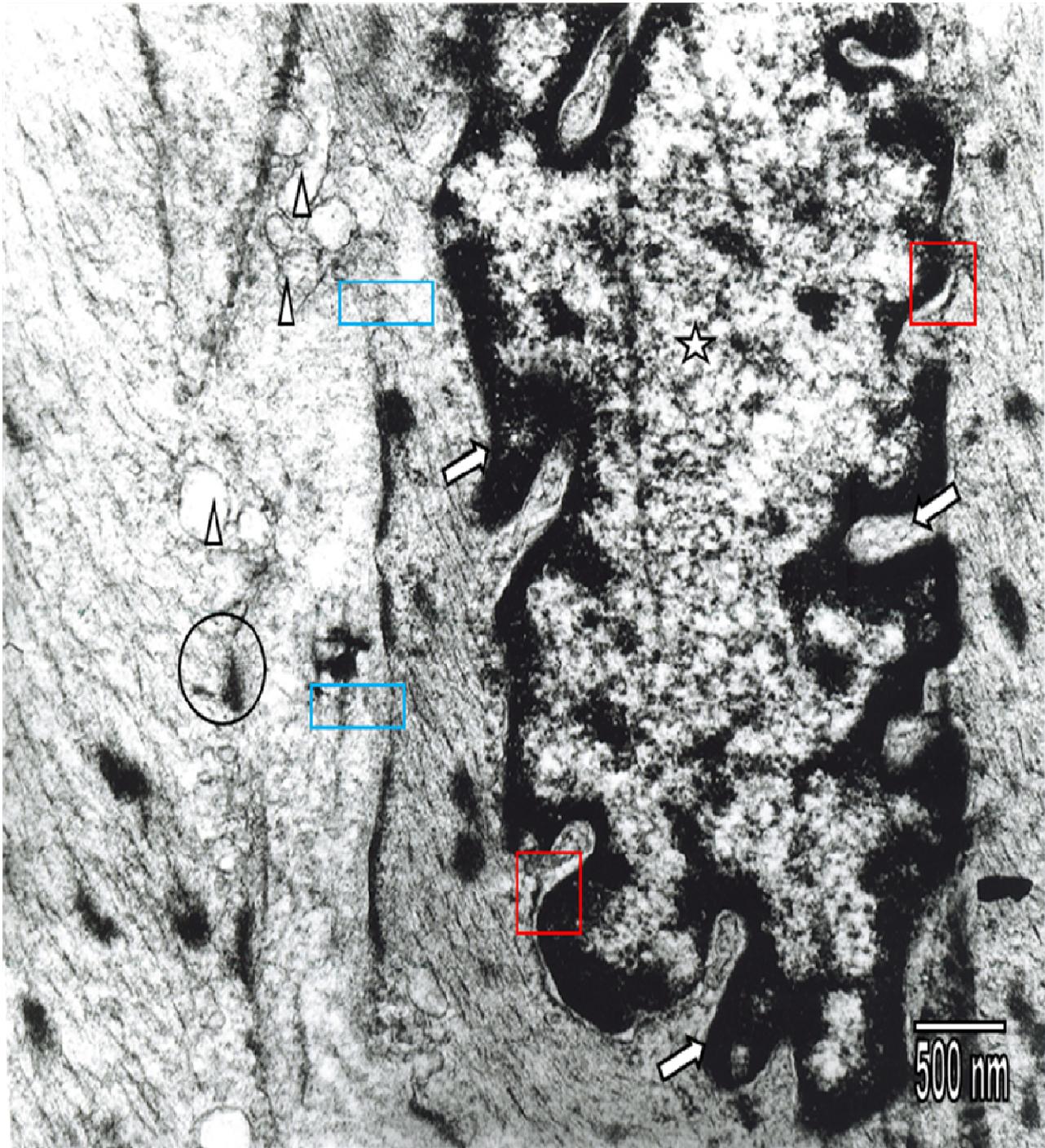
Figura 12. Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a **1 CM DE LA ZONA DISTAL DEL TUMOR**. Se observa la presencia de una célula muscular lisa con placas densas (flechas), sin embargo no se observan cuerpos Z. A nivel del capilar se aprecia reduplicación de la membrana basal (círculo), así como engrosamiento de la misma en otras zonas (rectángulo). La luz se encuentra ocluida (triángulo), pared de la célula endotelial engrosada con proliferación de organelos y mitocondrias edematizadas (elipse). También aprecian dos células fibroblásticas (estrellas) en el espacio extracelular, y terminales amielínicos con disminución de vesículas sinápticas (rombos).



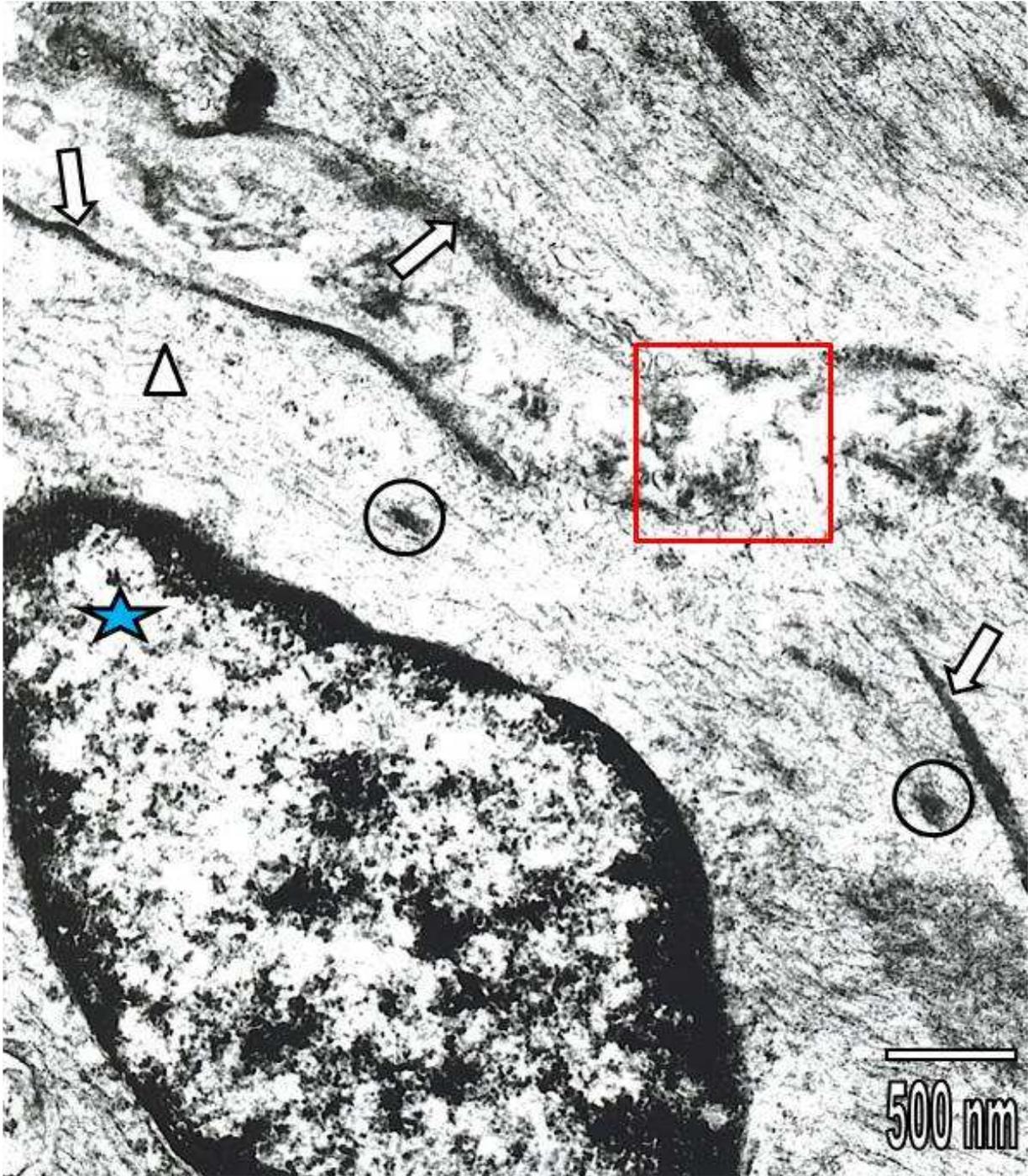
**Figura 13.** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente no tratado con quimio y radioterapia (control negativo) a **1 CM DE LA ZONA PROXIMAL DEL TUMOR**. Se aprecia un vaso de gran calibre rodeado por capa muscular lisa (flechas). Las células endoteliales presentan mitocondrias degeneradas (rectángulo), núcleos un poco irregulares (estrellas) y se puede notar la presencia de fibroblastos (triángulo).



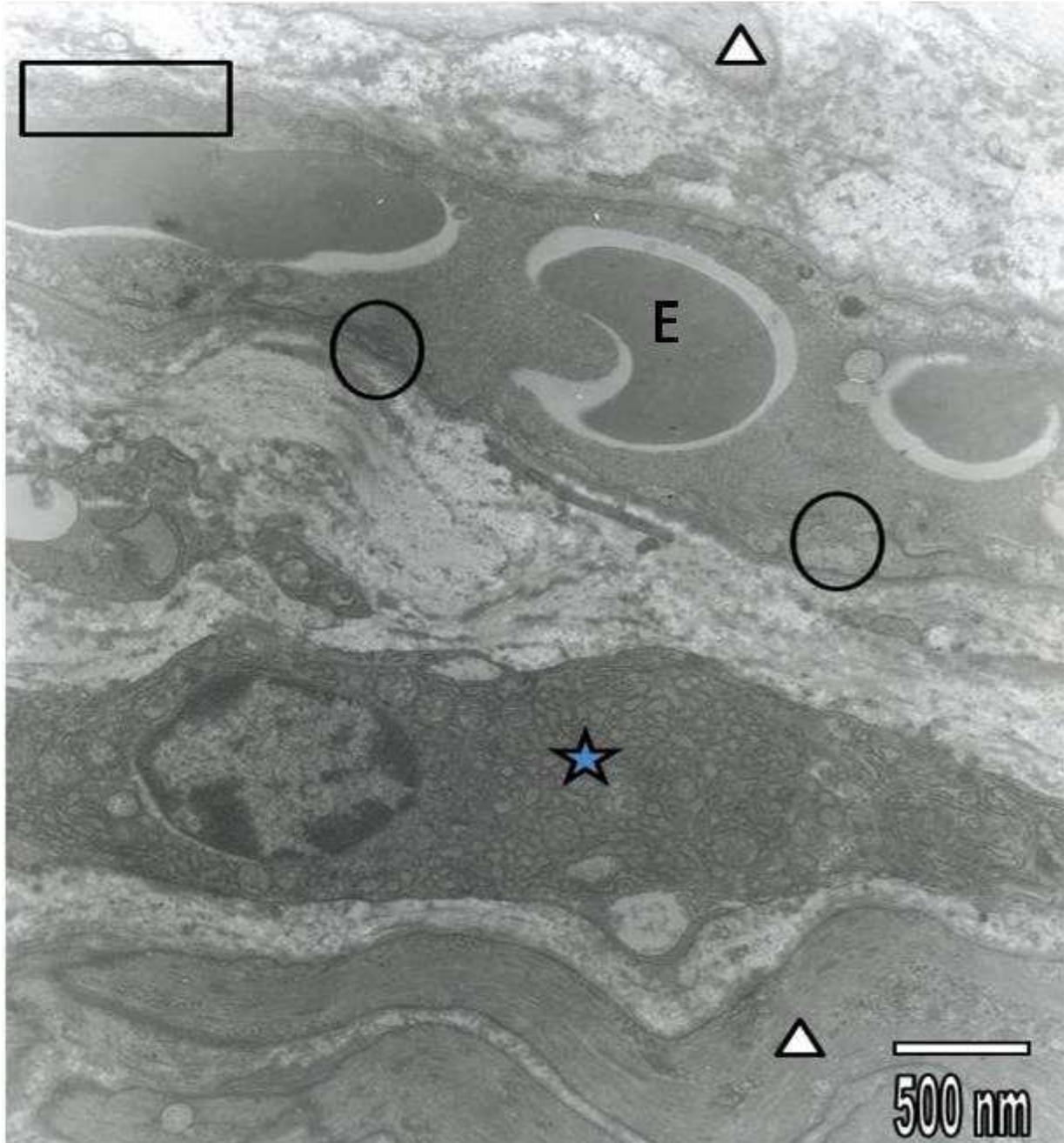
**Figura 14.** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente no tratado con quimio y radioterapia (control negativo) a **1 CM DE LA ZONA PROXIMAL DEL TUMOR**. Se puede observar un vaso con contenido endotelial sumamente electrondenso incluyendo el núcleo (triángulo). También se aprecian prolongaciones del endotelio (círculo) hacia la luz del vaso, membrana basal reduplicada (rectángulo), y pericito un poco alterado (flecha). Nótese la presencia de una célula muscular atrófica con gránulos de lipofuscina evidente (estrella).



**Figura 15.** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a **1 CM DE LA ZONA PROXIMAL DEL TUMOR**. Es evidente el proceso de necrotización observándose la característica pérdida de la membrana plasmática (rectángulos) de la célula muscular lisa. Se presentan vesículas y vacuolas de diámetro incrementado (triángulos), cuerpos Z (círculo), núcleo con contornos irregulares (flechas) y envoltura nuclear dilatada (cuadrados).



**Figura 16** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a **1 CM DE LA ZONA PROXIMAL DEL TUMOR**. Se aprecia un proceso necrótico con pérdida evidente de la membrana plasmática y basal (cuadrado), a pesar que aún quedan restos de la membrana basal en algunas zonas. La célula muscular lisa presenta pérdida de elementos contráctiles (triángulo), placas densas (flechas) y cuerpos Z (círculos) característicos. El núcleo (estrella) con pérdida de la envoltura nuclear.



**Figura 17.** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a **1 CM DE LA ZONA PROXIMAL DEL TUMOR.** Se observa un capilar con algunos eritrocitos (E), endotelio alterado con disminución de vesículas pinocíticas y caveolas (rectángulo), así como también algunas prolongaciones endoteliales hacia la luz (círculos). Se aprecian células musculares lisas (triángulos) y la presencia de un plasmocito (estrella) entre las células musculares.

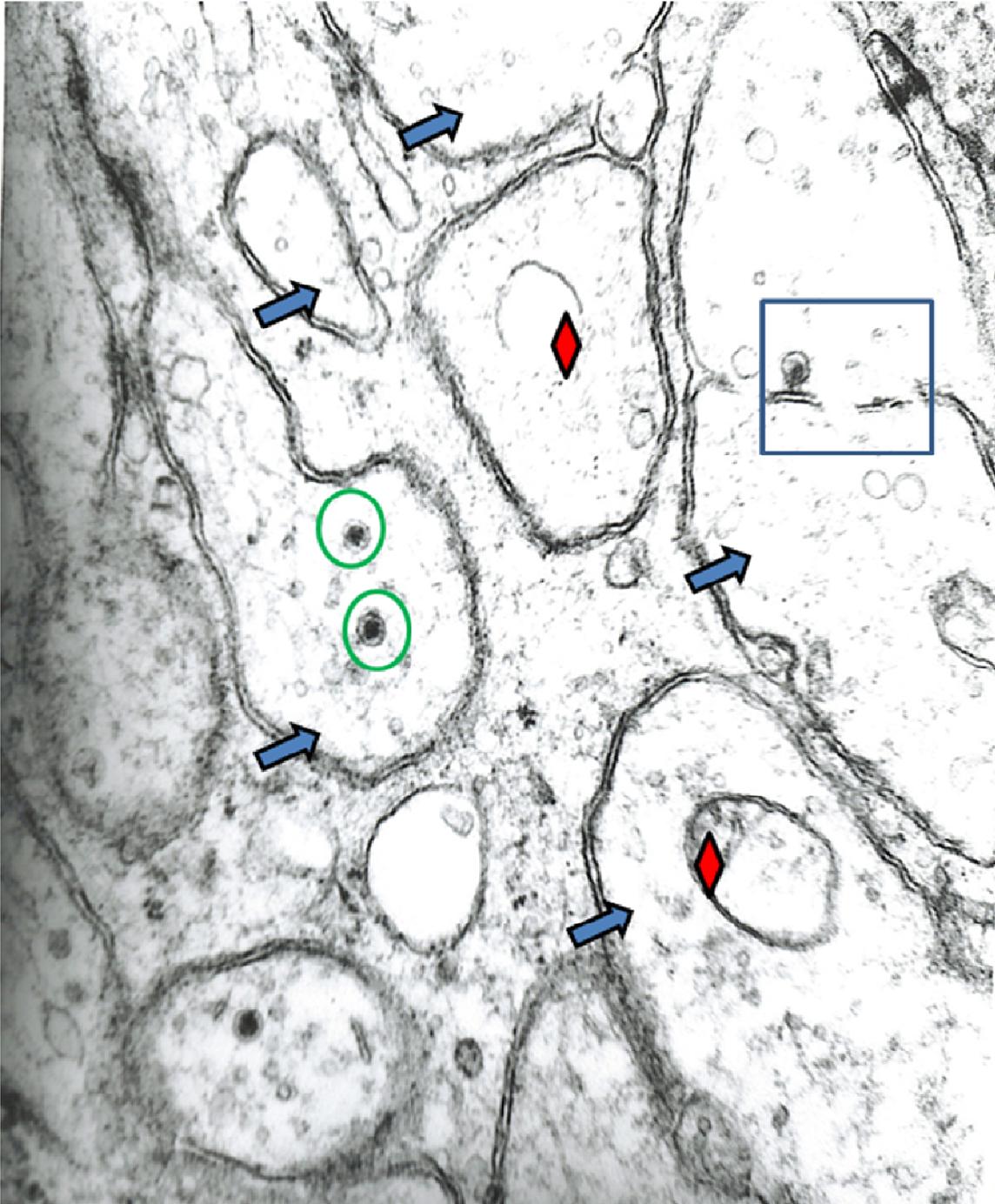


Figura 18. Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a **1 CM DE LA ZONA PROXIMAL DEL TUMOR.** Se observan terminales nerviosos alterados, con disminución evidente de vesículas sinápticas (flechas), presencia de algunos moduladores (círculos) y asociaciones con mitocondrias edematizadas (rombos). Nótese la pérdida membranas entre dos terminales nerviosos (cuadrado).

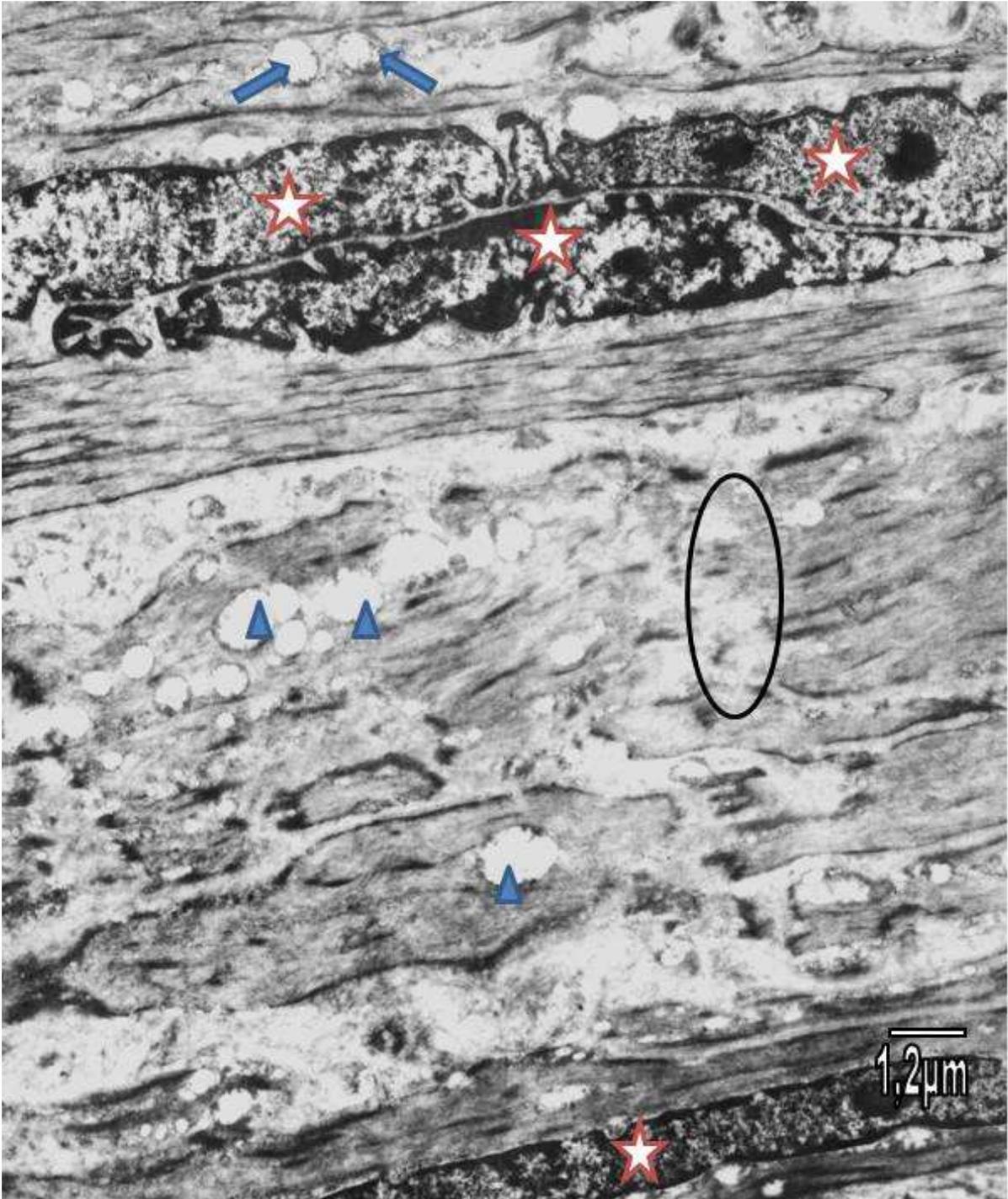
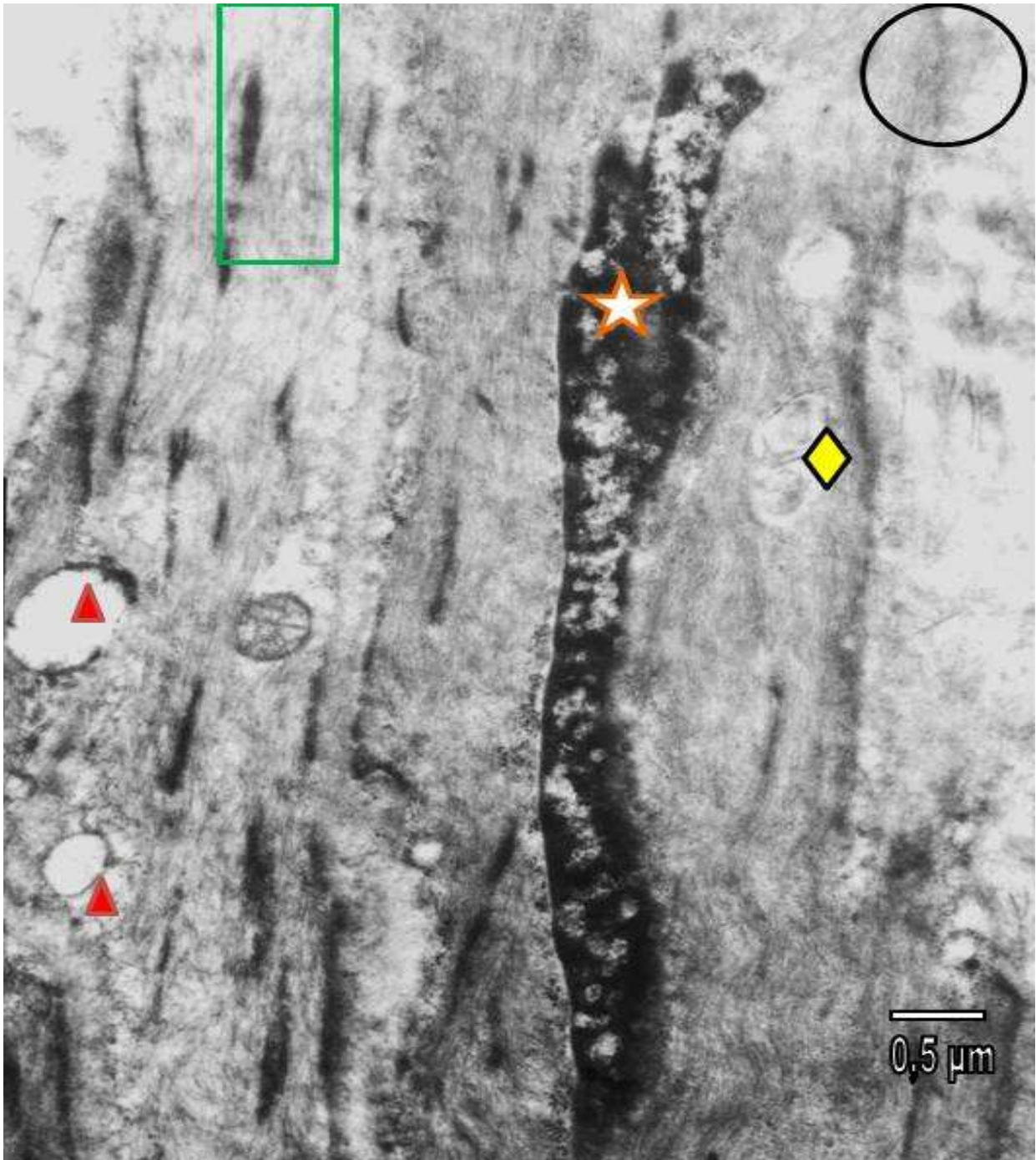
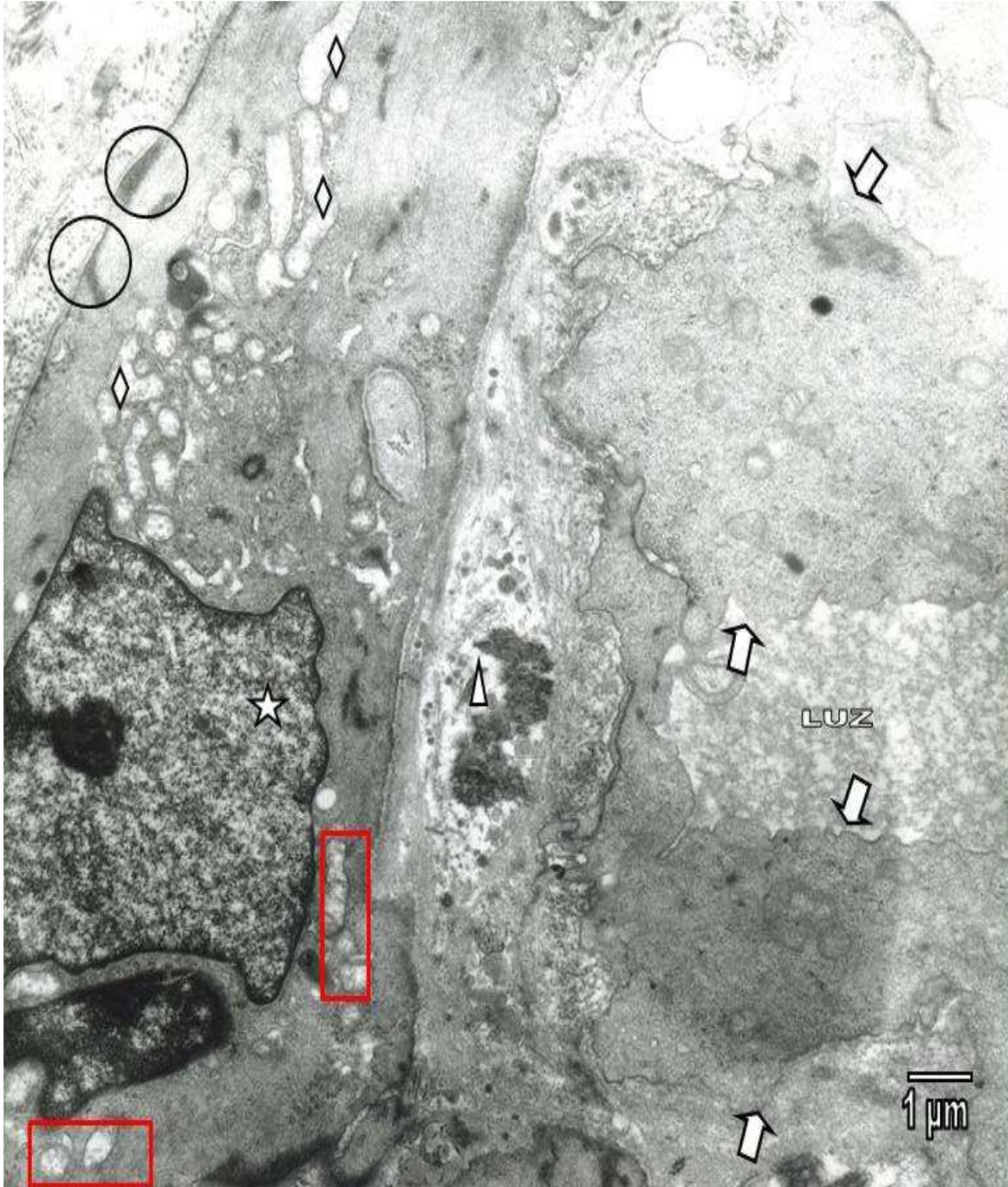


Figura 19. Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente no tratado con quimio y radioterapia (control negativo) a **2 CM DE LA ZONA PROXIMAL DEL TUMOR**. Se aprecian células musculares lisas con núcleos pignóticos (estrellas), pérdida de elementos contráctiles (elipse), mitocondrias degeneradas (triángulos), y en algunos casos en contacto con el espacio

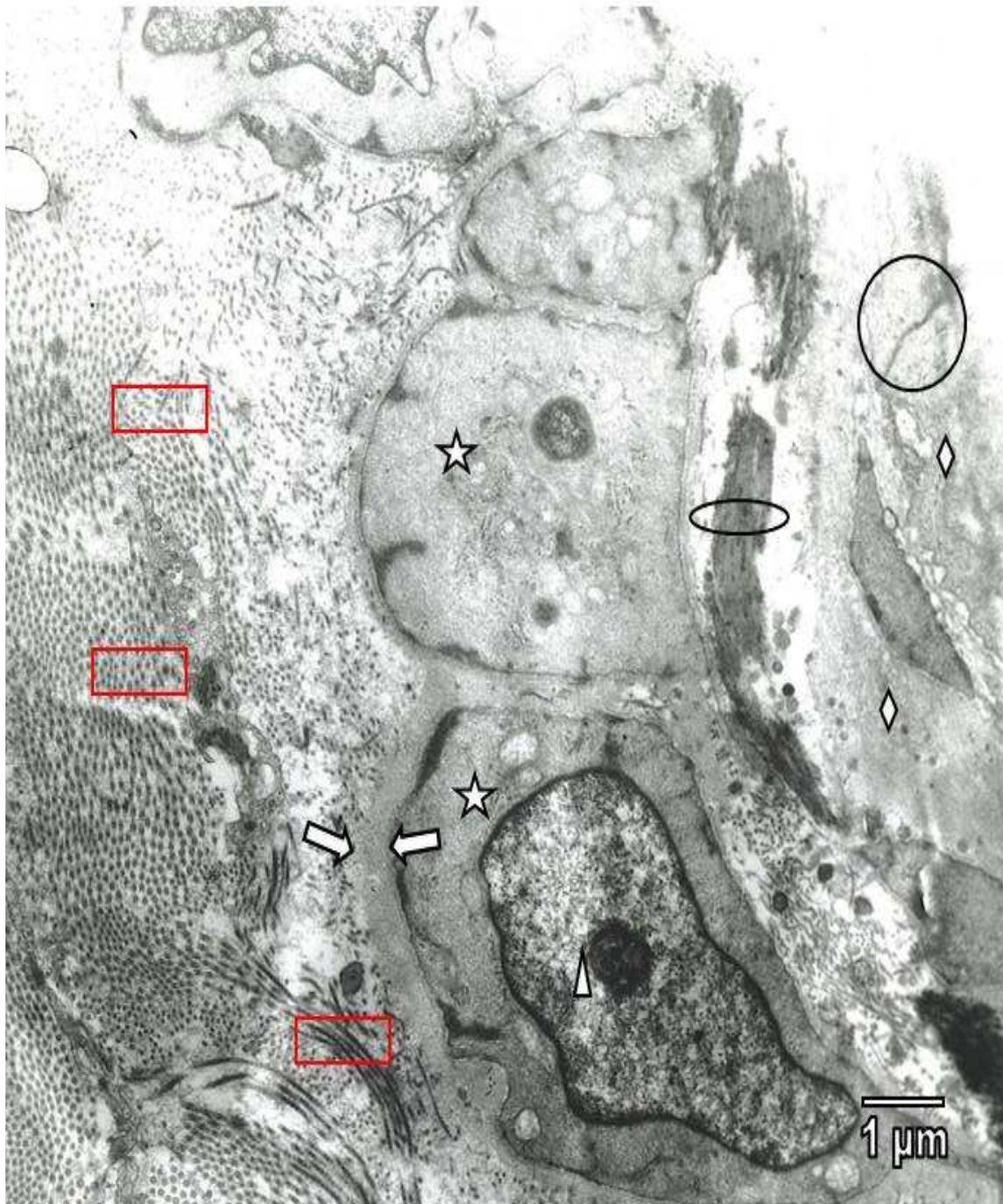


extracelular por pérdida de la membrana plasmática y basal (flechas).

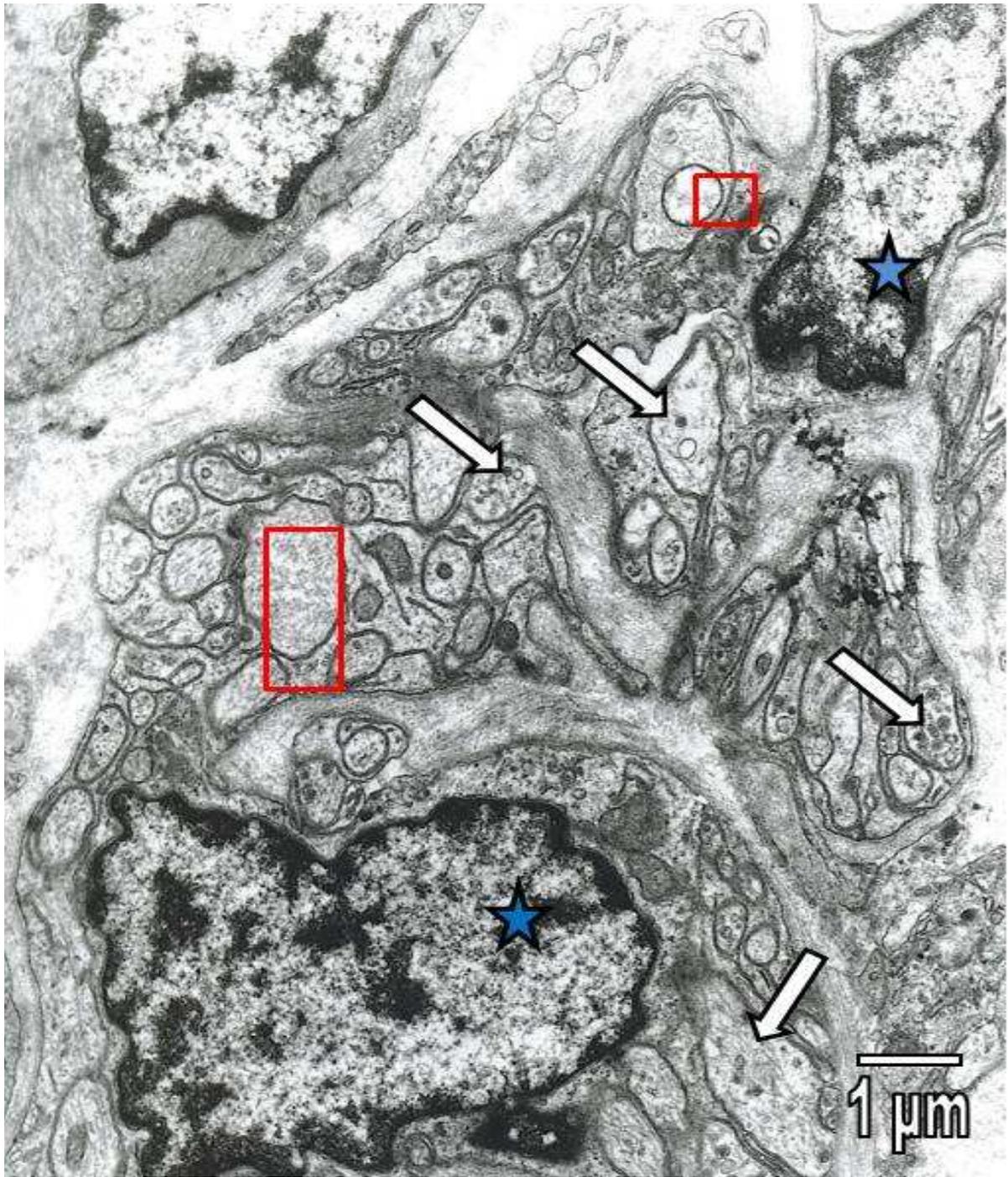
**Figura 20.** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente no tratado con quimio y radioterapia (control negativo) a **2 CM DE LA ZONA PROXIMAL DEL TUMOR**. Nótese la presencia de células musculares lisas con núcleo cortado periféricamente (estrella), mitocondrias degeneradas (triángulos), vacuolas autofágicas (rombo), disminución de placas densas y cuerpos Z (rectángulos) junto con la pérdida de la membrana plasmática de la fibra (círculo).



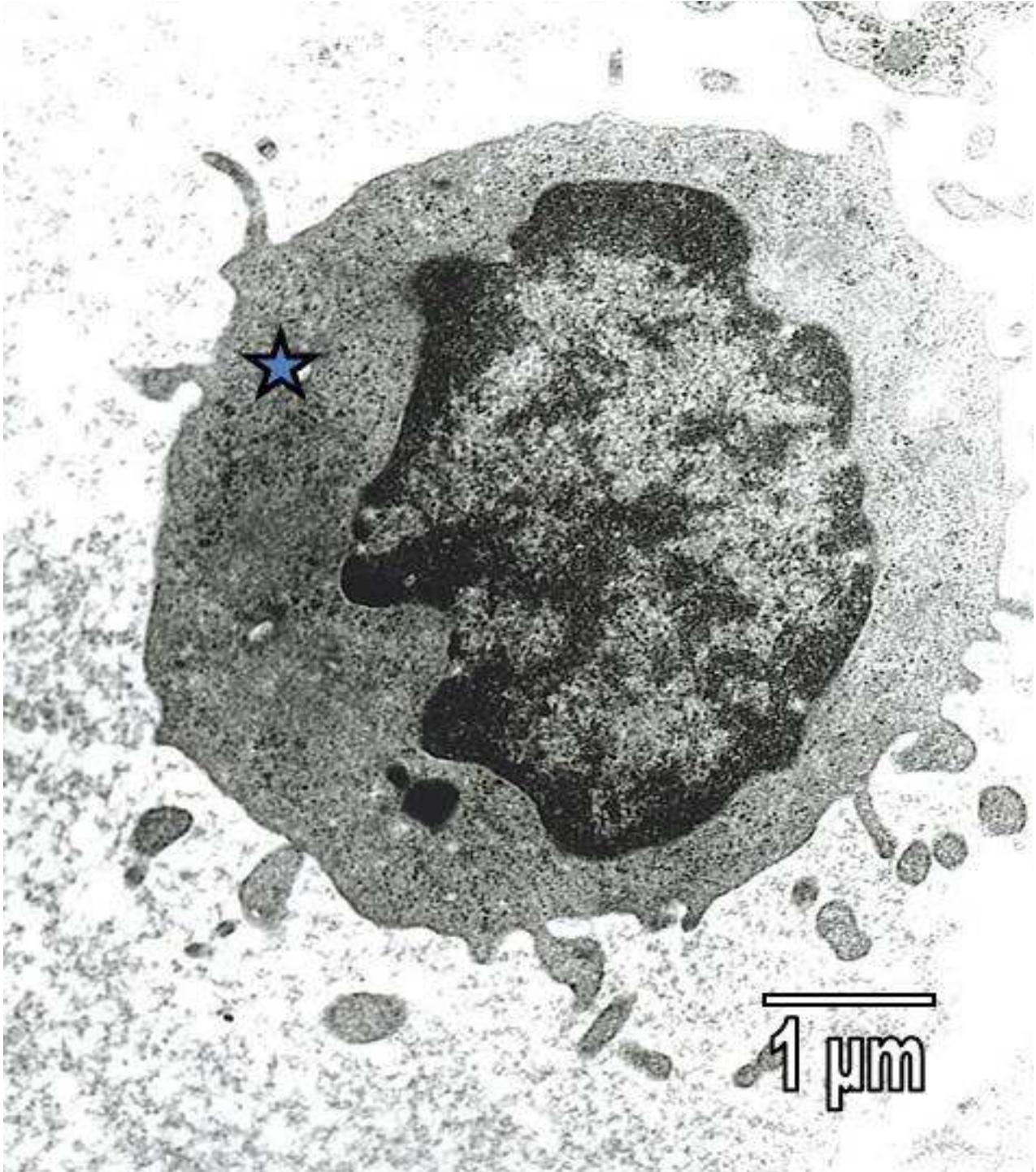
**Figura 21.** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a **2 CM DE LA ZONA PROXIMAL DEL TUMOR**. Se puede observar una célula muscular lisa con núcleo de forma irregular (estrella), mitocondrias edematizadas y electotransparentes (rectángulos), estructuras tubulares (rombos), así como también algunas placas densas (círculos). La presencia de un vaso sanguíneo fue evidente, con endotelio muy engrosado (flechas). Adicionalmente se pudo observar material extracelular necrotizado (triángulo).



**Figura 22.** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a **2 CM DE LA ZONA PROXIMAL DEL TUMOR**. Nótese a nivel de la lámina propia la presencia de células musculares lisas en corte transversal (estrellas) con núcleo central (triángulo) y membrana basal muy engrosada (flechas). Estas células se encuentran formando parte de la cubierta de un vaso de gran calibre, observándose uniones endoteliales (círculo) entre dos células endoteliales engrosadas (rombos). También se puede observar restos celulares y extracelulares (elipse) y abundante colágeno (rectángulos).



**Figura 23.** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a **2 CM DE LA ZONA PROXIMAL DEL TUMOR**. Nótese terminales amielínicos con disminución de vesículas sinápticas (flechas), así como también algunos axones con disposición irregular de neurofilamentos (rectángulo) y con presencia de algunas vacuolas asociadas (cuadrado). También se observan núcleos de las células de Schwann (estrella).



**Figura 24.** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a **2 CM DE LA ZONA PROXIMAL DEL TUMOR**. Nótese la presencia de infiltrado celular conocido comúnmente como “Natural Killer” o célula citotóxica natural (estrella).

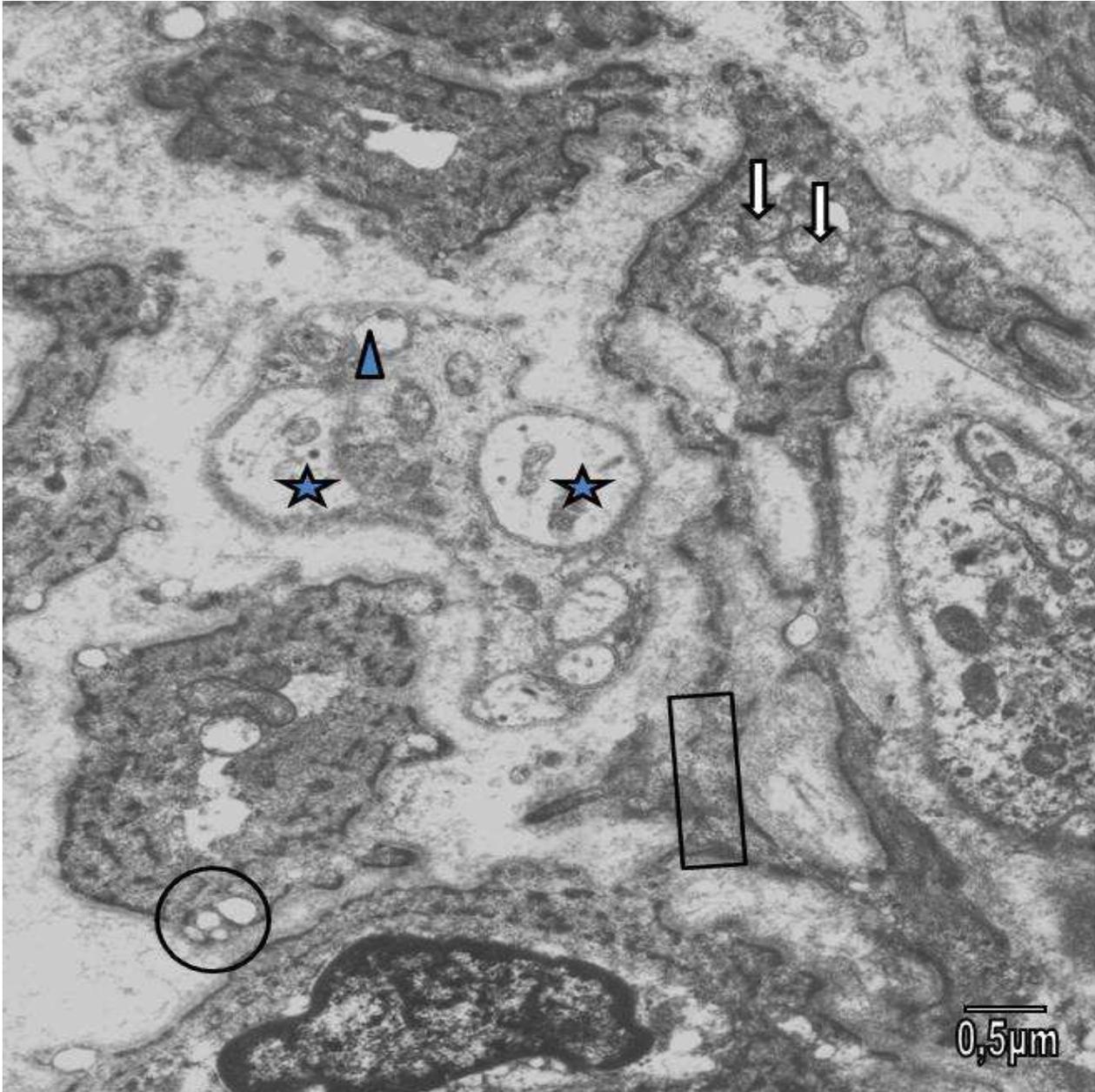


Figura 25. Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente no tratado con quimio y radioterapia (control negativo) a **3 CM DE LA ZONA PROXIMAL DEL TUMOR**. Se observan células musculares lisas atroficas con mitocondrias edematizadas (flechas), vacuolización (círculos), pocas vesículas pinocíticas y caveolas (rectángulo). Igualmente se aprecian terminales nerviosos con disminución de vesículas sinápticas y axones con disposición irregular de los neurofilamentos (estrellas). Las mitocondrias en las células de Schwann se presentan degeneradas (triángulo).

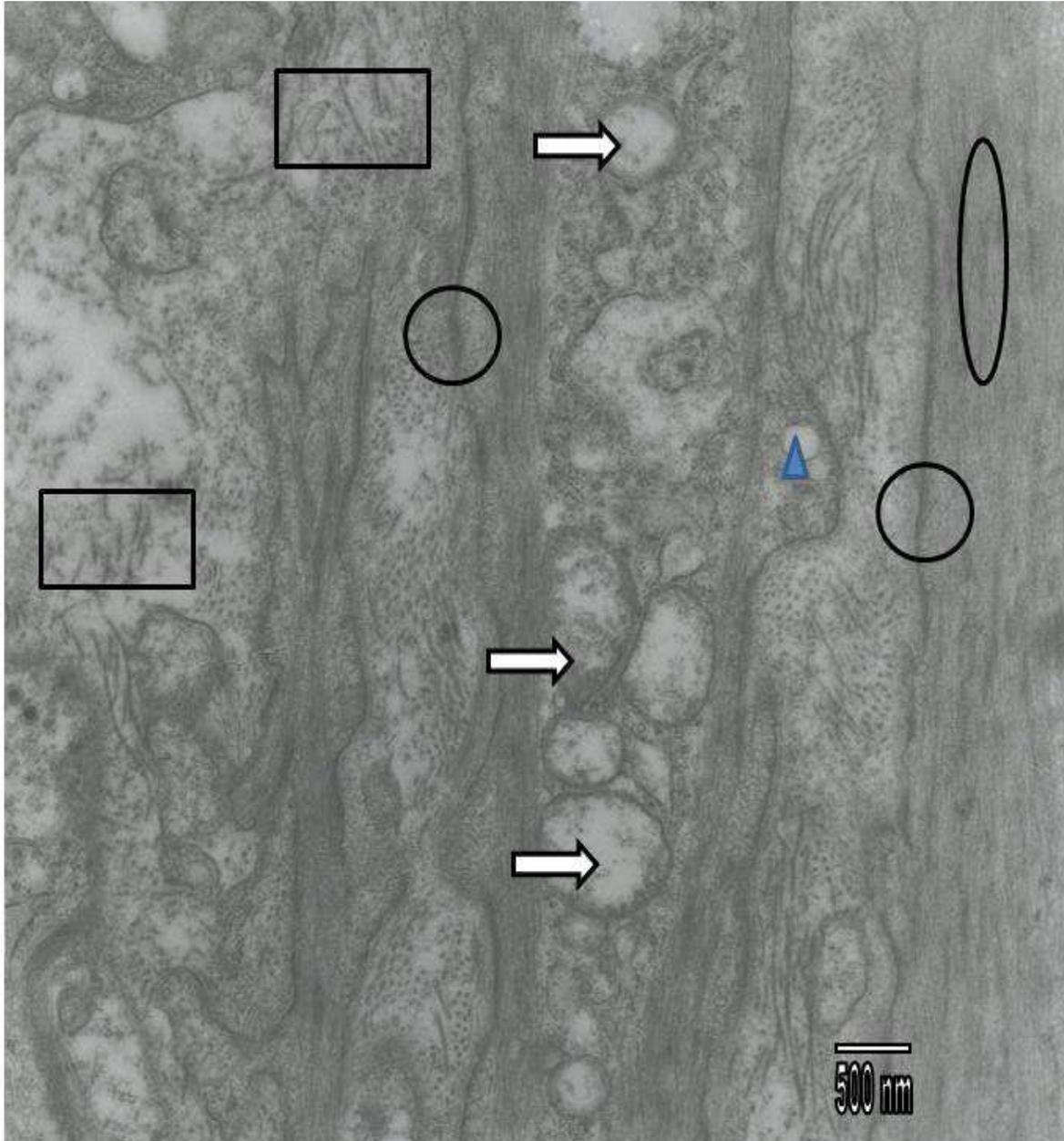
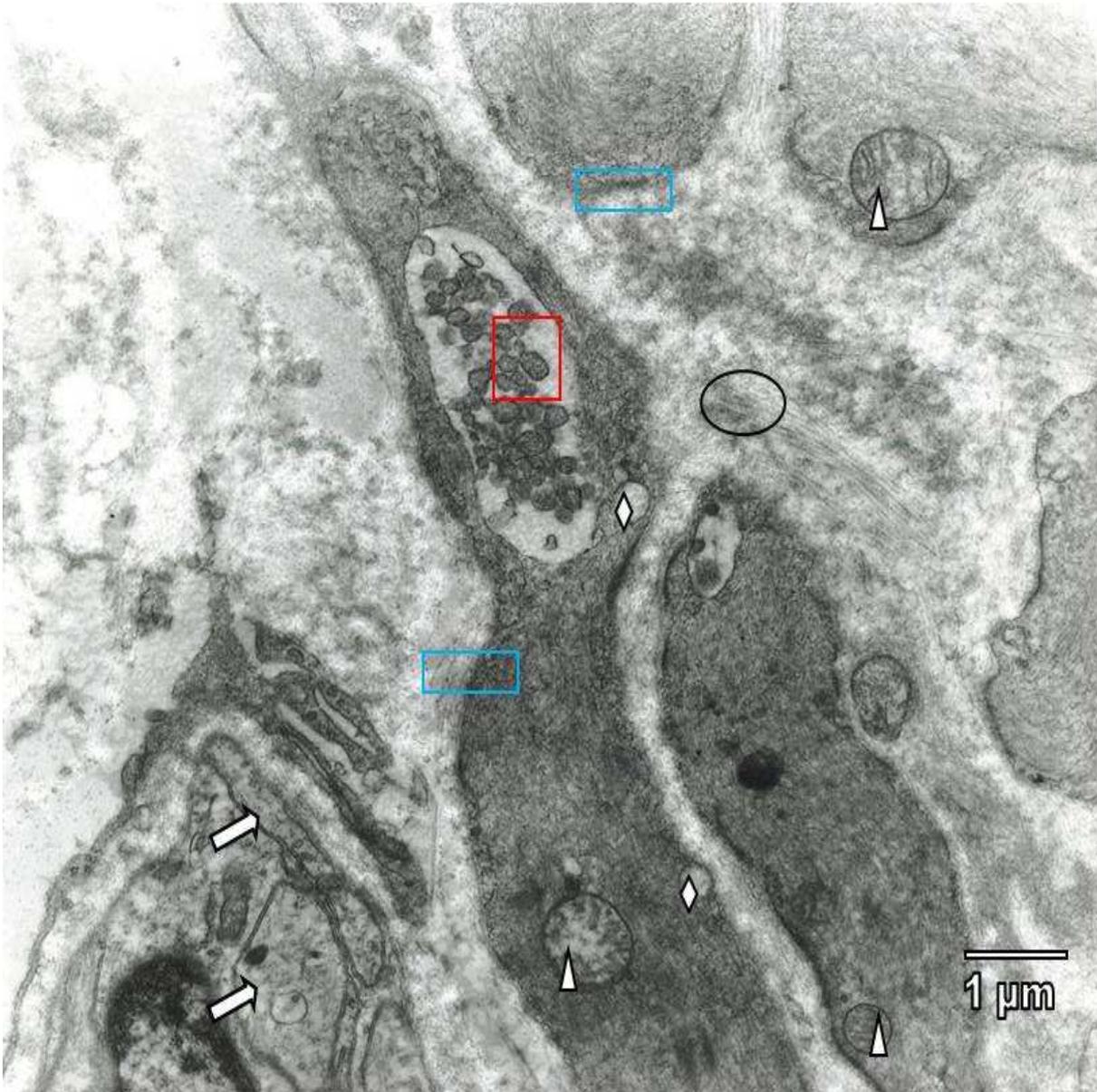
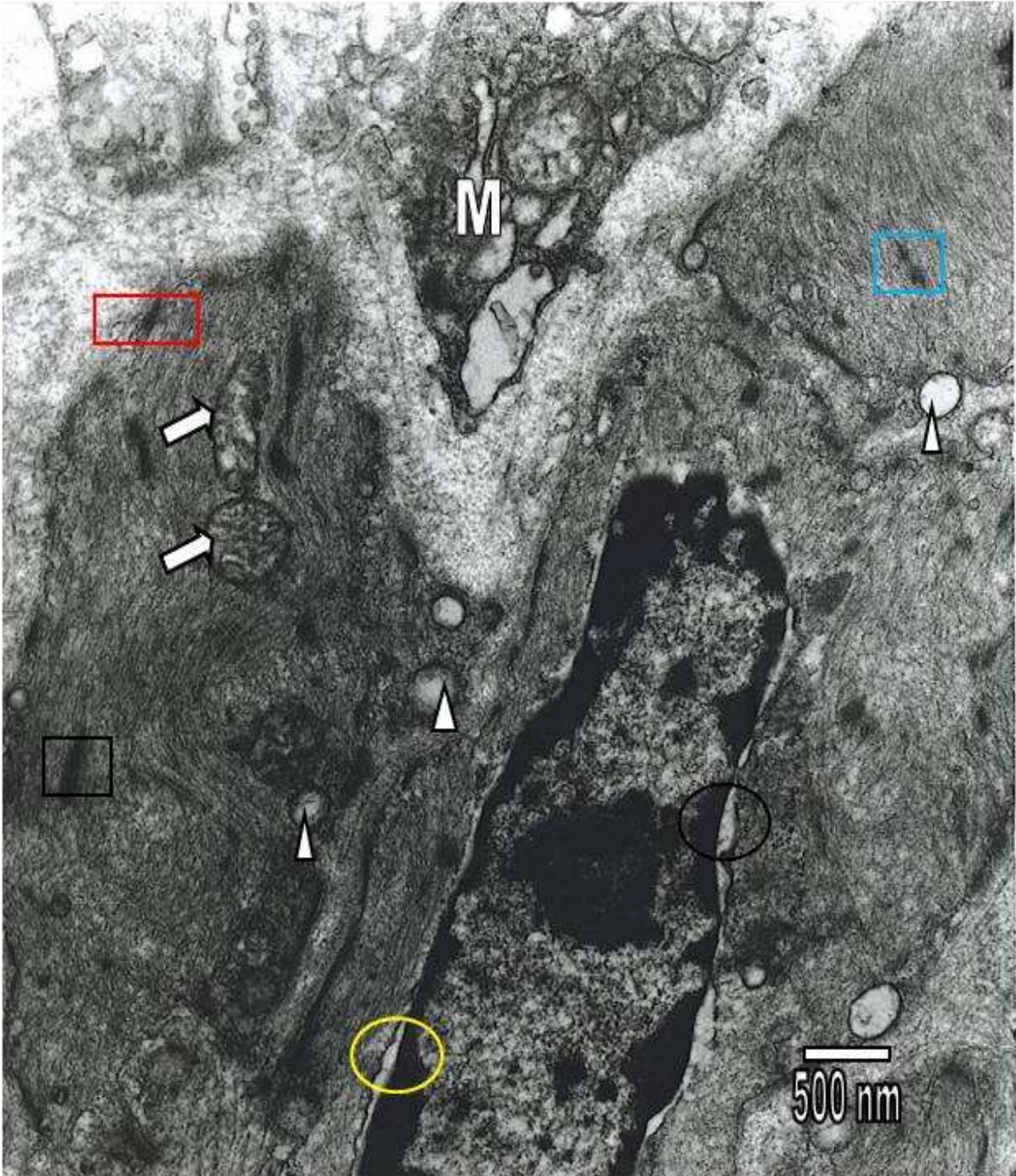


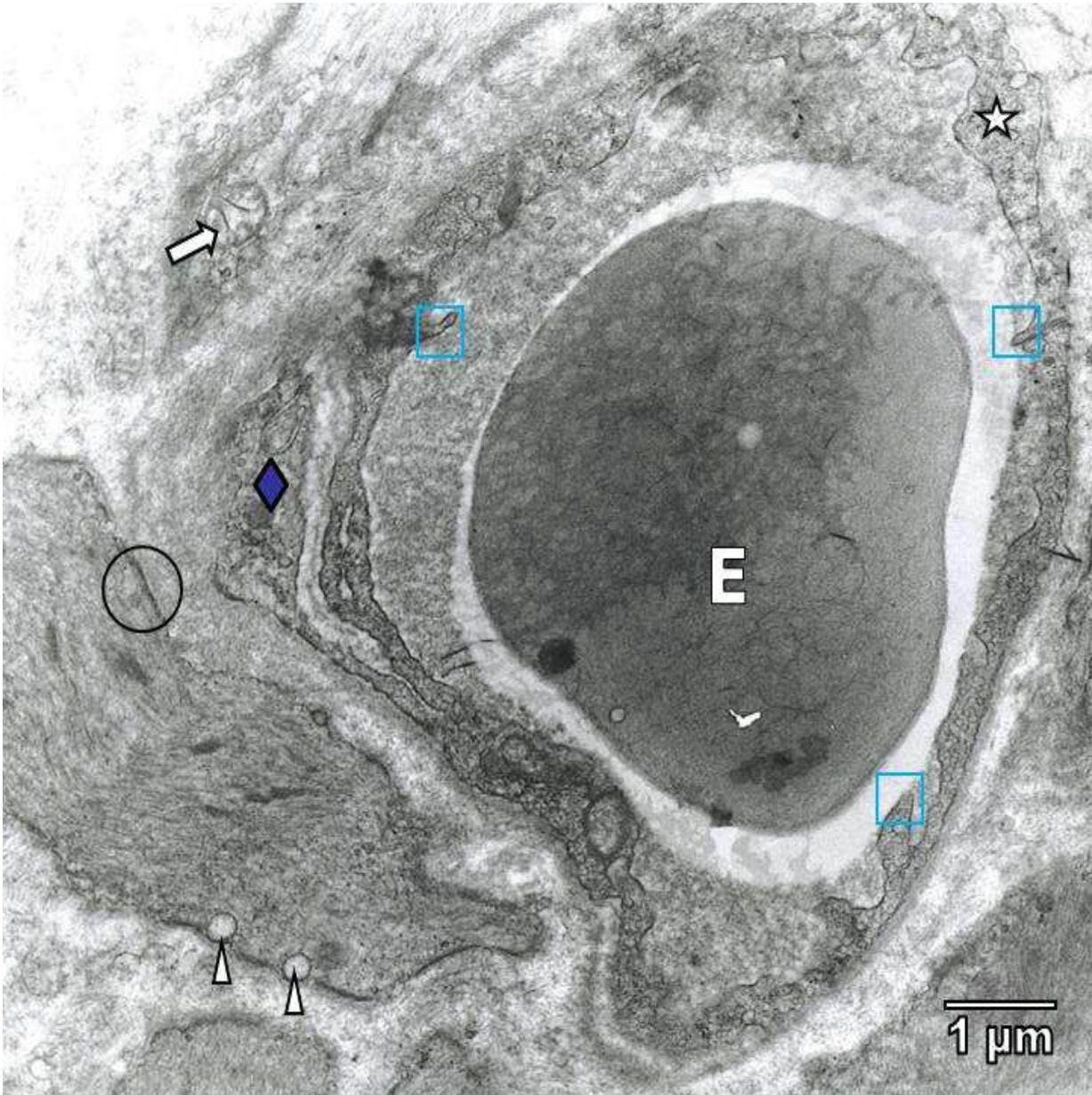
Figura 26. Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente no tratado con quimio y radioterapia (control negativo) a **3 CM DE LA ZONA PROXIMAL DEL TUMOR**. Nótese la presencia de células musculares lisas con abundantes mitocondrias edematizadas y pérdida de espacios intercrestas (flechas), vacuolas (triángulo), disminución aparente de cuerpos Z (elipse), placas densas (círculos), y abundante colágeno en el espacio extracelular (rectángulos).



**Figura 27.** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a **3 CM DE LA ZONA PROXIMAL DEL TUMOR**. Se puede observar a nivel de la *muscularis mucosae* aproximadamente, la presencia de axones amielínicos con disposición irregular de neurotúbulos (flechas). Igualmente se puede observar abundante colágeno (elipse) en el espacio extracelular, fibra muscular alterada con la presencia de cuerpo multivesicular muy grande y vesículas electrondensas (cuadrado), mitocondrias (triángulos) y vesículas pinocíticas (rombos) edematizadas, y pocas placas densas (rectángulos).



**Figura 28.** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a **3 CM DE LA ZONA PROXIMAL DEL TUMOR**. Se observa a nivel de las células musculares lisas mitocondrias (flechas) y vesículas pinocíticas (triángulos) edematizadas, placas densas (rectángulo) y cuerpos Z (cuadrado). Igualmente se aprecia la presencia de un macrófago (M) en el espacio extracelular.



**Figura 29.** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a **3 CM DE LA ZONA PROXIMAL DEL TUMOR**. Nótese a nivel de la *muscularis mucosae* la presencia de un capilar rodeado en algunas zonas por pericito (rombo), endotelio (estrella) se presenta con prolongaciones hacia la luz (cuadrado) en donde se evidencia un eritrocito (E). Las células musculares lisas se presentan alteradas con mitocondrias (flecha) y vesículas pinocíticas (triángulos) edematizadas. También se pueden observar las placas densas (círculo) y cuerpos Z (rectángulo) de la célula muscular.



**Figura 30.** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a **3 CM DE LA ZONA PROXIMAL DEL TUMOR**. Se aprecian dos infiltrados celulares, mastocito (flecha) y macrófago (estrella). Así mismo se observa un corte oblicuo de una célula muscular lisa con aparente vacuolización (triángulo).

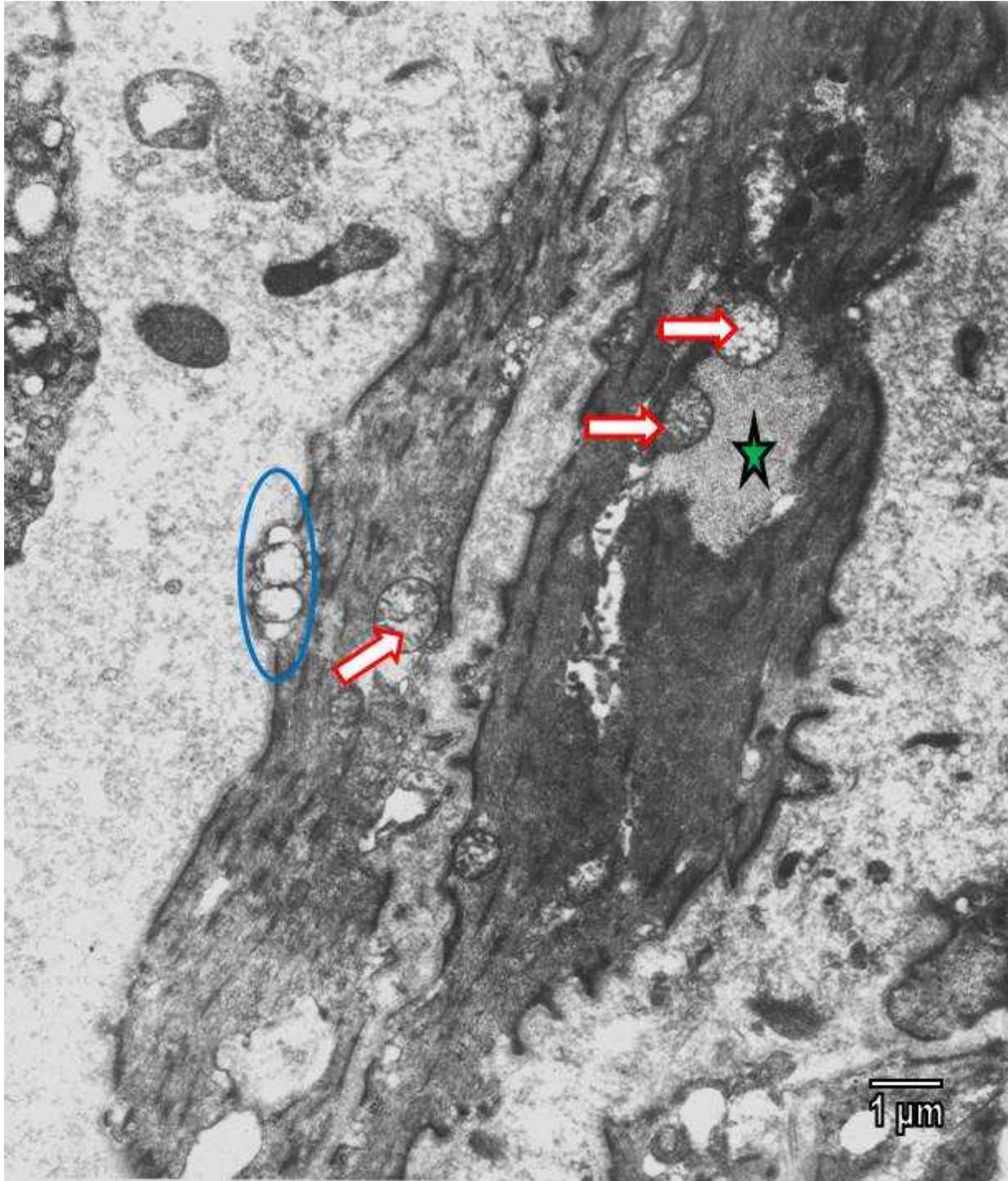


Figura 31. Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente no tratado con quimio y radioterapia (control negativo) a **4 CM DE LA ZONA PROXIMAL DEL TUMOR**. Nótese células musculares lisas atróficas con mitocondrias edematizadas (flechas) y degeneradas (elipse). Igualmente, se pueden observar zonas desprovistas de elementos contráctiles ocupadas por glucógeno(estrella).

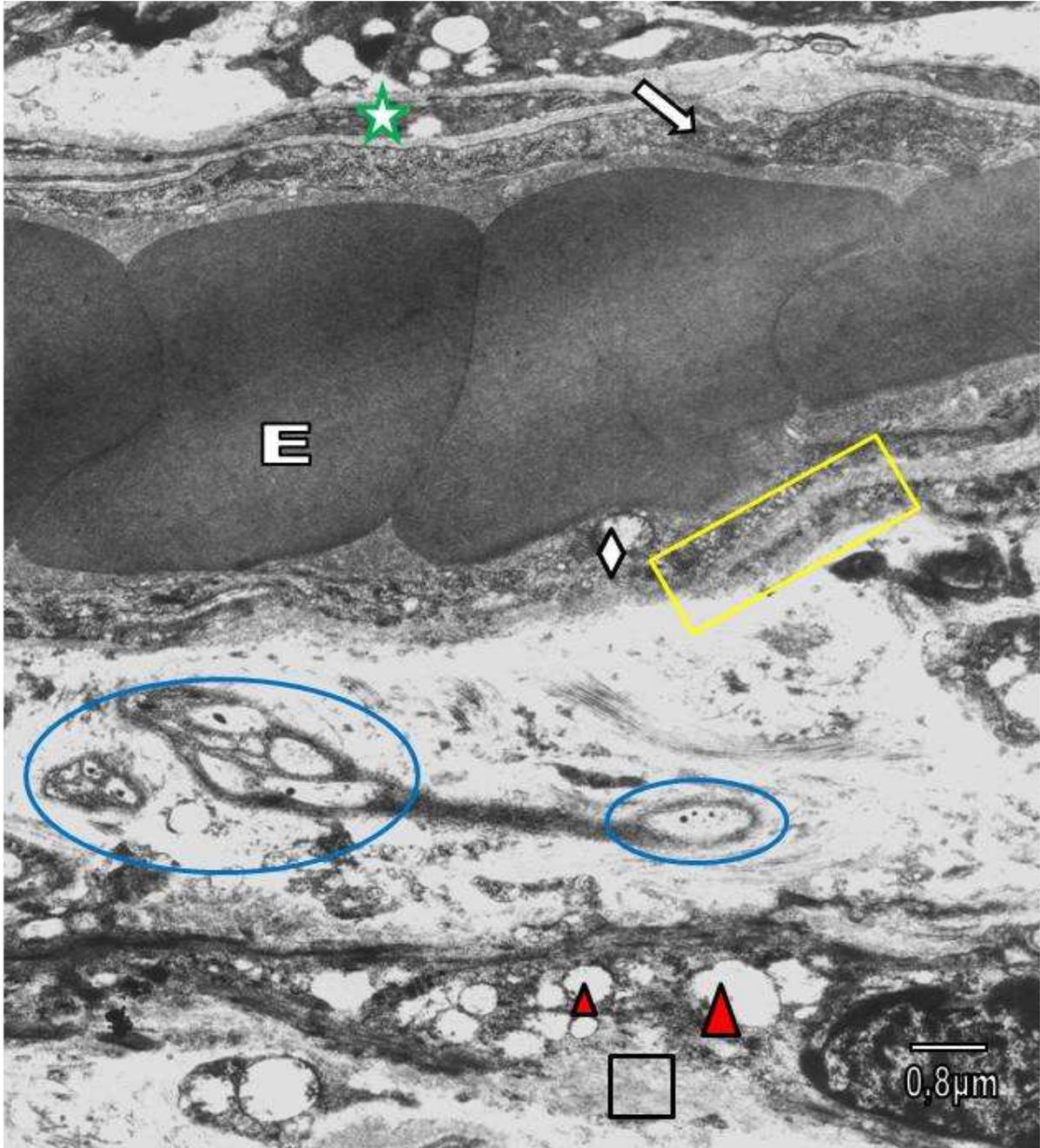
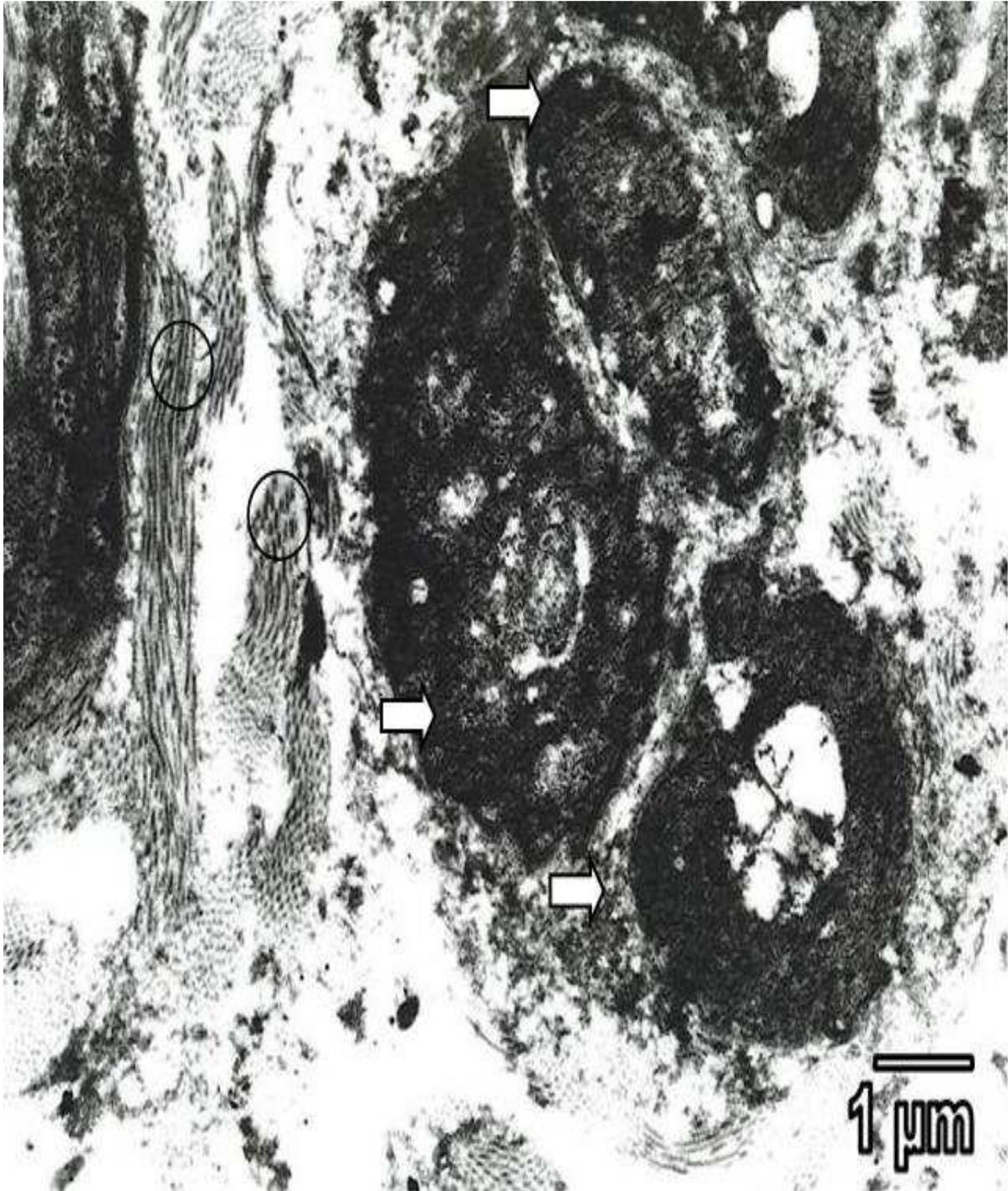


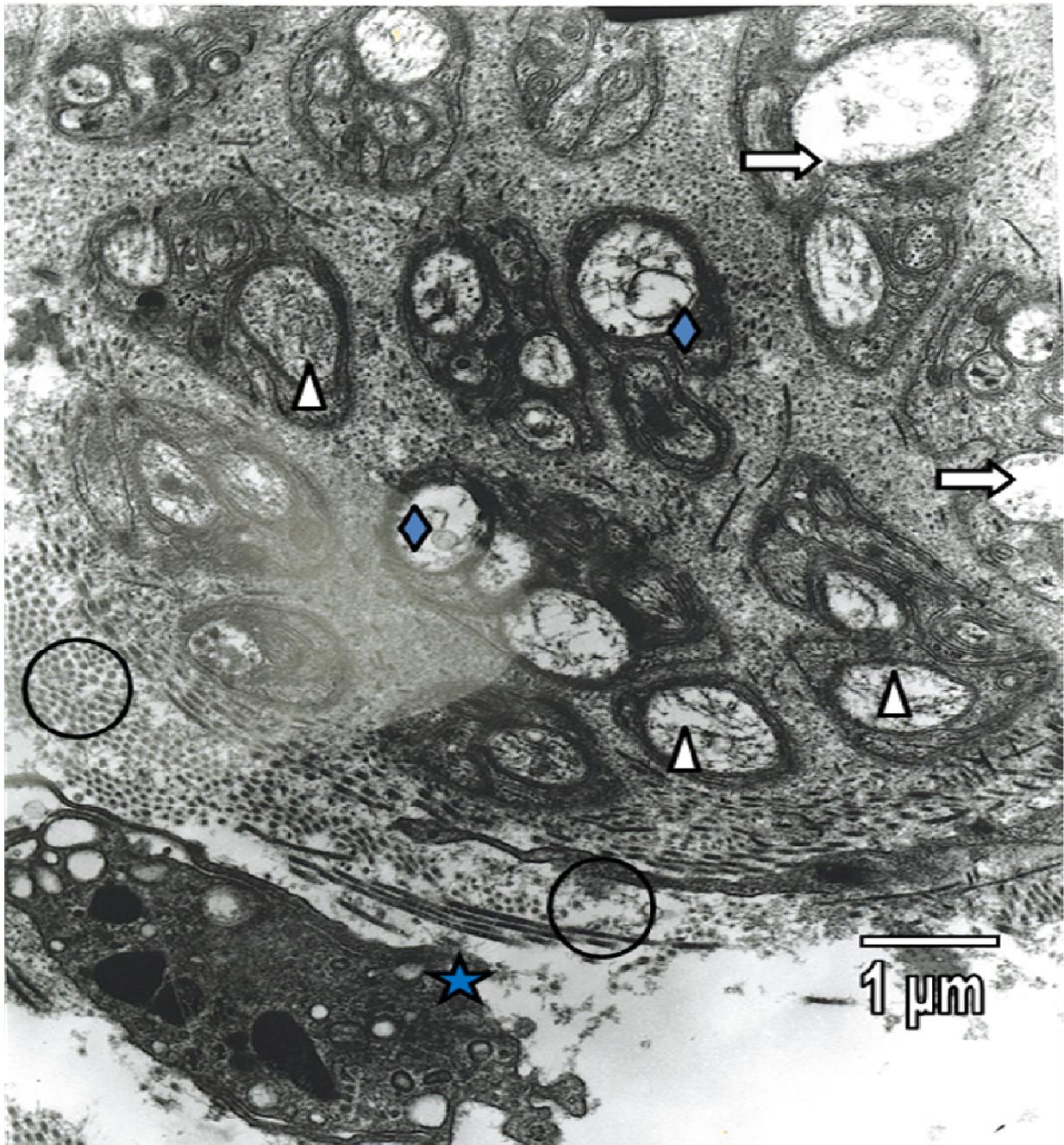
Figura 32. Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente no tratado con quimio y radioterapia (control negativo) a **4 CM DE LA ZONA PROXIMAL DEL TUMOR**. Se aprecia la presencia de un vaso sanguíneo con endotelio (flecha) asociado a pericito (estrella), mitocondria degenerada (rombo), y membrana basal reduplicada (rectángulo). Por su parte, las células musculares lisas presentaron atrofia evidente junto con la pérdida de membranas plasmática y basal (cuadrado), y mitocondrias degeneradas (triángulos). Nótese la presencia de terminales nerviosos alterados con disminución evidente de vesículas sináptica (elipse).



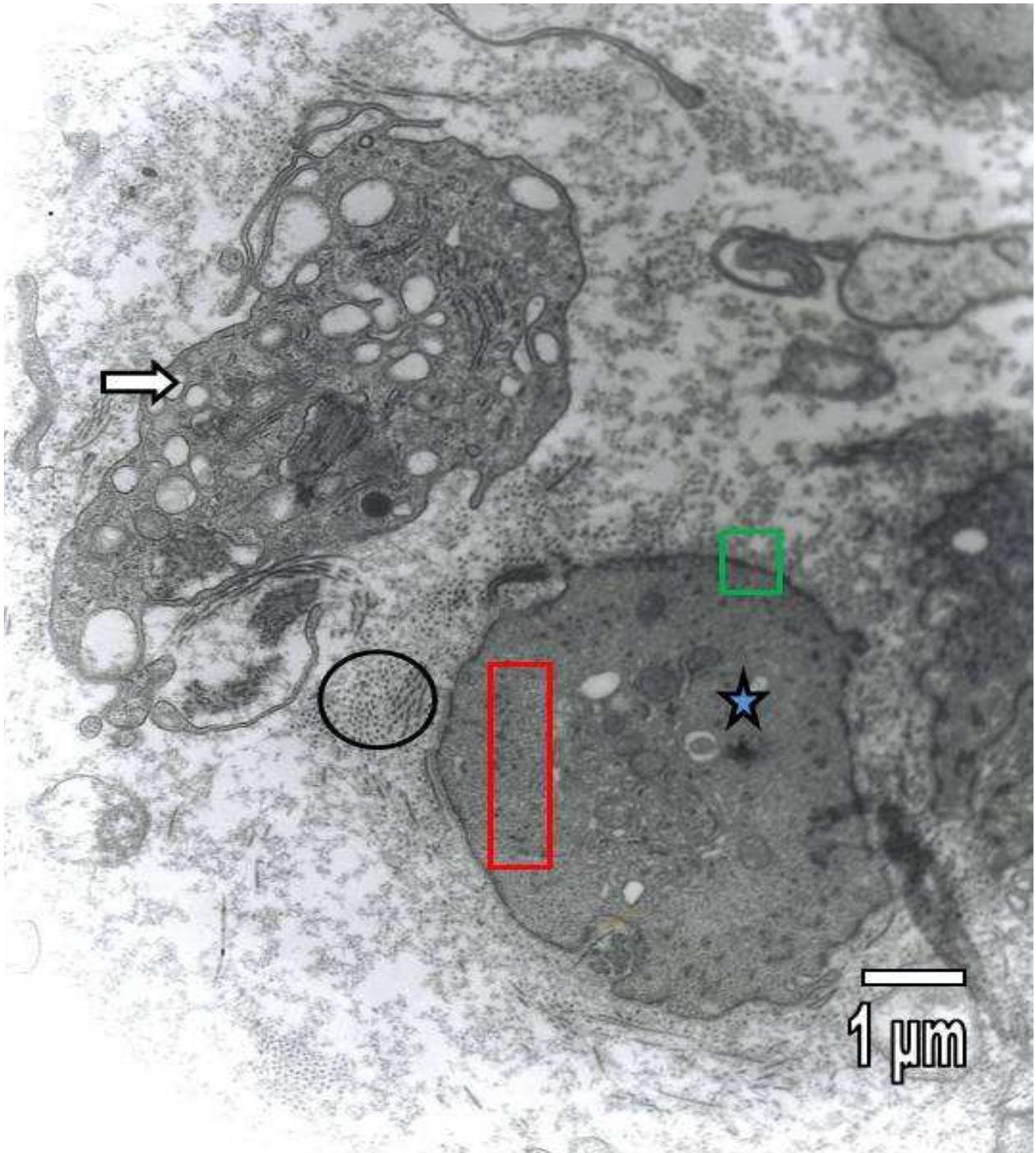
**Figura 33.** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a **4 CM DE LA ZONA PROXIMAL DEL TUMOR**. Nótese la presencia de fibras musculares lisas degeneradas (estrellas), con abundantes placas densas (círculos) y edematización de mitocondrias con pérdida total de sus crestas (flechas).



**Figura 34.** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a **4 CM DE LA ZONA PROXIMAL DEL TUMOR.** Se puede observar un proceso necrótico en la fibra muscular lisa (flechas) así como también abundante colágeno (círculos).



**Figura 35.** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a **4 CM DE LA ZONA PROXIMAL DEL TUMOR.** Nótese terminales amielínicos y axones degenerados con presencia de a vacuolas (rombos). Los terminales nerviosos con disminución de vesículas sinápticas (flechas) y los axones se presentan con disposición irregular de neurofilamentos (triángulos). Así mismo se observa abundante colágeno (círculos) y la presencia de un macrófago en el espacio extracelular (estrella).

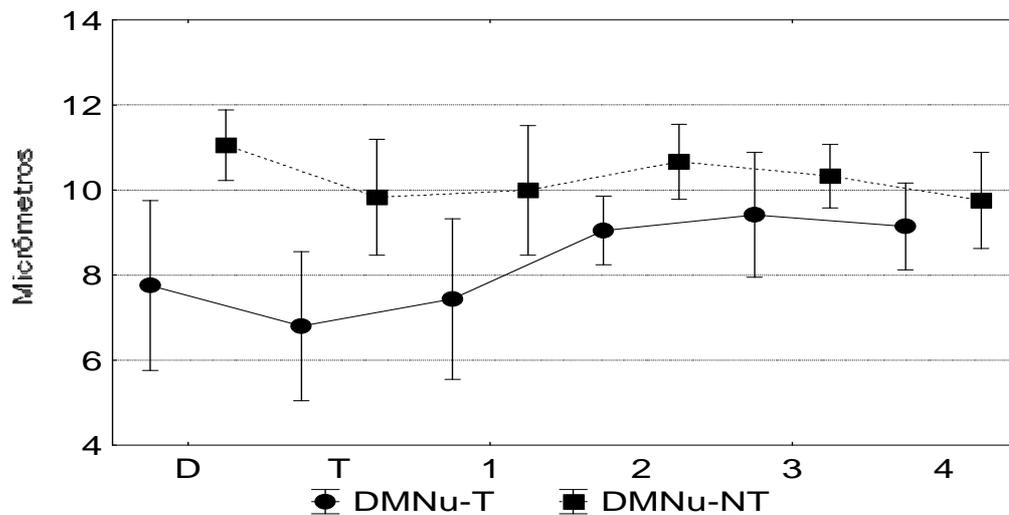


**Figura 36.** Micrografía Electrónica de Transmisión de paciente tratado con quimio y radioterapia a **4 CM DE LA ZONA PROXIMAL DEL TUMOR**. Se aprecia un macrófago (flecha) próximo a una célula muscular lisa que se encuentra en corte transversal (estrella), con placas densas evidentes (cuadrado) y cuerpos Z (rectángulos). Nótese abundante colágeno (círculo).

## CUANTITATIVOS

A continuación se presenta la progresión de los cambios exhibidos por el valor numérico de cada una de las variables estudiadas. Los gráficos representan los errores estándar y la tablas el análisis de ANOVA de las variables correspondientes, las cuales incluyeron diámetro mayor (Gráfica 1; tabla 1) y menor del núcleo de la musculatura lisa (Gráfica 2; tabla 2), diámetro mayor (Gráfica 3; tabla 3) y menor de la mitocondria en musculatura lisa (Gráfica 4; tabla 4), número de placas densas (Gráfica 5; tabla 5), porcentaje de vacuolización (Gráfica 6; tabla 6), diámetro mayor (Gráfica 7; tabla 7) y menor de los terminales nerviosos (Gráfica 8; tabla 8), diámetro mayor (Gráfica 9; tabla 9) y menor de los axones (Gráfica 10; tabla 10), engrosamiento de la membrana basal vascular (Gráfica 11; tabla 11), engrosamiento del endotelio vascular (Gráfica 12; tabla 12), porcentaje de oclusión de la luz del vaso (Gráfica 13; tabla 13), y finalmente, el porcentaje de infiltrados (Gráfica 14; tabla 14) en los pacientes tratados y no tratados.

### Diámetro Mayor Del Núcleo



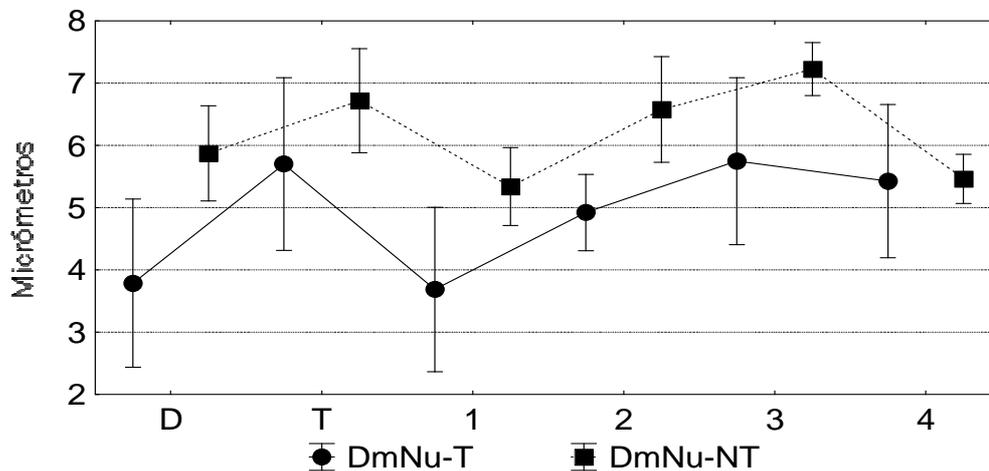
**Gráfica 1.** Errores estándar del diámetro mayor del núcleo. El eje “y” representa las medidas expresadas en micrómetros y el eje “x” las distintas zonas estudiadas en la investigación (T= tumoral, D= 1 cm distal del tumor, y a 1, 2, 3 y 4 cm proximales del tumor). El círculo y la línea continua indican el diámetro mayor del núcleo en células musculares lisas en pacientes tratados (DMNu-T), y el cuadrado y la línea de trazos la de los pacientes no tratados (DMNu-NT). Las barras indican los errores estándar entre los cuales oscila la media.

Este gráfico muestra una tendencia prácticamente constante del diámetro mayor del núcleo de las células musculares lisas en función de las zonas estudiadas (tumorales y peritumorales) de los pacientes que no fueron tratados con algún tratamiento de irradiación o drogas antineoplásicas. Con respecto a los pacientes tratados, se observó una cierta disminución del diámetro mayor del núcleo en la zona tumoral, aumentando esta tendencia a medida que nos alejamos del tumor.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p
Tratamiento	0,80	1	0,80	4,45	<b>0,04</b>
Zona	2,04	5	0,41	2,27	<b>0,05</b>
Tratamiento * Zona	0,44	5	0,09	0,49	0,78
Error	18,73	104	0,18		

**Tabla 1.** Análisis de la varianza del diámetro mayor del núcleo. La tabla indica el resultado del ANOVA de dos factores. Los factores de variación analizados son el efecto del tratamiento (pacientes tratados y no tratados), y el efecto de la zona (tumoral y peritumoral a 1, 2,3 y 4 cm proximal y “D” a 1 cm distal del tumor). La tabla indica que tanto el tratamiento como la zona tienen diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

### Diámetro Menor Del Núcleo



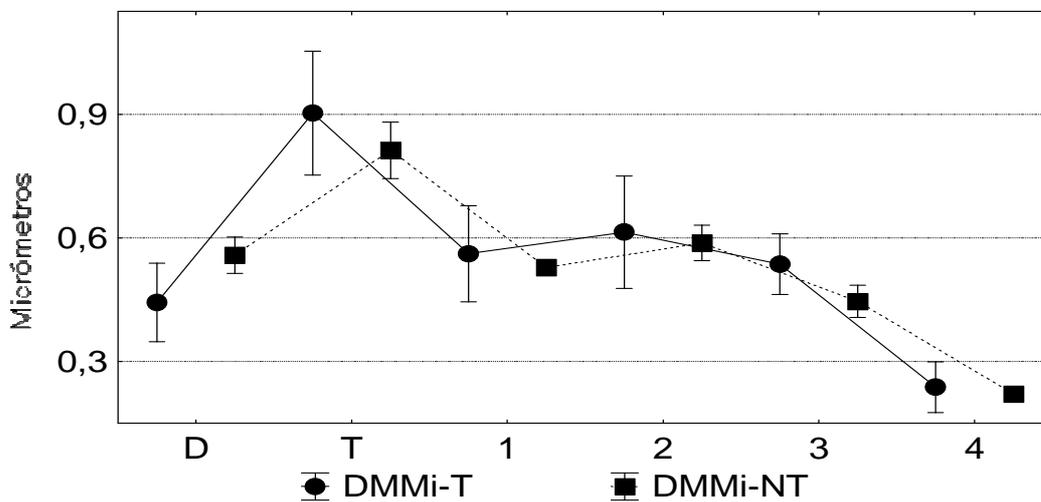
**Gráfica 2.** Errores estándar del diámetro menor del núcleo. El eje “y” representa las medidas expresadas en micrómetros y el eje “x” las distintas zonas estudiadas en la investigación (T= tumoral, D= 1 cm distal del tumor, y a 1, 2, 3 y 4 cm proximales del tumor). El círculo y la línea continua indican el diámetro menor del núcleo en células musculares lisas en pacientes tratados (DmNu-T), y el cuadrado y la línea de trazos la de los pacientes no tratados (DmNu-NT). Las barras indican los errores estándar entre los cuales oscila la media.

Las tendencias observadas con respecto al diámetro menor del núcleo de las células musculares lisas tanto en los pacientes tratados como en los no tratados presentaron prácticamente el mismo patrón a pesar de que en los pacientes no tratados las medidas son mayores. Se observó una disminución en las zonas más alejadas al tumor (1 cm distal y proximal del mismo) y luego aumentando en la distancia, sin embargo, dichos cambios con respecto a las zonas son muy variables.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p
Tratamiento	0,48	1,00	0,48	4,66	<b>0,03</b>
Zona	0,63	5,00	0,13	1,22	0,30
Tratamiento * Zona	0,10	5,00	0,02	0,20	0,96
Error	10,70	104,00	0,10		

**Tabla 2.** Análisis de la varianza del diámetro menor del núcleo. La tabla indica el resultado del ANOVA de dos factores. Los factores de variación analizados son el efecto del tratamiento (pacientes tratados y no tratados), y el efecto de la zona (tumoral y peritumoral a 1, 2,3 y 4 cm proximal y “D” a 1 cm distal del tumor). La tabla indica que el tratamiento tiene diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

### Diámetro Mayor De La Mitocondria



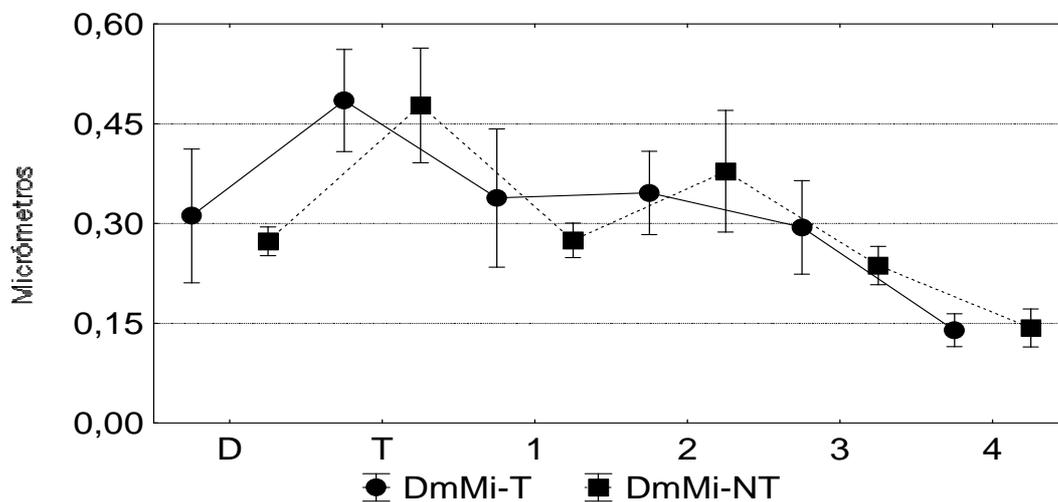
**Gráfica 3.** Errores estándar del diámetro mayor de la mitocondria. El eje “y” representa las medidas expresadas en micrómetros y el eje “x” las distintas zonas estudiadas en la investigación (T= tumoral, D= 1 cm distal del tumor, y a 1, 2, 3 y 4 cm proximales del tumor). El círculo y la línea continua indican el diámetro menor del núcleo en pacientes tratados (DMMi-T), y el cuadrado y la línea de trazos la de los pacientes no tratados (DMMi-NT). Las barras indican los errores estándar entre los cuales oscila la media.

La gráfica anterior (Gráfica 3), muestra que la tendencia de los cambios ocurridos con respecto a el diámetro mayor de las mitocondrias en las células musculares lisas sigue el mismo patrón entre los pacientes que recibieron tratamiento antineoplásico y los que no. No obstante, estos cambios variaron en cuanto a la distancia, observándose un claro aumento del diámetro mayor en la zona tumoral, disminuyendo progresivamente en la distancia.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p
Tratamiento	1,39	1,00	1,39	0,17	0,68
Zona	375,93	5,00	75,19	9,13	<b>0,00</b>
Tratamiento * Zona	11,73	5,00	2,35	0,28	0,92
Error	823,19	100,00	8,23		

**Tabla 3.** Análisis de la varianza del diámetro mayor de la mitocondria. La tabla indica el resultado del ANOVA de dos factores. Los factores de variación analizados son el efecto del tratamiento (pacientes tratados y no tratados), y el efecto de la zona (tumoral y peritumoral a 1, 2,3 y 4 cm proximal y “D” a 1 cm distal del tumor). La tabla indica que la zona tiene diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ )

#### Diámetro Menor De La Mitocondria



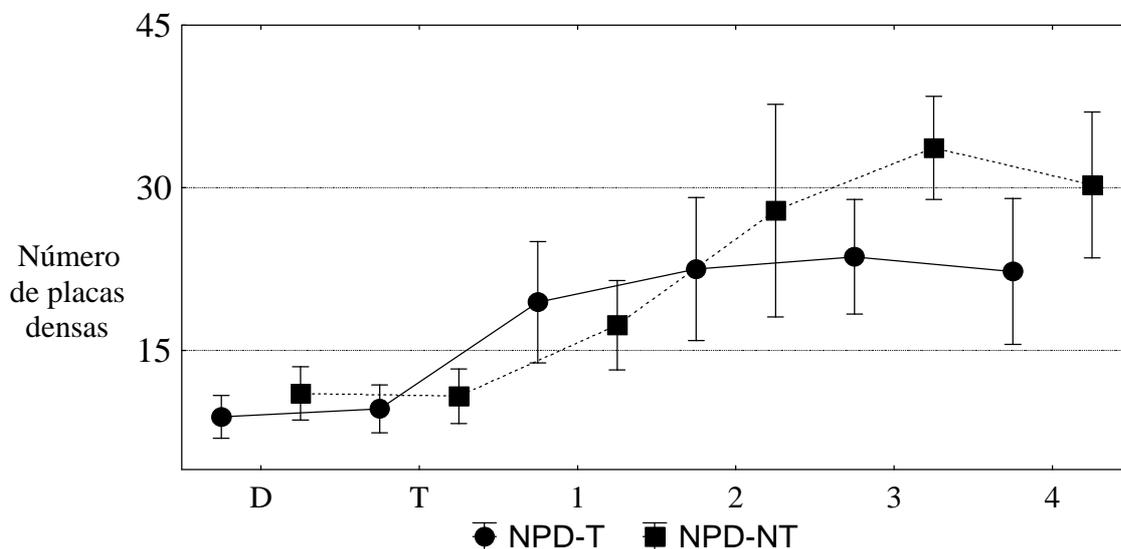
**Gráfica 4.** Errores estándar del diámetro menor de la mitocondria. El eje “y” representa las medidas expresadas en micrómetros y el eje “x” las distintas zonas estudiadas en la investigación (T= tumoral, D= 1 cm distal del tumor, y a 1, 2, 3 y 4 cm proximales del tumor).El círculo y la línea continua indican el diámetro menor del núcleo en pacientes tratados (DmMi-T), y el cuadrado y la línea de trazos la de los pacientes no tratados (DmMi-NT). Las barras indican los errores estándar entre los cuales oscila la media.

Como se puede observar, el diámetro menor de las mitocondrias en las células musculares lisas, al igual que en el caso anterior, presentó tendencias similares en cuanto a los pacientes tratados, no tratados, y las variaciones en la zona tumoral y peritumoral. Este diámetro aumentó en la zona tumoral de ambos pacientes, disminuyendo el mismo a medida que nos alejamos del tumor.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p
Tratamiento	1,12	1,00	1,12	0,21	0,65
Zona	110,07	5,00	22,01	4,14	<b>0,00</b>
Tratamiento * Zona	2,91	5,00	0,58	0,11	0,99
Error	521,69	98,00	5,32		

**Tabla 4.** Análisis de la varianza del diámetro menor de la mitocondria. La tabla indica el resultado del ANOVA de dos factores. Los factores de variación analizados son el efecto del tratamiento (pacientes tratados y no tratados), y el efecto de la zona (tumoral y peritumoral a 1, 2,3 y 4 cm proximal y “D” a 1 cm distal del tumor). La tabla indica que la zona tiene diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

### Número De Placas Densas



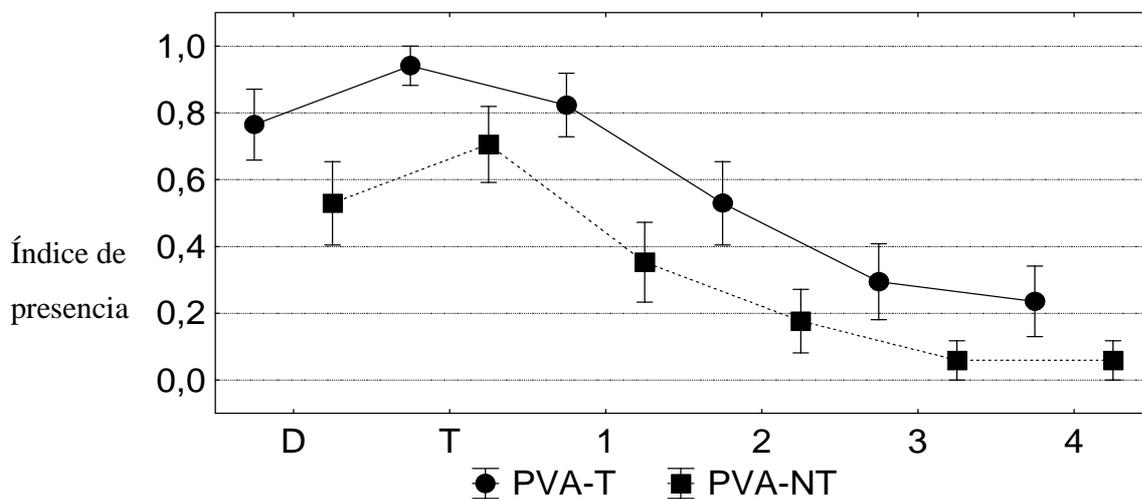
**Gráfica 5.** Errores estándar del número de placas densas. El eje “y” representa el número de placas densas, y el eje “x” las distintas zonas estudiadas en la investigación (T= tumoral, D= 1 cm distal del tumor, y a 1, 2, 3 y 4 cm proximales del tumor). El círculo y la línea continua indican el diámetro menor del núcleo en pacientes tratados (NPD-T), y el cuadrado y la línea de trazos la de los pacientes no tratados (NPD-NT). Las barras indican los errores estándar entre los cuales oscila la media.

Las tendencias observadas entre los pacientes tratados y no tratados se comportaron prácticamente iguales con respecto a las variaciones del número de placas densas, por lo que las diferencias entre ellos no son significativas. Sin embargo, se observan diferencias con respecto a las zonas estudiadas, notándose una clara disminución de estas placas en la zona tumoral, aumentando progresivamente su número a mayor distancia del tumor.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p
Tratamiento	453,12	1,00	453,12	1,42	0,24
Zona	6298,96	5,00	1259,79	3,96	<b>0,00</b>
Tratamiento * Zona	497,55	5,00	99,51	0,31	0,90
Error	32141,38	101,00	318,23		

**Tabla 5.** Análisis de la varianza del número de placas densas. La tabla indica el resultado del ANOVA de dos factores. Los factores de variación analizados son el efecto del tratamiento (pacientes tratados y no tratados), y el efecto de la zona (tumoral y peritumoral a 1,2,3 y 4 cm proximal y “D” a 1 cm distal del tumor). La tabla indica que la zona tiene diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

### Porcentaje De Vacuolas Autofágicas



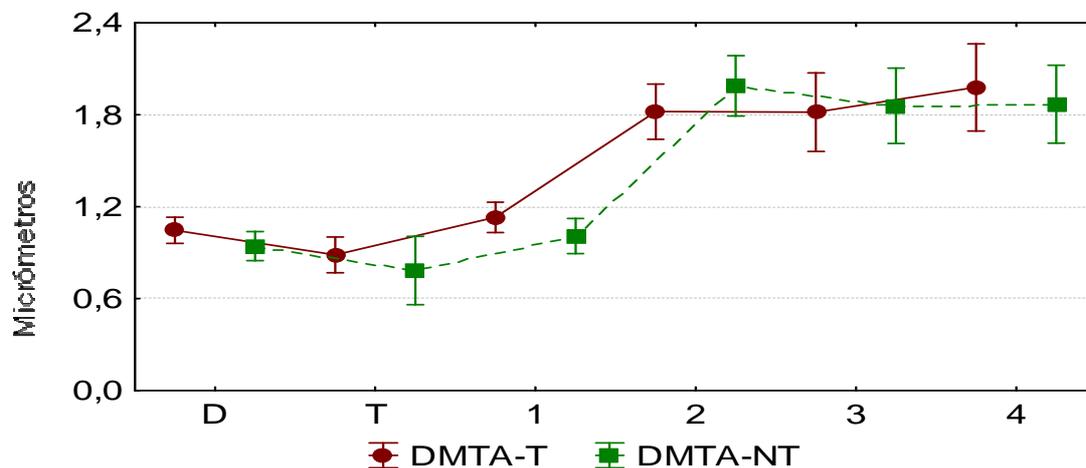
**Gráfica 6.** Errores estándar del porcentaje de vacuolas autofágicas. El eje “y” representa el índice de presencia de vacuolas autofágicas en las células musculares lisas, y el eje “x” las distintas zonas estudiadas en la investigación (T= tumoral, D= 1 cm distal del tumor, y a 1, 2, 3 y 4 cm proximales del tumor). El círculo y la línea continua indican el porcentaje de vacuolas autofágicas en pacientes tratados (PVA-T), y el cuadrado y la línea de trazos la de los pacientes no tratados (PVA -NT). Las barras indican los errores estándar entre los cuales oscila la media.

A pesar de que la tendencia de los pacientes tratados presenta el mismo comportamiento que la tendencia presentada por los pacientes no tratados, los índices son diferentes, observándose variaciones estadísticamente significativas entre ambos pacientes. Igualmente, se puede notar las variaciones que existen entre las zonas de estudio, notándose un claro aumento de estas vacuolas autofágicas a nivel de la zona tumoral, disminuyendo progresivamente en la distancia.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p
Tratamiento	4,12	1,00	4,12	23,77	<b>0,00</b>
Zona	12,69	5,00	2,54	14,64	<b>0,00</b>
Tratamiento * Zona	0,50	5,00	0,10	0,57	0,72
Error	33,29	192,00	0,17		

**Tabla 6.** Análisis de la varianza del porcentaje de vacuolas autofágicas. La tabla indica el resultado del ANOVA de dos factores. Los factores de variación analizados son el efecto del tratamiento (pacientes tratados y no tratados), y el efecto de la zona (tumoral y peritumoral a 1, 2,3 y 4 cm proximal y “D” a 1 cm distal del tumor). La tabla indica que la zona y el tratamiento tienen diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

### Diámetro Mayor De Terminales Nerviosos



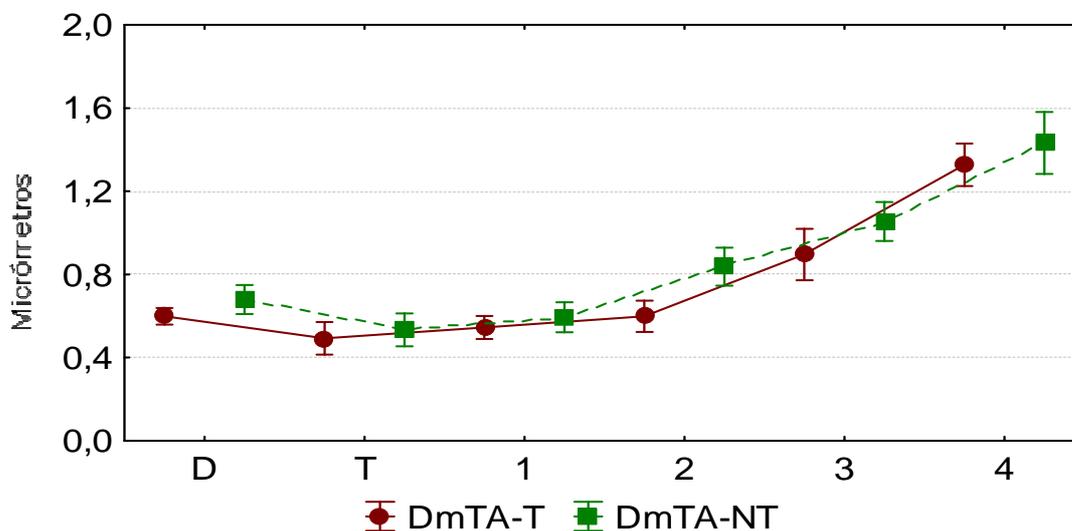
**Gráfica 7.** Errores estándar del diámetro mayor de terminales nerviosos. El eje “y” representa las medidas expresadas en micrómetros y el eje “x” las distintas zonas estudiadas en la investigación (T= tumoral, D= 1 cm distal del tumor, y a 1, 2, 3 y 4 cm proximales del tumor). El círculo y la línea continua indican el diámetro mayor de estos terminales en pacientes tratados (DMTA-T), y el cuadrado y la línea de trazos la de los pacientes no tratados (DMTA -NT). Las barras indican los errores estándar entre los cuales oscila la media.

Esta gráfica muestra una tendencia similar entre los pacientes tratados y los que no, con respecto a los cambios ocurridos en el diámetro mayor de los terminales nerviosos. No obstante, se observan diferencias significativas en cuanto esta variable en las distintas zonas, notándose una disminución del diámetro mayor de estos terminales en la zona tumoral y aumentando a nivel peritumoral.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p
Tratamiento	0,03	1,00	0,03	0,11	0,74
Zona	17,67	5,00	3,53	14,84	<b>0,00</b>
Tratamiento * Zona	0,29	5,00	0,06	0,25	0,94
Error	19,05	80,00	0,24		

**Tabla 7.** Análisis de la varianza del diámetro mayor de terminales nerviosos. La tabla indica el resultado del ANOVA de dos factores. Los factores de variación analizados son el efecto del tratamiento (pacientes tratados y no tratados), y el efecto de la zona (tumoral y peritumoral a 1, 2,3 y 4 cm proximal y “D” a 1 cm distal del tumor). La tabla indica que la zona tiene diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

### Diámetro Menor De Terminales Nerviosos



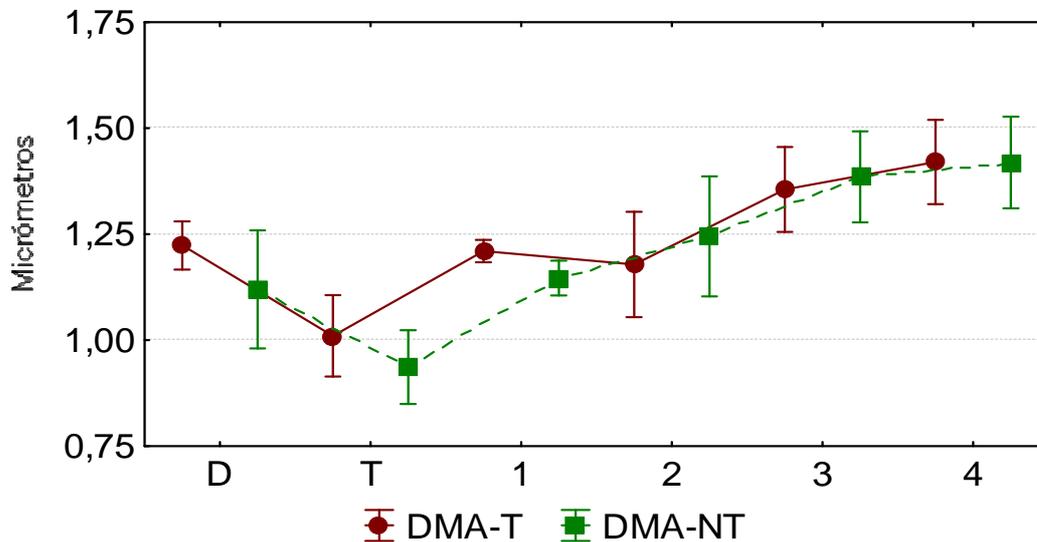
**Gráfica 8.** Errores estándar del diámetro menor de terminales nerviosos. El eje “y” representa las medidas expresadas en micrómetros y el eje “x” las distintas zonas estudiadas en la investigación (T= tumoral, D= 1 cm distal del tumor, y a 1, 2, 3 y 4 cm proximales del tumor). El círculo y la línea continua indican el diámetro mayor de estos terminales en pacientes tratados (DmTA-T), y el cuadrado y la línea de trazos la de los pacientes no tratados (DmTA -NT). Las barras indican los errores estándar entre los cuales oscila la media.

El diámetro menor de estos terminales presentó el mismo comportamiento que en el caso anterior, con el diámetro mayor. Las tendencias entre los pacientes que recibieron tratamiento antineoplásico y los que no, fue prácticamente la misma, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellos. En cuanto a la zona, se observó una disminución del diámetro de estos terminales a nivel del tumor, aumentando a medida que nos alejamos del mismo.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p
Tratamiento	0,54	1,00	0,54	9,12	0,09
Zona	5,76	5,00	1,15	20,15	<b>0,00</b>
Tratamiento * Zona	0,13	5,00	0,03	0,44	0,82
Error	4,86	85,00	0,06		

**Tabla 8.** Análisis de la varianza del diámetro menor de terminales nerviosos. La tabla indica el resultado del ANOVA de dos factores. Los factores de variación analizados son el efecto del tratamiento (pacientes tratados y no tratados), y el efecto de la zona (tumoral y peritumoral a 1, 2,3 y 4 cm proximal y “D” a 1 cm distal del tumor). La tabla indica que la zona tiene diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

## Diámetro Mayor De Axones



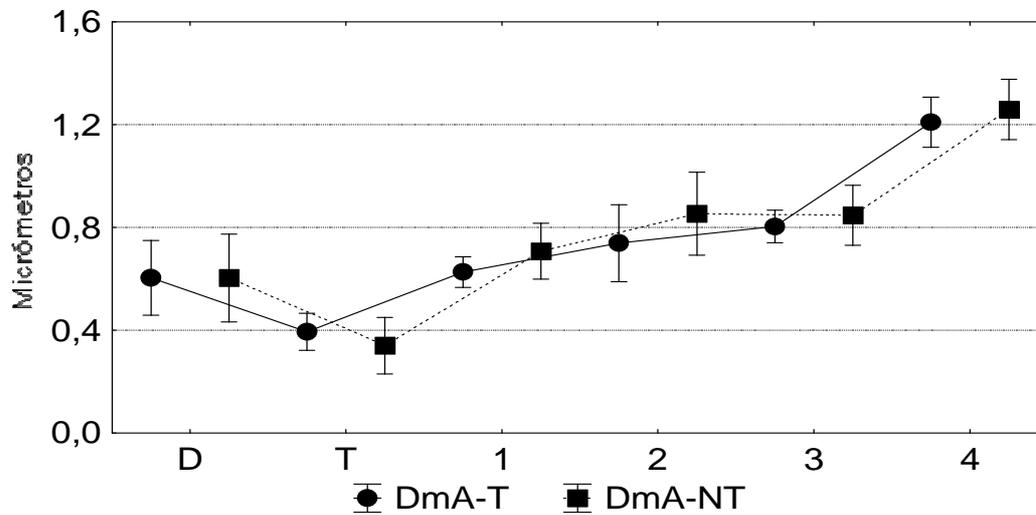
**Gráfica 9.** Errores estándar del diámetro mayor de axones. El eje “y” representa las medidas expresadas en micrómetros y el eje “x” las distintas zonas estudiadas en la investigación (T= tumoral, D= 1 cm distal del tumor, y a 1, 2, 3 y 4 cm proximales del tumor). El círculo y la línea continua indican el diámetro mayor de estos terminales en pacientes tratados (DMA-T), y el cuadrado y la línea de trazos la de los pacientes no tratados (DMA -NT). Las barras indican los errores estándar entre los cuales oscila la media.

Las tendencias observadas presentan un comportamiento similar tanto en pacientes tratados como no tratados; sin embargo, se observaron diferencias significativas en cuanto a la variable de estudio y la zona estudiada, notándose una disminución del diámetro de estos axones en la zona tumoral, aumentando progresivamente a medida que nos alejamos de la zona tumoral.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p
Tratamiento	0,01	1,00	0,01	0,09	0,76
Zona	2,40	5,00	0,48	4,08	<b>0,00</b>
Tratamiento * Zona	0,06	5,00	0,01	0,11	0,99
Error	10,33	88,00	0,12		

**Tabla 9.** Análisis de la varianza del diámetro mayor de axones. La tabla indica el resultado del ANOVA de dos factores. Los factores de variación analizados son el efecto del tratamiento (pacientes tratados y no tratados), y el efecto de la zona (tumoral y peritumoral a 1, 2,3 y 4 cm proximal y “D” a 1 cm distal del tumor). La tabla indica que la zona tiene diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

## Diámetro Menor De Axones



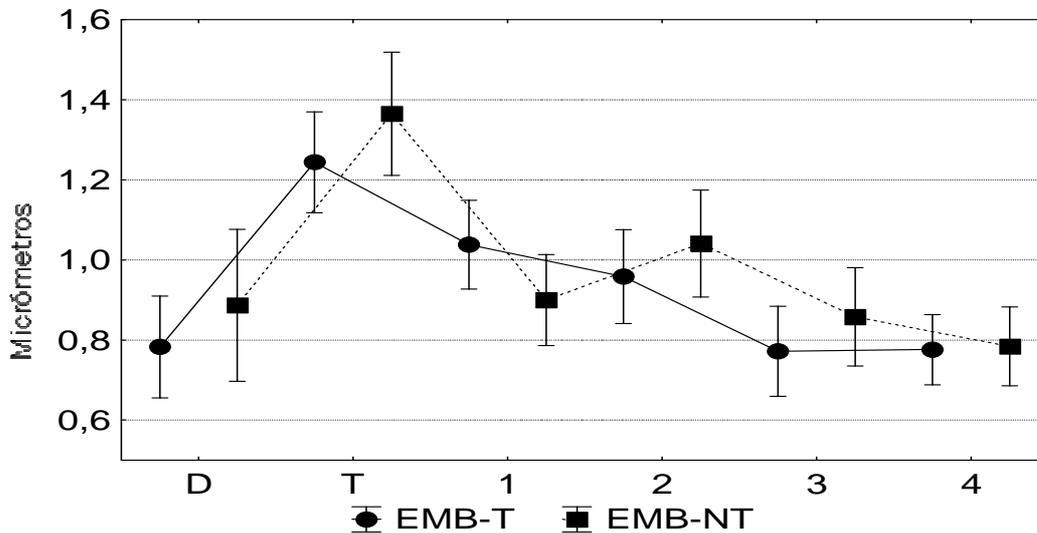
**Gráfica 10.** Errores estándar del diámetro menor de axones. El eje “y” representa las medidas expresadas en micrómetros y el eje “x” las distintas zonas estudiadas en la investigación (T= tumoral, D= 1 cm distal del tumor, y a 1, 2, 3 y 4 cm proximales del tumor). El círculo y la línea continua indican el diámetro mayor de estos terminales en pacientes tratados (DmA-T), y el cuadrado y la línea de trazos la de los pacientes no tratados (DmA -NT). Las barras indican los errores estándar entre los cuales oscila la media.

La gráfica muestra que tanto la tendencia de los pacientes tratados como la de los no tratados, presentan prácticamente el mismo comportamiento que para el caso del diámetro mayor de los axones, observándose una disminución del diámetro de estos axones en la zona tumoral.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p
Tratamiento	0,02	1,00	0,02	0,23	0,63
Zona	5,11	5,00	1,02	10,21	<b>0,00</b>
Tratamiento * Zona	0,04	5,00	0,01	0,07	1,00
Error	6,60	66,00	0,10		

**Tabla 10.** Análisis de la varianza del diámetro mayor de axones. La tabla indica el resultado del ANOVA de dos factores. Los factores de variación analizados son el efecto del tratamiento (pacientes tratados y no tratados), y el efecto de la zona (tumoral y peritumoral a 1, 2,3 y 4 cm proximal y “D” a 1 cm distal del tumor). La tabla indica que la zona tiene diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

## Engrosamiento De La Membrana Basal Del Vaso



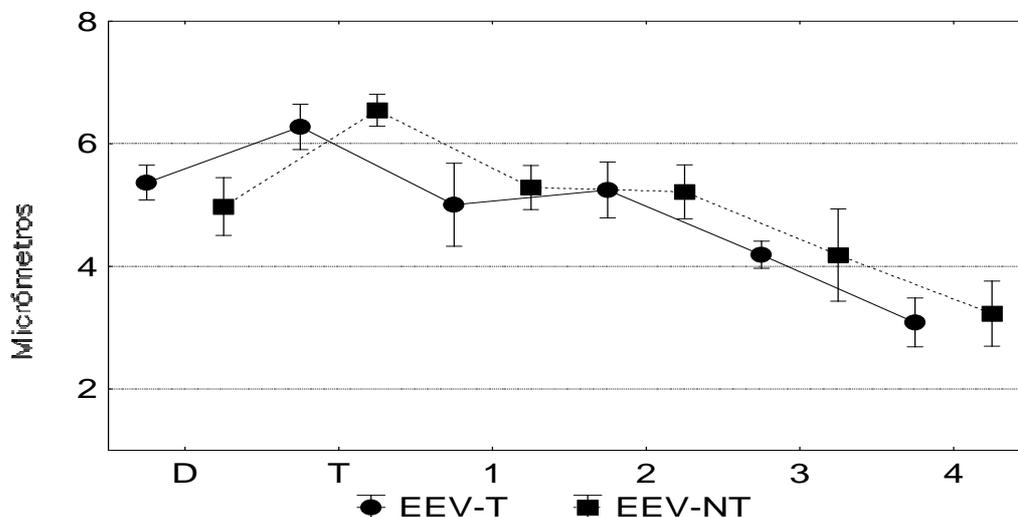
**Gráfica 11.** Errores estándar del engrosamiento de la membrana basal del vaso. El eje “y” representa las medidas expresadas en micrómetros y el eje “x” las distintas zonas estudiadas en la investigación (T= tumoral, D= 1 cm distal del tumor, y a 1, 2, 3 y 4 cm proximales del tumor). El círculo y la línea continua indican el diámetro mayor de estos terminales en pacientes tratados (EMB-T), y el cuadrado y la línea de trazos la de los pacientes no tratados (EMB -NT). Las barras indican los errores estándar entre los cuales oscila la media.

Como se puede observar en la gráfica, la tendencia de los cambios ocasionados en cuanto al engrosamiento de la membrana basal de los vasos sanguíneos tanto en los pacientes tratados como en los que no recibieron ningún tipo de tratamiento, presentaron comportamientos similares, con un mayor aumento en la zona tumoral, disminuyendo progresivamente en la distancia.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p
Tratamiento	0,06	1,00	0,06	0,98	0,33
Zona	0,70	5,00	0,14	2,19	<b>0,05</b>
Tratamiento * Zona	0,03	5,00	0,01	0,09	0,99
Error	2,68	42,00	0,06		

**Tabla 11.** Análisis de la varianza del engrosamiento de la membrana basal del vaso. La tabla indica el resultado del ANOVA de dos factores. Los factores de variación analizados son el efecto del tratamiento (pacientes tratados y no tratados), y el efecto de la zona (tumoral y peritumoral a 1, 2,3 y 4 cm proximal y “D” a 1 cm distal del tumor). La tabla indica la zona diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

## Engrosamiento Del Endotelio



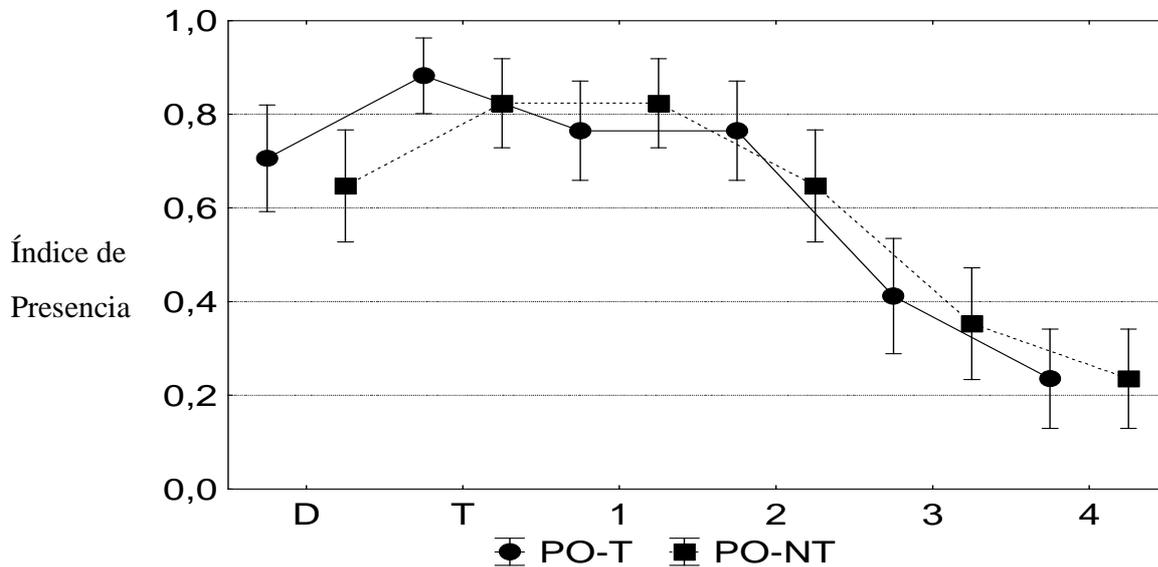
**Gráfica 12.** Errores estándar del engrosamiento del endotelio. El eje “y” representa las medidas expresadas en micrómetros y el eje “x” las distintas zonas estudiadas en la investigación (T= tumoral, D= 1 cm distal del tumor, y a 1, 2, 3 y 4 cm proximales del tumor). El círculo y la línea continua indican el diámetro mayor de estos terminales en pacientes tratados (EEV-T), y el cuadrado y la línea de trazos la de los pacientes no tratados (EEV -NT). Las barras indican los errores estándar entre los cuales oscila la media.

Al igual que en el caso anterior, no se observan diferencias significativas entre los pacientes tratados y los no tratados, sin embargo, entre las zonas se aprecian diferencias con respecto a la variable estudiada. El mayor engrosamiento se observó en la zona tumoral, en ambos tipos de pacientes, disminuyendo así a medida que nos alejamos del tumor.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p
<b>Tratamiento</b>	0,00	1,00	0,00	0,00	0,98
<b>Zona</b>	43,34	5,00	8,67	7,01	<b>0,00</b>
<b>Tratamiento * Zona</b>	1,34	5,00	0,27	0,22	0,95
<b>Error</b>	46,96	38,00	1,24		

**Tabla 12.** Análisis de la varianza del engrosamiento endotelio. La tabla indica el resultado del ANOVA de dos factores. Los factores de variación analizados son el efecto del tratamiento (pacientes tratados y no tratados), y el efecto de la zona (tumoral y peritumoral a 1, 2,3 y 4 cm proximal y “D” a 1 cm distal del tumor). La tabla indica que la zona tiene diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

### Porcentaje De Oclusión De La Luz Del Vaso



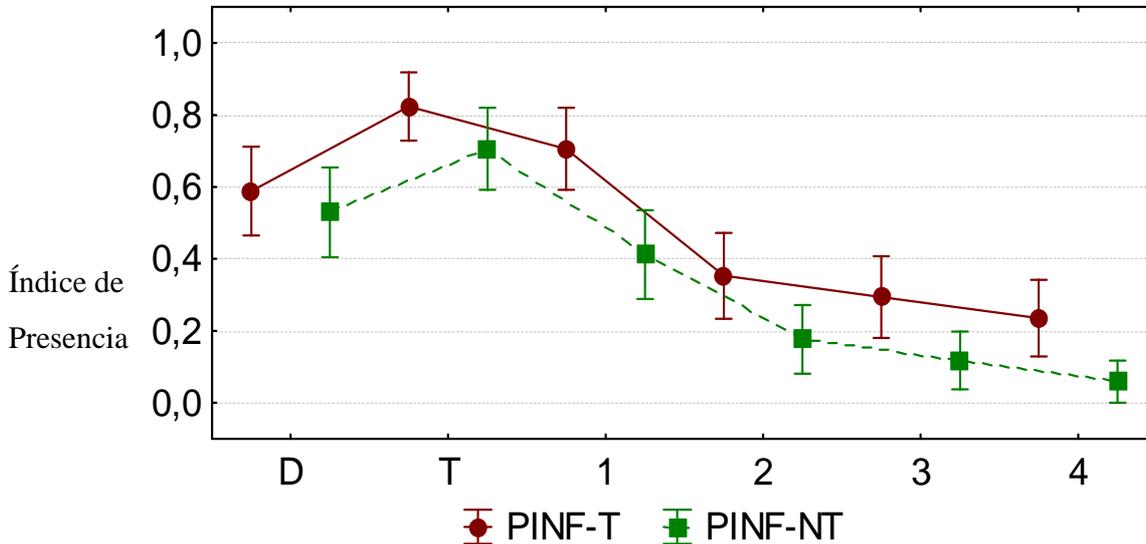
**Gráfica 13.** Errores estándar del porcentaje de oclusión de la luz del vaso. El eje “y” representa el índice de presencia de vasos ocluidos, y el eje “x” las distintas zonas estudiadas en la investigación (T= tumoral, D= 1 cm distal del tumor, y a 1, 2, 3 y 4 cm proximales del tumor). El círculo y la línea continua indican el porcentaje de oclusión de la luz del vaso en pacientes tratados (PO-T), y el cuadrado y la línea de trazos la de los pacientes no tratados (PO-NT). Las barras indican los errores estándar entre los cuales oscila la media.

El porcentaje de oclusión de los vasos tanto en los pacientes tratados como en los no tratados presentó una tendencia similar en ambos casos, observándose solo una diferencia clara con respecto a la oclusión sólo entre las zonas de estudio. El mayor porcentaje se apreció a nivel del tumor, disminuyendo éste en las zonas más próximas al tumor y progresivamente en las distancias presentadas.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p
Tratamiento	19,56	1,00	19,56	92,26	0,89
Zona	7,93	5,00	1,59	7,48	<b>0,00</b>
Tratamiento * Zona	0,55	5,00	0,11	0,52	0,76
Error	40,71	192,00	0,21		

**Tabla 13.** Análisis de la varianza del porcentaje de oclusión de la luz del vaso. La tabla indica el resultado del ANOVA de dos factores. Los factores de variación analizados son el efecto del tratamiento (pacientes tratados y no tratados), y el efecto de la zona (tumoral y peritumoral a 1, 2,3 y 4 cm proximal y “D” a 1 cm distal del tumor). La tabla indica que la zona tienen diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

## Porcentaje De Infiltrados



**Gráfica 14.** Errores estándar del porcentaje de infiltrados. El eje “y” representa el índice de presencia de infiltrados celulares, y el eje “x” las distintas zonas estudiadas en la investigación (T= tumoral, D= 1 cm distal del tumor, y a 1, 2, 3 y 4 cm proximales del tumor). El círculo y la línea continua indican el porcentaje de infiltrados en pacientes tratados (PIF-T), y el cuadrado y la línea de trazos la de los pacientes no tratados (PIF -NT). Las barras indican los errores estándar entre los cuales oscila la media.

Nótese que tanto la tendencia presentada por los pacientes tratados como la presentada por los no tratados siguió un patrón similar en cuanto a la presencia de infiltrados. En relación a las zonas, se observa un mayor porcentaje de infiltrados en la zona tumoral, disminuyendo progresivamente a medida que nos alejamos de la zona tumoral.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p
Tratamiento	1,42	1,00	1,42	7,23	0,06
Zona	10,26	5,00	2,05	10,47	<b>0,00</b>
Tratamiento * Zona	0,26	5,00	0,05	0,27	0,93
Error	37,65	192,00	0,20		

**Tabla 14.** Análisis de la varianza del porcentaje de infiltrados. La tabla indica el resultado del ANOVA de dos factores. Los factores de variación analizados son el efecto del tratamiento (pacientes tratados y no tratados), y el efecto de la zona (tumoral y peritumoral a 1, 2,3 y 4 cm proximal y “D” a 1 cm distal del tumor). La tabla indica que la zona tiene diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

## DISCUSIÓN

---

En la literatura clásica oncológica generalmente se describen dos mecanismos de agresión tisular en pacientes con cáncer. El primero es la invasión progresiva, infiltración y destrucción de los tejidos aledaños al tumor maligno primario o sus metástasis. El segundo, incluye alteraciones producidas en zonas remotas que no están directamente afectadas por algún foco de la enfermedad, llamado fenómeno paraneoplásico (Finol y col., 2001). Sin embargo, los tejidos “no invadidos” considerados erradamente por algunos autores como tejidos normales, y que rodean al tumor maligno primario o sus metástasis han sido poco estudiados a pesar de que actualmente se han descrito alteraciones ultraestructuralmente significativas en algunos casos de neoplasias.

Las técnicas de resección para los tumores de recto requieren del conocimiento de los mecanismos de diseminación tumoral y de planos anatómicos de disección para lograr ofrecer al paciente una mejor calidad de vida, aumentar la tasa de curación de la enfermedad y disminuir la recurrencia local. Actualmente, se practica un margen de resección que cubre aproximadamente 2 a 2,5 cm del borde inferior del tumor incluyendo la zona linfática de la región (Charúa, 2008). No obstante, en esta investigación se observaron alteraciones significativas no solo a 1 y 2cm del tumor maligno, sino también a 3 y a 4cm del mismo, lo que sugiere que los efectos peritumorales ocupan un área mayor de lo que se pensó inicialmente.

La zona tumoral, no solo de los pacientes que fueron tratados con radio y quimioterapia, sino también los que no recibieron algún tipo de tratamiento previo a la resección del tumor (control negativo), presentó células epiteliales con abundante RER, así como también abundantes gránulos de secreción en el citoplasma, características propias de este tipo de células encargadas de la síntesis y secreción de moco en el epitelio intestinal (Colony, 1996). Sin embargo, se evidenciaron alteraciones como abundante vacuolización, lípidos extraídos, figuras mielínicas, gránulos de lipofucsina, pérdida de desmosomas de punto, mitocondrias edematizadas con desaparición de espacios intercrestas y baja densidad electrónica; cabe destacar que alguna de estas últimas se encontraron asociadas a RER y vacuolas. Los núcleos presentaron en su mayoría disposición irregular, hipercromasia, formas irregulares, en algunos casos se observaron pseudoinclusiones, dilatación y pérdida de su envoltura. Estas alteraciones fueron observadas en otros tumores que no recibieron algún tipo de droga antineoplásica ni tratamiento con irradiación, como en el caso de metástasis de leiomiomas (Finol y col., 1997), carcinoma espinocelular (Lamura y col., 2001) y en metástasis de diversos tumores

gastrointestinales (Correa y col., 1998).

Es interesante destacar que en los pacientes que recibieron tratamiento fueron apreciadas luces de aspecto coloidal rodeadas por células epiteliales neoplásicas dispuestas en forma irregular y con pocas microvellosidades, siendo estas luces similares a las producidas en el hígado por metástasis de adenocarcinomas de colon (Finol y col., 2000). En estos mismos pacientes, se evidenciaron algunos eventos apoptóticos en las células epiteliales, los cuales incluyeron la presencia de cuerpos apoptóticos característicos en el citoplasma celular, lisosomas complejos, mitocondrias edematizadas y algunos linfocitos apoptóticos fagocitados por las células tumorales. Tales eventos apoptóticos podrían estar asociados a una disminución de la malignidad relacionada con el tratamiento de radio y quimioterapia.

Como es sabido, el “suicidio” celular se produce cuando una célula bajo determinados estímulos fisiológicos desencadena mecanismos que determinan su propia muerte (De Toro, 2006). La apoptosis, es una de las formas de muerte celular codificada genéticamente, en el cual las células se inactivan, se desensamblan y degradan su propia estructura y componentes de manera coordinada y característica (Sánchez y Vargas, 2003). En este proceso la célula sufre el daño principalmente en el núcleo, sin producirse reacción inflamatoria y ocurre generalmente de forma aislada. La pérdida de integridad de las uniones intercelulares, hormonas y factores de crecimiento, los impactos ambientales como agentes químicos, radiaciones ionizantes e isquemia y el sistema inmune, son algunos de los desencadenantes extracelulares de apoptosis (Bordón y col., 2007). Un requerimiento esencial de las células apoptóticas para que sean reconocidas y fagocitadas es la expresión de un ligando adecuado en su superficie celular y de su contraparte en el fagocito. Uno de los mecanismos de reconocimiento más estudiados es la señal de los linfocitos apoptóticos con su pérdida de asimetría de la membrana celular, exponiendo de esta forma moléculas que inducen la fagocitosis de las células que la expresan (Sánchez y Vargas, 2003). La presencia de linfocitos en el tejido tumoral ha sido igualmente descrita por otros autores en trabajos realizados en pacientes con adenocarcinomas gástricos (López, 2006).

Los organelos involucrados en el proceso apoptótico son las mitocondrias (Baines y col., 2005; Suzanne y Jochen, 2009), lisosomas (Bursch, 2001) y retículo endoplasmático (Hetz y col., 2006). Sin embargo, en la mayoría de los tumores más agresivos, la apoptosis suele estar inhibida ante estímulos fisiológicos, característica que se relaciona con la sobreexpresión del gen Bcl-2, que es un oncogen característico (Gutierrez y col., 2005; Suzanne y Jochen, 2009), existiendo así, una relación inversamente proporcional entre el proceso apoptótico y la malignidad del tumor. Esto último es importante ya que el mecanismo por el cual actúan algunos agentes quimioterapéuticos es induciendo la

muerte celular a través de la alteración de su fisiología, pudiendo entonces provocar una resistencia al tratamiento (Suzanne y Jochen, 2009). La presencia de cuerpos apoptóticos en las secciones estudiadas en el presente trabajo apuntan, como se señaló anteriormente, a una posible disminución del proceso maligno luego del tratamiento.

En relación a las células musculares lisas en esta zona tumoral, se observó un proceso necrótico marcado tanto en los pacientes que fueron tratados como en los que no, notándose desaparición y desorganización total de los elementos contráctiles, abundantes vacuolas autofágicas complejas, mitocondrias edematizadas y degeneradas con pérdida de densidad electrónica, figuras mielínicas, gránulos de lipofuscina, ribosomas libres, desaparición de placas densas y cuerpos Z, micronúcleos con forma irregular e hipercromáticos en la mayoría de los casos y finalmente la desaparición de las membranas celulares, el cual es un evento característico del proceso necrótico. Este proceso degenerativo fue observado anteriormente en carcinomas epidermoides (Lamura y col., 2003), en el fenómeno paraneoplásico asociado con retinoblastoma (Finol y col., 2001), metástasis de leiomiocarcinoma de colon (Finol y col., 1997) y en los efectos peritumorales de un carcinoma espinocelular (Lamura y col., 2001), adenocarcinoma de colon (Montero y Finol., 2007) y carcinomas gástricos (Tonino y col., 1996).

Se sostiene que la necrosis tumoral es causada por isquemia crónica (hipoxia, bajo pH, bajos niveles de glucosa, incremento de los niveles de lactato) dentro de los tumores debido al colapso vascular y al rápido crecimiento del tumor (Caruso y col., 2009). Alteraciones mostradas por los capilares en nuestras biopsias son compatibles con un proceso isquémico, esta lesión letal va seguida de cambios estructurales definidos en las células, que reflejan la desintegración de la estructura celular debida a la activación de enzimas lisosómicas intracelulares liberadas en la célula cuando se pierde la integridad de la membrana celular (Stevens y Lowe, 1997, Bordón y col., 2007).

La integridad de la membrana celular es fundamental para la supervivencia celular tras la lesión. Estudios suponen que en las zonas de mayor hiperplasia hay una membrana basal bien desarrollada, engrosada y continua que habrá de sufrir, posteriormente, su disolución por agentes líticos indicando el rasgo de malignidad del tumor (Castejón y col., 2002). La membrana basal se encuentra formada por proteoglicanos, glicoproteínas, colágeno tipo IV, laminina, tenascina y fibronectina (Bernal y col., 2001; Baluk y col., 2003). Estos componentes junto con moléculas de adhesión célula-membrana basal y célula-célula (desmosomas de punto) se ven directamente afectados frente al proceso de progresión y migración de las células epiteliales neoplásicas, adquiriendo éstas un fenotipo migratorio asociado

directamente con el incremento en la expresión de varios genes envueltos en la motilidad de la célula, lo que permite al carcinoma celular degradar la membrana basal, migrar a la matriz extracelular, degradar la misma y posteriormente metastizar a través de la intravasación y extravasación (Yamaguchi y col., 2005; Duffy y col., 2008).

En este mismo orden, tenemos que la microvasculatura tanto a nivel tumoral como peritumoral en los pacientes tratados y no tratados, presentó alteraciones tales como engrosamiento del citoplasma endotelial, proliferación de organelos, mitocondrias edematizadas, núcleos alterados, presencia de prolongaciones del endotelio hacia la luz del capilar, oclusión de la luz, engrosamiento y reduplicación de la membrana basal. Todas estas alteraciones han sido reportadas en diversos estudios con pacientes no tratados dentro de los cuales se encuentran tumores del tracto gastrointestinal (Tonino y col., 2001), adenocarcinomas gastrointestinales (Tonino, 2004), lesiones premalignas y malignas de la mucosa bucal (Cedeño y col., 2006), adenocarcinomas de colon (Montero y Finol, 2007), carcinomas gástricos con necrosis coagulativa (Caruso y col., 2009), fenómenos paraneopásicos (Finol y col., 2001) y en enfermedades autoinmunes (Finol y col., 1992; Márquez y col., 2001).

El crecimiento, invasión y la metástasis de los tumores sólidos requieren del incremento en la vascularización. Los vasos sanguíneos tumorales constituyen estructuras dinámicas en relación a su formación por el proceso de angiogénesis y el remodelamiento vascular, los cuales presentan anomalías estructurales y funcionales de relevancia clínica en el proceso de carcinogénesis (Baluk y col., 2003; Cedeño y col., 2006). Estas anomalías son atribuidas generalmente a condiciones de hipoxia, estableciendo en estos tejidos un microambiente fisiopatológico durante su crecimiento, con células expuestas a prolongadas o crónicas deficiencias de oxígeno (Caruso y col., 2009). Cuando el tumor primario crece más de  $1\text{mm}^3$  *in situ*, este no puede obtener suficiente oxígeno y nutrientes por difusión, por lo tanto inicia el proceso de angiogénesis (Iiizumi y col., 2007); sin embargo, en nuestra investigación, no se apreciaron cuadros importantes de angiogénesis.

Por su parte, las irregularidades en la membrana basal vascular podrían estar asociadas con la síntesis y degradación de sus componentes, uno de ellos la laminina, los cuales pueden promover la angiogénesis, la progresión y la invasión tumoral (Tonino, 2004). Estudios sostienen que la membrana basal de las células endotelial es degradada durante el proceso angiogénico para permitir una nueva formación vascular y migración de la célula endotelial. Alternativamente, es posible que la membrana basal no sea dispersada completamente durante este proceso angiogénico sino que se remodela continuamente (Baluk y col., 2003).

Igualmente, no solo el engrosamiento y reduplicación de la membrana basal como los vistos en este trabajo, sino también el engrosamiento de el citoplasma endotelial y oclusión de la luz del vaso sanguíneo, han sido asociados y reportados en numerosos estudios de enfermedades autoinmunes y con componente autoinmune como Diabetes Autoinmune, Lupus Eritematoso Sistémico, Síndrome de Sjörgen, Esclerosis Sistémica Progresiva, Artritis Reumatoidea, Hipertiroidismo, VIH (Ibarra y col., 2007), donde la degeneración juega un papel importante.

Haciendo una comparación con nuestros controles negativos, se observó que tanto en pacientes tratados como no tratados existe un incremento estadísticamente significativo en el grosor de la membrana basal y del endotelio vascular en la zona tumoral, disminuyendo progresivamente a medida que nos alejamos del tumor (1, 2, 3 y 4cm); sin embargo, aún cuando este engrosamiento disminuye a nivel peritumoral, la alteración no deja de ser significativa. En cuanto a la oclusión de los vasos, se evidenció mayor porcentaje de oclusión en el tejido tumoral, lo cual es lógico debido al gran engrosamiento del endotelio ya evaluado en esta zona, disminuyendo esta oclusión a medida que nos distanciamos de la región tumoral.

Cuando la célula tumoral se separa de la masa del tumor primario generalmente es seguido por un proceso de intravasación durante el cual las células neoplásicas pueden atravesar barreras de colágeno, estructuras elásticas en los tejidos intersticiales y membrana basal gracias a enzimas capaces de degradar estos tejidos. Aunado a esto, el proceso de interacción cáncer-célula endotelial es considerado no solo como determinante de metástasis, sino también provee las herramientas y condiciones necesarias para facilitar la extravasación de la célula. Entre estas moléculas de adhesión se pueden nombrar las quimiosinas (Iizumi y col., 2007).

Las alteraciones nucleares en el endotelio incluyeron forma irregular, condensación de la cromatina, en algunos casos distribuyéndose en forma periférica con presencia de material particulado en el nucleoplasma, las cuales se le atribuyen a un proceso degenerativo de las células endoteliales y la poliploidía frecuente en las neoplasias (Tonino,2004).

Por otro lado, se sabe que los pericitos íntimamente asociados con el endotelio vascular, juegan un papel sumamente importante en la maduración, proliferación y permeabilidad de los vasos sanguíneos. Estudios anteriores reportan alteraciones significativas en estas células dentro de las que se encuentran anomalías morfológicas, pérdida de la asociación con la célula endotelial, aspecto proliferativo, núcleo pleomórfico, entre otras (Márquez y col., 2001; Jain y Booth, 2003; Montero y Finol, 2007; Cedeño y col., 2006). Sin embargo, en esta investigación, salvo algunos casos, no fueron

apreciadas alteraciones significativas con respecto a su morfología u otras alteraciones. Incluso en otros estudios, se sugiere que la heterogeneidad en el revestimiento de pericitos en los vasos sanguíneos en distintos cánceres humanos, constituye una manifestación dependiente de variables como el tipo histológico del tumor, grado, estadio, edad del paciente, tratamiento y condiciones de fijación del tejido (Eberhard y col., 2000).

Las alteraciones encontradas a nivel endotelial en las mitocondrias, principalmente, el hinchamiento, la vacuolización y la pérdida de densidad electrónica podrían estar asociadas con la condición de anoxia caracterizada de los diversos tumores (Tonino, 2004), así como a la degeneración que presenta la célula endotelial.

Recordemos que la exposición de las células a estímulos lesivos determina su muerte, y un ejemplo que ilustra el concepto de esta cascada de lesiones acumuladas se ve cuando las células sufren falta de oxígeno y nutrientes debido a la insuficiencia del riego sanguíneo (isquemia). La alteración primaria de la producción mitocondrial de ATP, se debe principalmente a esta condición, y al suministro inadecuado de sustratos energéticos, como la glucosa. Si las células sufren hipoxia o las mitocondrias son dañadas directamente, no pueden producir una cantidad suficiente de ATP, por cuanto la capacidad celular de producción anaeróbica de este metabolito es limitada debido a la acumulación de lactato, y que generalmente se agota pronto. La falta de ATP produce un fallo en las bombas de las membranas dependientes de él, lo que probablemente contribuye a que los sistemas de membranas internos se hinchen en las células (Stevens y Lowe, 1997; Lloreta y Serrano, 1998). Esta falla de las bombas iónicas de membrana provoca la acumulación de sodio y agua en el citoplasma celular, con ruptura de los sistemas membranosos internos, y esto permite la entrada libre de calcio en el citosol, donde se activan muchos sistemas enzimáticos destructivos, trayendo consecuencias nocivas para la célula. Todas estas lesiones interfieren directamente en las vías sintéticas básicas, provocando la ruptura de los lisosomas y liberación intracelular de potentes enzimas hidrolíticas activas a pH bajo, lo que conllevaría así a una mayor disolución celular (Stevens y Lowe, 1997).

Las alteraciones mitocondriales también fueron observadas a nivel de las células musculares lisas peritumorales, evidenciándose tanto en pacientes tratados como no tratados no solo la edematización o hinchamiento de las mismas, sino también la pérdida del espacio intercresta y la asociación con algunas vacuolas. Estas alteraciones se pudieron observar en otros estudios que incluyeron el tejido que rodea un adenocarcinoma de colon (Montero y Finol, 2007), metástasis de un leiomioma de colon en el hígado (Finol y col., 1997), áreas perimetastásicas de tumores malignos

gastrointestinales (Correa y col., 1998), en carcinoma epidermoide de lengua (Lamura y col., 2003), en tejidos próximos a un fibrohistiocitoma maligno (Finol y col., 1994), en fenómenos paraneoplásicos asociados a un retinoblastoma (Finol y col., 2001), y en cáncer de cuello uterino (Graterol y col., 2006).

Dado a la gran importancia de las mitocondrias no solamente reconocidas como osmómetros naturales sino también como marcadores biológicos de distintas tipos de patologías, se realizó igualmente un estudio estadístico donde se apreció un aumento significativo tanto del diámetro mayor como menor de estos organelos a nivel tumoral en los pacientes que recibieron tratamiento previo a la cirugía y en los controles negativos, disminuyendo progresivamente a medida que nos alejamos del tumor, existiendo así diferencias estadísticamente significativas entre las zonas estudiadas. Es importante señalar que a pesar de que estas medidas tienden a disminuir a medida que nos distanciamos del tumor, aún a 4 cm proximales del mismo, estos organelos siguen presentando un hinchamiento significativo.

Por su parte, al igual que en el caso de la zona tumoral, la presencia de vacuolas autofágicas no solo en las células epiteliales sino también en las células musculares lisas a nivel peritumoral en pacientes tratados y no tratados fue marcada. Estas formaciones fueron observadas igualmente entre los efectos peritumorales de un carcinoma gástrico (Tonino y col., 1994), en el tejido que rodea un adenocarcinoma de colon (Montero y Finol, 2007), en el tejido hepático luego de una metástasis de un leiomiocarcinoma de colon (Finol y col., 1997), en carcinoma epidermoide de músculo de lengua (Lamura y col., 2003) en áreas peritumorales a un fibrohistiocitoma maligno (Finol y col., 1994), en carcinoma espinocelular (Lamura y col., 2001) y en fenómenos paraneoplásicos (Finol y col., 2001).

La vacuolización en las células musculares lisas tanto a nivel tumoral como peritumoral fue evaluada cuantitativamente en esta investigación, observándose diferencias estadísticamente significativas entre las zonas de estudio y entre los pacientes tratados y no tratados. El mayor porcentaje de vacuolización fue observado a nivel tumoral dada la alta degeneración de estos tejidos, existiendo una mayor tendencia por parte de los pacientes que recibieron tratamientos de quimio y radioterapia antes de ser sometidos a la cirugía. Este porcentaje va disminuyendo progresivamente en la distancia, no obstante, aún a 3 y a 4cm proximales del tumor, los cuales se encuentran fuera del margen de resección de este tipo de tumor, el porcentaje de vacuolización aún se considera significativo.

Como sabemos, la autofagia puede promover la supervivencia ante la pérdida de nutrientes a través del reciclaje intracelular de éstos en un tiempo corto para mantener la homeostasis. Sin embargo, este proceso también puede inducir igualmente la muerte celular a través del consumo celular progresivo a largo plazo (DeVita y col., 2008; Suzanne y Jochen, 2009).

Estudios realizados, señalan que en los tumores sólidos, la autofagia se localiza en las regiones de estrés metabólico y niveles limitantes de nutrientes, lo que permite recobrar el crecimiento y capacidad proliferativa del tumor (Jin y col., 2007). Este proceso no solo involucra el reciclaje de los constituyentes de las células normales, sino también restos de organelos, y proteínas dañadas que promueven la acumulación de agregados y estructuras celulares deformes que pueden conducir seguidamente a la degeneración celular y que podrían explicar algunos cuadros de degeneración y necrosis en las biopsias analizadas en la presente investigación.

Por otro lado, en otras investigaciones con agentes antineoplásicos se ha observado la inducción de autofagia en diferentes líneas celulares de cáncer. Sin embargo, si esta autofagia inducida por las drogas anticancerosas contribuye a la muerte celular del cáncer o si es una manifestación de las células neoplásicas para mantener el metabolismo durante el tratamiento, como mecanismo de resistencia a la muerte celular, no está aún claro (DeVita y col., 2008).

Otras de las alteraciones observadas a nivel de la musculatura lisa peritumoral fueron la disminución de caveolas y vesículas pinocíticas, y las que estaban presentes se encontraban edematizadas. Estas alteraciones en las vesículas se ha observado en investigaciones sobre las radiaciones ionizantes en el pulmón (Michelli y col., 2002), interpretadas como un signo temprano de la lesión provocada por la irradiación. Las radiaciones ionizantes como es sabido, consisten en energía electromagnética o partículas dotadas de movimiento, las cuales al interactuar con la materia, producen ionización; es decir, desplazamiento de electrones de los átomos y formación de radicales libres, los cuales producen daño a las macromoléculas celulares, fundamentalmente ADN y ARN. Aún cuando la muerte celular se produce más fácilmente si la radiación interacciona directamente con el núcleo, es mucho más frecuente la interacción con el agua celular, lo que induce la formación de radicales libres con capacidad de difusión suficiente como para alcanzar las moléculas diana de ADN, conocido como efecto indirecto de la radiación (Gordon, 2002; Esco y col., 2004). Este daño conduce a modificaciones biológicas como inhibición de la división celular y muerte celular, y de cualquier manera, estos efectos biológicos tienen lugar en todas las células expuestas, tanto tumorales como normales (Esco y col., 2004; Gutiérrez, 2008).

Aunado a esto, el núcleo de la fibra muscular lisa tanto de los pacientes tratados como de los no tratados, presentó alteraciones como hipercromasia, contornos irregulares, dilatación y pérdida de la envoltura nuclear. Dado que el núcleo es considerado como un marcador sumamente importante ante cualquier patología, se realizó un estudio estadístico sobre los mismos en las células musculares lisas,

observándose una disminución del diámetro mayor en la zona tumoral en los pacientes que recibieron tratamiento, y aumentando progresivamente en la distancia recuperando poco a poco su diámetro normal. En el caso de los pacientes no tratados, este diámetro se mantuvo un poco constante entre las zonas, por lo que en comparación con los pacientes no tratados, existieron diferencias estadísticamente significativas.

Con respecto al estudio del diámetro menor del núcleo de estas células musculares tanto en pacientes tratados como en los no tratados, se observó prácticamente el mismo patrón a pesar de que en los pacientes no tratados las medidas son mayores. Se evidenció una disminución en las zonas más aledañas al tumor (1 cm distal y proximal del mismo) y luego aumentando en la distancia, sin embargo, dichos cambios con respecto a las zonas son muy variables, aún cuando podrían estar asociados al tratamiento terapéutico.

Con respecto al estudio realizado con el diámetro menor del núcleo en la misma musculatura, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes tratados y los no tratados, con una mayor tendencia por parte de los pacientes que recibieron tratamiento quirúrgico e irradiación antes de la cirugía. Los mayores valores se obtuvieron en la zona tumoral, disminuyendo en los tejidos más aledaños (1cm), y aumentando nuevamente en las próximas distancias.

Por otro lado, tanto los cuerpos Z como las placas densas de la musculatura lisa correspondiente a la zona que rodea al tumor se encontraron disminuidos debido al proceso de atrofia y degeneración celular en estas zonas no solo en los pacientes tratados sino también en nuestros controles negativos. En el estudio estadístico se pudo observar en efecto una disminución considerable de placas densas en la zona tumoral tanto en los pacientes tratados como en los no tratados dado al proceso necrótico observado en estas zonas, observándose luego un aumento de las mismas a medida que nos distanciamos del tumor, habiendo diferencias estadísticamente significativas solo entre las zonas estudiadas.

La membrana basal y la plasmática de las células musculares lisas en pacientes tratados y no tratados, se presentaron en algunos casos interrumpidas, o engrosadas en el caso de la membrana basal, mostrándose en las mismas desorganización y desaparición del material contráctil de las células, evidenciándose así un proceso de degeneración o necrosis marcado, cuya destrucción tan extensa, aún a 4cm del tumor, no se ha observado antes. En cuanto la matriz extracelular, presentó abundante colágeno, el cual se distribuyó en muchas de las ocasiones de forma irregular, así como también abundantes fibroblastos.

La inervación tanto a nivel tumoral como peritumoral tanto en los pacientes tratados con quimio

y radioterapia como en los que no recibieron ningún tipo de tratamiento, presentó alteraciones significativas con degeneración de terminales nerviosos y disminución de vesículas sinápticas en su interior. Los axones, se presentaron igualmente atrofiados con pérdida y distribución irregular de los neurofilamentos y neurotúbulos. Alteraciones de este género pero con nervios mielínicos fueron apreciadas en carcinoma de cérvix (Finol y col., 1993) y en la ultraestructura del músculo en algunas enfermedades nerviosas autoinmunes (Finol y col., 1992). Esta reducción de los terminales y axones fue evaluada estadísticamente observándose en ambos diferencias estadísticamente significativas entre las zonas estudiadas en esta investigación. Tanto el diámetro mayor como el menor se presentaron mayormente disminuidos en las zonas tumorales dado el proceso necrótico, observándose un aumento progresivo en las subsiguientes distancias adyacentes al tumor.

Finalmente, tanto en pacientes tratados como en los que no se trataron, el infiltrado celular presente a nivel tumoral estuvo mayormente constituido por neutrófilos y linfocitos; en el caso de la región peritumoral fue más diverso, constituido por macrófagos, neutrófilos, linfocitos, células NK y mastocitos. Éstos han sido reportados en diversos tumores como en carcinoma de próstata (Gutierrez y col., 2005), fenómeno paraneoplásicos en la musculatura esquelética (Tonino y col., 1991), fenómeno paraneoplásico de carcinomas de cérvix (Finol y col., 1993), efecto paraneoplásico provocado por un retinoblastoma (Finol y col., 2001), en el tejido que rodea a un adenocarcinoma (Montero y Finol, 2007), en carcinoma epidermoide (Lamura y col., 2003), enfermedades nerviosas autoinmunes (Finol y col., 1992), en VIH (Ibarra y col., 2007), y en enfermedades de la tiroide con componente autoinmune (Márquez y col., 2001).

El estudio estadístico realizado ante la presencia o ausencia de estos infiltrados demostró diferencias estadísticamente significativas entre las zonas estudiadas más no entre los pacientes tratados y no tratados, observándose un mayor porcentaje de ellos en las células tumorales, disminuyendo progresivamente en la distancia.

Las superficies mucosas en tejidos gastrointestinales abarcan 400 m<sup>2</sup> y están cubiertos por una capa de células epiteliales. La mayoría de los antígenos con los que se encuentra el sistema inmunológico de un ser vivo a lo largo de su vida entran a través de las mucosas, siendo la mayor zona del organismo en contacto con el medio externo. Como defensa, la mucosa está poblada con células del sistema inmune, el llamado sistema inmunológico de mucosas. Por otro lado, en la lámina propia, ubicada entre este epitelio y la *muscularis mucosae*, se encuentran normalmente linfocitos, macrófagos, células dendríticas, ganulocitos y mastocitos (López, 2006).

Durante el proceso de multiestadaje del tumor, células seleccionadas sufren cambios genéticos para pasar de un estado al siguiente y que, en último caso, llegarían a la formación del tumor maligno. En cada paso del proceso existen mecanismos de defensa naturales contra el cáncer, por lo que el sistema inmune constantemente supervisando el desarrollo de tumores. Por ejemplo, durante el crecimiento invasivo del tumor el tejido del entorno es destruido, por lo que se inducen diferentes señales de inflamación que dan lugar al reclutamiento de células del sistema inmune. Sin embargo, a pesar de que el sistema inmune es capaz de reconocer al tumor y destruirlo, un gran número de tumores continúa creciendo y evadiendo el reconocimiento y destrucción por el sistema inmune (López, 2006).

**CAPÍTULO V.  
CONCLUSIÓN**

## CONCLUSIÓN

---

- ✚ La ultraestructura de tumores en pacientes no tratados y tratados con radioterapia y quimioterapia mostró características similares en términos de las alteraciones producidas en el tejido epitelial, así como en la microvasculatura, inervación y tejido muscular liso. Las mismas llevaron a necrosis en todos los niveles del microambiente del tumor.
- ✚ En relación a las alteraciones producidas en los tejidos peritumorales, la ultraestructura mostró que tanto en los pacientes tratados como en los no tratados se presentaron daños en los mismos, que variaron desde leves hasta severos e incluyendo en este último caso de degeneración y necrosis. Sin embargo, en el caso de los pacientes tratados se observó un incremento de la autofagia en los tejidos estudiados, acompañada en las células musculares lisas por núcleos que se asemejaron cada vez más a los de las células musculares lisas normales lo cual podría estar relacionado con el tratamiento antineoplásico aplicado.
- ✚ El infiltrado celular estuvo constituido a nivel del tumor fundamentalmente por neutrófilos y escasos linfocitos. Por el contrario, en las áreas peritumorales, el infiltrado fue más diverso, localizándose adicionalmente a neutrófilos y linfocitos, macrófagos y mastocitos, lo cual podría estar asociado a procesos que ocurren en la inflamación que acompaña a los efectos tumorales.
- ✚ Cuadros apoptóticos no fueron localizados en los tumores o en áreas peritumorales en pacientes no tratados, lo cual podría estar relacionado con el grado de malignidad de los tumores estudiados. Por su parte, en el área tumoral, en pacientes tratados si se localizaron cuadros apoptóticos, pudiendo ello estar relacionado con un efecto beneficioso del tratamiento antineoplásico, dada la relación inversa que existe entre apoptosis y malignidad. Sin embargo, la similitud en el grado de alteración de otras estructuras celulares y extracelulares parecían sugerir que el tratamiento por lo menos no eliminó del todo los efectos del tumor ni los peritumorales.

**CAPÍTULO VI.**  
**BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Alazzouzi,H. 2006. La Inestabilidad Genómica en Cáncer. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Robert, K. , Watson, J. 1994. Molecular Biology of the Cell. 3<sup>rd</sup> Edition. Garland Publishing, Inc.New York and London.
- Andrade,S., Pereira, F.L. 2007. Câncer Colorretal Sincrônico - Relato de Caso e Revisão de Literatura. *Rev bras Coloproct.* **27**(1): 069-079
- Arbogh, B., Bell, 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.
- Bailey, H.R, Huval, W.V., Max, E. Smith, K. W., Butts D.R., Zamora, L.F. 1992. Local excision of carcinoma of the rectum for cure. *Surgery* **111** (5): 555-61.
- Baines, C.P., Kaiser, R.A., Purcell, N.H., Blair, N.S., Osinska ,H., Hambleton, M.A. 2005. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature.* **434** (7033):658-62.
- Balch, G.C., De Meo, A., Guillem ,J.G. 2006. Modern management of rectal cancer: a 2006 update. *World J Gastroenterol.* **12** (20): 3186-95.
- Baluk, P., Morikawa, S., Haskell, A., Mancuso, M., McDonald, D. 2003. Abnormalities of Basement Membrane on Blood Vessels and Endothelial Sprouts in Tumors. *Am. J. Pathol.* **5** (163):1801-1814.
- Bernal, S., Ebmeyer, J., Anonopoulos, A., Borkowski, G., Sudhoff, H. 2001. Alteraciones de la membrana basal en el colesteatoma de oído medio. *Acta otorrinolaringol. Esp.* **52**: 330-335.
- Bordón, E., Lloret, M., Pinar, B., Rey, A., Lara, P. 2007. Apoptosis y proteínas reguladoras en cáncer de cérvix uterino. *Biocáncer.***4**: 2-7.
- Bozzola, J.J.,Russell, L.D. 1992. Electron Microscopy. Specimen staining and contrast methods for transmission electron microscopy. Lones and Bartlett Publishers: Sudbury.
- Bruce,W.R.,Meeker,B.E.,Valeriote,F.A.1966. Comparison of the sensitivity of normal hematopoietic and transplanted lymphoma colony-forming cell to chemotherapeutic agents administered *in vivo*. *JNCI* .**37**:233-245.

- Bursch, W. 2001. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ.* **8** (6):569-81.
- Capote, L.G.2006. Aspectos epidemiológicos del cáncer en Venezuela. *Rev. venez. Oncol.* **4** (18).
- Capote, L. 2008. Frecuencia del cáncer en Venezuela. *Fasciculos Coleccionables: 30 años – 30 temas de la Fundación BADAN.* Tema 2.
- Caruso, R.A., Fedele, F., Finocchiaro, G., Pizzi, G., Nunnari, M., Gitto, G., Fabiano, V., y col. 2009. Microvascular Changes in Human Gastric Carcinomas with Coagulative Necrosis: An Ultrastructural Study. *Ultrastruct Pathol.***32**:5, 184-188.
- Castejón, O., Scucces, M., Rivas, Alba., Graterol, I. 2002. La membrana basal en caso de mola hidatidiforme completa. *Rev. Obstet. Ginecol. Venez.***3** (62): 207-214.
- Cedeño, F., Tonino, P., Finol, H.J. 2006. Ultraestructura de la microvasculatura en las lesiones premalignas y malignas de la mucosa bucal. *Acta Odontol. Venez.* **1** (44): 19-21.
- Charúa, L. 2008. Cáncer de recto. *Rev. Gastroenterol. Mex.***73** (Suppl. 1):100-104.
- Chen, G., Lai, P.2009. Apoptosis in Carcinogenesis and Chemotherapy. Springer Science+Business Media B.V. Hong Kong, China.
- Colony, P. 1996. Structural Characterization of Colonic Cell Types and Correlation with Specific Functions. *Diges. Dis. Sci.* **1** (41): 88-104.
- Correa, M.E. 1996. Alteraciones Ultraestructurales Hepáticas Producidas por Metástasis de Tumores Primarios en el Sistema Gastrointestinal. Tesis de Licenciatura, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- Correa, M.E., Finol, H.J., Marquez, A., Sosa, L.A, Díaz., N.L.1998. Ultrastructure of hepatocyte abnormalities in perimetastatic areas. *J.Submicrosc. Cytol. Pathol.* **30** (3),371-377
- Dahlberg, M., Glimelius, B., Pahlman, L.1999. Improved survival and reduction in local failure rates after preoperative radiotherapy: evidence for the generalizability of the results of Swedish Rectal Cancer Trial. *Ann Surg.* **229** (4): 493-7
- De Toro, G. 2006. Muerte celular programada. Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular. *Actas Hispanoamer. Patol.* 2-13 (Conferencias Invitadas).
- Del Castillo,J., Puig, J.,Mayol, J., Garcia,A. 2002. Tratamiento local del cáncer de recto. *Cir Esp;* **72**(1):40-4

- DeVita, V.T., Hellman, S., Rosenberg, S.A. 2008. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 8th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Duffy, M.J., McGowan, P.M., Gilleagher, W.M. 2008. Cancer invasion and metastasis: changing views. *J. Pathol.* **214**: 283-293.
- Eberhard, A., Kahlert, S., Goede, V., Hemmerlein, B., Plate, K.H., Augustin, H.G. 2000. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res.* **160**: 1388-1393.
- Esco, R., Valencia, J., Polo, S. 2004. Radioterapia y citoprotección. Estado Actual. *Oncol.Barç.* **7**(27): 1-13.
- Fawcett, M.D. 1995. *Tratado de Histología*. 12ª Edición. McGRAW-HILL INTERAMERICANA. Madrid.
- Fearon, E. R., Vogelstein, B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, **61**: 759-767.
- Fidler, I., Hart, I. 1982. Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science*. **217**: 998-1003.
- Finol, H. J., Correa, M., Márquez, A., Sosa, L.A. 1997. Ultrastructure of Hepatic Metastases from a Colon Leiomyosarcoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **16**, 4
- Finol, H.J., Gledhill, T., Parada, D., López, C., Moreira, O. 2003. Ultrastructural pathology of smooth muscle tissue surrounding prostatic adenocarcinoma. *Microsc. Microanal.* **9** (Suppl. 2): 1400-1401.
- Finol, H.J., Márquez, A., Bello, B. y Rivera, H. 1994. Ultrastructure of skeletal muscle alterations surrounding a malignant fibrous histiocytoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **13**: 381-384.
- Finol, H.J., Márquez, A., Montes de Oca, I., Müller, B., Rivera, H. 1992. Muscle Ultrastructure in some Autoimmune Nervous Diseases. *Acta Microsc.* **2** (1): 55-62.
- Finol, H.J., Márquez, A., Navas, E., y de Navas, N.R. 2001. Extraocular muscle ultrastructural pathology in the paraneoplastic phenomenon associated with retinoblastoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **20**: 281-285.
- Finol, H. J., Márquez, A., Pulido-Méndez, M. 2000. Ultrastructural pathology of liver metastases from colon adenocarcinomas. *EUREM* **12**. 1: b181-b182.

- Finol, H. J., Márquez, A., Rodríguez, I., Montes de Oca, I., Tonino, B., Müller, B. 1993. Neuromuscular pathology in the paraneoplastic phenomenon associated with cervix carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **12** (1):53-58.
- Fuchs, C.S., Giovannucci, E.L., Colditz, G.A. 1994. A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med.* **331** (25): 1669-74.
- Ginsburgh, H., Wolosin, J.M. 1979. Effect of uranyl ions on lipid bilayer membranes. *Chem. Phys. Lipids.* **23**: 125-131.
- Gordon, G. 2002. Basic Clinical Radiodiagnosis. 3era Edición. ARNOLD. London.
- Graterol, I., Finol, H., Correnti, M. 2006. Virus del papiloma humano en lesiones intraepiteliales escamosas (LIE) de cuello uterino. Tipificación y ultraestructura. *Rev. Soc. Venez. Microb.* **26**: 89-94.
- Gunderson LL, Sosin H. 1974. Areas of failure found at reoperation (second or symptomatic look) following curative surgery for adenocarcinoma of the rectum: Clinicopathologic correlation and implications for adjuvant therapy. *Cancer.* **34**:1278-92.
- Gutiérrez, E. 2008. Radioterapia y Cáncer. *Fasciculos Coleccionables: 30 años – 30 temas de la Fundación BADAN.* Tema 30.
- Gutiérrez, L., Noria, F., Finol, H., Sun, L., Castellino, F., Pollard, M. 2005. Fas Ligand Expression and its correlation with apoptosis and proliferation in Lobund-Wistar prostate carcinomas. *Pathobiology.* **72**: 260-268.
- Hetz, C., Bernasconi, P., Fisher, J., Lee, A.H., Bassik, M.C., Antonsson, B. 2006. Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1 $\alpha$ . *Science.* **312** (5773):572-6.
- Ibarra, G., Tovar, V., La Corte, E., Nadorfy de López, E., Finol, H. 2007. Alteraciones ultraestructurales en la microvasculatura de la región de la cara en pacientes VIH. *Acta odontol. Venez.* **45** (2): 1-10.
- Iizumi, M., Mohinta, S., Bandyopadhyay, S., Watabe, K. 2007. Tumor-endothelial cell interactions: Therapeutic potential. *Microvas. Res.* **74**: 114-120.
- Jain, R., Booth, M. 2003. What bring pericytes to tumor vessels?. *J. Clin. Invest.* **112** (8): 1134- 1136.
- Jin, S., DiPaola, R.S., Mathew, R., White, E. 2007. Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death. *J Cell Sci.* **120**:379.
- Kang, H., O'Connell, J.B., Leonardi, M.J. 2007. Rare tumors of the colon and rectum: a national review. *Int J Colorectal Dis.* **22** (2): 183-9.

- Khoury, D.A., Opelka, F.G., Beck, D.E. 1996. Colon surveillance after colorectal cancer surgery. *Dis Colon Rectum*. **39** (3): 252-6.
- Labianca ,R., Pessi, M.A., Zamparelli, G. 1997. Treatment of colorectal cancer. Current guidelines and future prospects for drug therapy. *Drugs*. **53**:593–607.
- Lamura, A., Finol, H.J., Garriga, E.A., d'Empaire, M.G., Tinoco, P, J., Salazar, N., Bello, B. 2001. Carcinoma espinocelular de antro y reborde maxilar: tratamiento quirúrgico, estudio histopatológico y ultraestructural. *Acta odontol. Venez.* **3** (39): 79-84.
- Lamura, A., Finol, H.J., Garriga, E.A.,Muller, B., Lamura, G. 2003. Estudio clínico, histopatológico y ultraestructural del músculo de la lengua en pacientes con carcinoma epidermoide. *Acta odontol. Venez.* **1** (41): 32-38.
- Liotta, L.A., Rao ,C.N., Barsky ,S.H. 1983. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab. Invest.* **49**: 636-649.
- Lloreta-Trull, J., Serrano, S. 1998. Biology and pathology of the mitochondrion. *Ultrastruct. Pathol.* **22**: 357- 363.
- Longatto-Filho, A., Pinheiro, C., Ferreira, L., Scaputatempo, C.,Aves, V.,Baltazar, F.,Shmitt, F. 2008. Peritumoral, but not intratumoral, lymphatic vessel density and invasion correlate with colorectal carcinoma poor-outcome markers. *Virchows Arc.***452**: 133-138.
- López, M. 2006. Estudio de las alteraciones de linfocitos t de sangre periférica y de mucosa en pacientes con adenocarcinoma gástrico. Universidad Complutense De Madrid, memoria para optar al grado de doctor, Madrid, España.
- Luft, J. H. 1961. Improvements in epoxi resin embedding methods. *J.Biophys. Biochem. Cytol.* **9**: 409-414
- Marcello ,P.W., Schoetz, D.J . 1997. Surgery for colonic carcinoma. New York.
- Manzanilla, M. 2005. Historia del cáncer del recto y su tratamiento quirúrgico. *Rev mex Coloproct.***11**(2):60-63.
- Márquez, A., Finol, H.J., De Blanco, M.C., Adjounian, H., Pulido-Méndez,M. 2001. Skeletal muscle microvascular alterations in euthyroid and hypothyroid patients with autoimmune thyroid disease. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **33** (4): 425-432.
- Mellgren, A., Sirivongs, P., Rothenberger, D.A.,Madoff, R.D., Garcia-Aguilar, J.2000. Is local excision adequate therapy for early rectal cancer?. *Dis Colon Rectum* **43**:1064–1071.

- Michelli, P., Finol, H., González, R., Avendaño, M., Mejía, M., Gonzalez, S. 2002. Efecto Experimental de las Radiaciones Ionizantes en el Pulmón: Estudio Histopatológico, Ultraestructural y de Análisis Elemental. *Rev. Soc. Med. Quir. Hosp. Emerg. Pérez de Leon.* **33** (1-2): 1-6.
- Millonig, G.A. 1961. Advantages of a phosphate buffer for OsO<sub>4</sub> solutions in fixation. *J.Appl. Phys.* **32**: 1637.
- Mira, J.P., Benard, V., Groffen, J., Sanders, L.C., Knaus ,U.G.2000.Endogenous, hyperactive Rac3 controls proliferation of breast cancer cells by a p21-activated kinase dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**(1):185-9.
- Montero, E., Finol, H.J. 2007. Patología ultraestructural del tejido que rodea a un adenocarcinoma de colon. *Acta Microsc.* **2** (16) (Supl.2).
- Nelson,H., Petrelli, N., Carlin, A.,Couture, J., Fleshman,J., Guillem, J., y col. 2001. Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery. *J Natl Cancer Inst* **93** (8): 583-96.
- Páramo, D., Sierra, F.2005. Dieta, nutrición y cáncer gastrointestinal. *Rev col gastroentero* **3**(20):26-32.
- Paweletz, N., Boxberger, H. 1994. Defined tumor cell-host interactios are necessary for malignant growth. *Crit. Rev. Encogen.* **5**: 69-105.
- Piero,N., Beral, D., Hartley, J., Monson, J.2005. Local Excision of Rectal Cancer. *Dig Surg.*; **22**:6–15
- Ransohoff, D.F., Lang, C.A.1991. Screening for colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **325** (1): 37-41
- Reynolds, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* **17**: 208-212.
- Risques,R.2001.Papel del daño genómico en el cáncer colorrectal. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
- Rosito, M.A. , Damin, D.C., Moreira, L.F., Silva,V.D, Rech ,C., Tarta, C., Contu,P., Prolla, J.C. 2005.Técnica de Assinatura Digital no Câncer de Reto. *Rev bras Coloproct.* **25**(1):38-40.
- Ruoslahti, E.1996. How Cancer Spreads. *Sci. Amer.* **275** (3):42-47.
- Saclarides, T.J., Szeluga, D., Staren, E.D.1994. Neuroendocrine cancers of the colon and rectum. Results of a ten-year experience. *Dis Colon Rectum.* **37** (7): 635-42.

- Sánchez, L., Vargas, F. 2003. Apoptosis: el fenómeno y su determinación. *Tec. Pecu. Méx.* **41** (1): 49-62.
- Seitz, U., Bohnacker, S., Seewald, S., Thonke, F., Brand, B., Bräjutigan, T., Soehendra, N. 2004. Is endoscopic polypectomy an adequate therapy for malignant colorectal adenomas? Presentation of 114 patients and review of the literature. *Dis Colon Rectum* **47** (11): 1789-96.
- Shih, I.M., Wang, T.L., Traverso, G., Romans, K., Hamilton, S.R., Ben-Sasson, S., Kinzler, K.W., y col.. 2001. Top-down morphogenesis of colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:2640-2645.
- Siddiqui, A.A., Fayiga, Y., Huerta, S. 2006. The role of endoscopic ultrasound in the evaluation of rectal cancer. *Int Semin Surg Oncol* **3**: 36
- Smith, R.A., Von Eschenbach, A.C., Wender, R. 2001. American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer: update of early detection guidelines for prostate, colorectal, and endometrial cancers. *CA Cancer J Clin.* **51** (1): 38-75.
- Snady, H., Merrick, M.A. 1998. Improving the treatment of colorectal cancer: the role of EUS. *Cancer Invest.* **16** (8): 572-81.
- Stevens, A., Lowe, J. 1997. Anatomía Patológica. HARCOURT BRACE. Madrid.
- Suzanne, H., Jochen, H.M. 2009. Apoptosis signalling proteins as prognostic biomarkers in colorectal cancer: a review. *Biochim Biophys Acta.* **1795**:117-129.
- Thackery, E. 2002. *The GALE ENCYCLOPEDIA of Cancer*. Volúmen 1. Gale Group. New York.
- Thorson, A.G., Knezetic, J.A., Lynch, H.T. 1999. A century of progress in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). *Dis Colon Rectum.* **42** (1): 1-9.
- Ting-Beall, H.P.J. 1980. Interactions of uranyl ions with lipid bilayer membranes. *J. Microsc.* **118**:221-227.
- Tonino, P. 2004. Inmunomorfología, Ultraestructura Y Morfometría Angiotumoral En Adenocarcinomas Gastrointestinales Del Humano. Trabajo de Ascenso, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- Tonino, P., Finol, H.J., Hidalgo, C., Sosa, L. 2001. Angiogénesis y proliferación en tumores malignos del tracto gastrointestinal del humano. *Acta Biol. Venez.* **21** (1): 1-8.

Tonino, P., Finol, H.J., Márquez, A., Prieto, J. 1991. Ultrastructural pathology of skeletal muscle in the paraneoplastic phenomenon. *J. Exp. Clin. Cancer. Res.* **10** (4): 283-289.

Tonino, P., Finol, H.J., 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.1): 226.

Watson, M. L. 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **4**: 475-481

Wolpin, B.M., Meyerhardt, J.A., Mamon, H.J., Mayer, R.J. 2007. Adjuvant treatment of colorectal cancer. *CA Cancer J Clin* **57** (3): 168-85.

Yamaguchi, H., Wyckoff, J., Condeelis, J. 2005. Cell migration in tumors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**: 559-564.

#### **Consultas en línea:**

Instituto Nacional del Cáncer. (En línea) <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/recto/Patient/page1> (Consulta: 01 de Octubre de 2008).

Instituto Nacional del Cáncer. (En línea) <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/recto/Patient/page2#> (Consulta: 01 de Octubre de 2008).

<http://www.statsoft.com/> (Consulta: 01 de Abril de 2009).