

**DETERMINACIÓN DE INESTABILIDAD
MICROSATELITAL EN PACIENTES CON CANCER
GÁSTRICO DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE
NEIVA HERNANDO MONCALEANO PERDOMO**

INVESTIGADORES PRINCIPALES

**Adonis Tupac Ramírez Cuellar Md RIV Cirugía (HUHMP-USCO)
Yenny Montenegro Medina. MSc Genética (UDEA)**

COINVESTIGADORES

**Henry Ostos Alfonso MD. MSc Genética (USCO)
Luis Gerardo Vargas. MD. Cirujano (HUHMP)
Cesar Panqueba Tarazona. MD. Patólogo (USCO)**

**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
PROGRAMA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA - UNIDAD DE GENÉTICA
Febrero - 2004**

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A nivel mundial el cáncer gástrico (CG) es considerado la segunda causa más frecuente de cáncer y la segunda causa de mortalidad por esta enfermedad, particularmente en países como China, Japón y Costa Rica.^{1,2}

En Colombia, según el Instituto Nacional de Cancerología, se estima que anualmente son diagnosticados 25.684 nuevos casos de cáncer en hombres y 35.150 en mujeres, siendo el CG el tercero más común en mujeres, después del de cuello uterino y mama, mientras que en hombres, ocupa el primer lugar (21/100 mil), seguido por el de próstata; por lo cual se considera un problema de salud pública en Colombia; donde existen zonas de alto riesgo como: Caquetá–Huila–Tolima, Boyacá–Cundinamarca–Meta, Bogotá, Antioquia, Norte de Santander, Medellín, Pasto y Valle. El Huila es el noveno departamento con mayor frecuencia a nivel nacional ; así entre 1990 y el 2000 han sido diagnosticados 292 casos solamente en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo (HUHMP)^(3,4). A nivel nacional, 4.000 nuevos casos son diagnosticados anualmente, con una mortalidad de 11/100.000, convirtiéndose en la cuarta causa de muerte en el país, solo superada por las defunciones por violencia, infarto agudo de miocardio e insuficiencia cardíaca.^{3,4}

Múltiples factores ambientales, incluyendo la infección por *Helicobacter pylori*, la alta ingesta de sal, los compuestos N-nitroso y la deficiencia de antioxidantes en la mucosa gástrica, han sido implicados en la iniciación de la carcinogénesis. Estos factores potencialmente disparan cambios genéticos en el epitelio gástrico del huésped, tales como la activación de oncogénos, pérdida alélica de genes supresores de tumor y la Inestabilidad Microsatelital (IM) informada entre un 17 a 59% de los CG esporádicos y heredados.^{1,5}

A pesar de la significativa presencia de tumores gástricos en población joven de nuestro país, los cuales generalmente son asociados con algún tipo de predisposición genética, en Colombia no se han realizado estudios que busquen determinar la etiología de la

enfermedad; por eso con este trabajo deseamos continuar nuestra línea de investigación en cáncer y genética, determinando la influencia de la vía mutadora en el cáncer gástrico de nuestra población al determinar la frecuencia de la IM considerada el marcador molecular de las Mutaciones Mutadoras y correlacionar esta información con variables como la sensibilidad a tratamientos quimioterapéuticos, tasa de sobrevida y penetrancia familiar; no siendo este nuestro único ni más importante objetivo, pues con este trabajo como hemos mencionado anteriormente deseamos fortalecer la línea de investigación en cáncer y genética convirtiendo a nuestra institución y universidad en pioneros del área a nivel nacional.

2. JUSTIFICACION

Por su alta mortalidad, el cáncer gástrico sigue siendo foco principal de atención, ya que constituye un problema de salud pública en Colombia; conociéndose como zonas de alto riesgo las siguientes áreas: Caquetá–Huila–Tolima, Boyacá–Cundinamarca–Meta, Bogotá, Antigua Caldas, Norte de Santander, Medellín, Pasto y Valle. Se estima que a nivel nacional aparecen 4.000 casos nuevos anualmente, con una mortalidad global que ha tenido un ligero pero sostenido crecimiento del 8,9/100.000 en 1.959 a 11/100.000 en 1.994 ^{3,4}

El cáncer gástrico representa la cuarta causa de muerte en el país, solo superada por las defunciones por violencia, infarto agudo de miocardio e insuficiencia cardiaca. Es la primera causa de muerte por cáncer en el hombre y la segunda en la mujer después del cáncer de cervix y a nivel mundial es la segunda causa de muerte por cáncer. ^{3,4}

Múltiples factores ambientales, incluyendo la infección por *Helicobacter pylori*, alta ingesta de sal, compuestos N-nitroso y deficiencia de antioxidantes en la mucosa gástrica, han sido implicados en la iniciación de la carcinogénesis. Estos factores potencialmente disparan cambios genéticos en el epitelio gástrico del huésped, tales como activación de oncogénes, pérdida alélica de genes supresores de tumor e inestabilidad genética, los cuales conducen al desarrollo del cáncer. ³

La IM, es una forma de inestabilidad genómica que fue descrita inicialmente en el CCHSP; desde esto, la IM ha sido reportada en una variedad de cánceres humanos esporádicos y familiares. Los microsatélites son secuencias de ADN repetitivas, cortas y ubicuas, distribuidas al azar a través del genoma humano, con función desconocida. El cáncer gástrico, familiar y esporádico ha mostrado varios niveles de IM (17-59%), los cuales se asocian con mutaciones en los genes de reparación del ADN. ^{1,8}

Con este tipo de estudio se pretenden implementar técnicas moleculares novedosas que ayuden a establecer programas que permitan determinar el origen etiológico y su efecto a nivel clínico en diagnóstico y pronóstico, y si existen mutaciones germinales, identificar en nuestra población familias susceptibles a desarrollar cáncer con mayor probabilidad que la población general., mejorando la sobrevida de los pacientes y brindando un adecuado asesoramiento a las familias que padecen esta enfermedad. Finalmente, se pretende consolidar una línea de investigación en genética y cáncer, contribuyendo con información básica sobre las causas del cáncer en nuestro país.

3. OBJETIVOS

3.1. GENERAL

3.1.1. Evaluar la presencia de Inestabilidad microsatelital (IM) en los pacientes con cáncer gástrico que asistieron al HUHMP entre el 1 de Junio del 2001 al 30 de junio del 2002 , empleando técnicas de biología molecular para establecer la importancia que tiene la vía mutadora en la etiología de esta enfermedad en nuestra región.

3.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS

3.2.1. Identificar pacientes con cáncer gástrico

3.2.2. Amplificar los marcadores D2S123, D5S810, D17S250, BAT-25, BAT-26 y BAT-27 en tejido sano y tumoral de los pacientes a estudio.

3.2.3. Establecer la frecuencia de la IM en los pacientes con cáncer gástrico.

3.2.4. Determinar la relación entre IM y variables como edad de diagnóstico, estadio de la enfermedad al momento del diagnóstico y la presencia de antecedentes personales y familiares con la presencia de IM.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. EPIDEMIOLOGÍA

A nivel mundial el cáncer gástrico es considerado la segunda causa mas frecuente de cáncer y la segunda en mortalidad por esta enfermedad, particularmente en países como China Japón, Costa Rica y Korea, donde la incidencia anual en 1986 fue de 57.9 y 25.1/100.000 en hombres y mujeres respectivamente^{1,9,10}.

En Colombia, según el informe del Instituto Nacional de Cancerología, se estima que anualmente son diagnosticados 25.684 nuevos casos de cáncer en hombres y 35.150 en mujeres, siendo el cáncer gástrico el tercero más común en el sexo femenino, después del de cuello uterino y mama, mientras que en los hombres, ocupa el primer lugar (21/100 mil), seguido por el de próstata. Es por esto, que el cáncer gástrico es foco principal de atención, ya que constituye un problema de salud pública en Colombia donde se consideran como zonas de alto riesgo: Caquetá–Huila–Tolima, Boyacá–Cundinamarca–Meta, Bogotá, Antiguo Caldas, Norte de Santander, Medellín, Pasto y Valle. El Huila es el noveno departamento con mayor frecuencia a nivel nacional, así entre 1990 y el 2.000 han sido diagnosticados 292 casos solamente en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo^{3,11}

Se estima que a nivel nacional aparecen 4.000 nuevos casos anuales de cáncer gástrico, con una mortalidad del 11/100.000. El cáncer gástrico representa la cuarta causa de muerte en el país, solo superada por las defunciones por violencia, infarto agudo de miocardio e insuficiencia cardiaca y es la primera causa de muerte por cáncer en el hombre y la segunda en la mujer^{3,4} En Estados Unidos, según el informe de la Sociedad Americana del cáncer se informaron 21.700 casos de cáncer gástrico en el 2001¹²

Aunque se estima que solo entre el 5 y 10% de todos los adenocarcinomas gástricos son heredados, el factor genético atribuido a su etiología se considera cada vez de una mayor

importancia, gracias a los grandes avances de la Biología molecular durante la pasada década, donde se encontraron diferentes mutaciones involucradas como las presentes en la e-caderina y los genes de Mismatch ¹³.

4.2. CUADRO CLINICO

Los signos y síntomas dependen del estadio clínico y de la localización del tumor. En el carcinoma incipiente pueden ser muy leves o inespecíficos; puede presentarse epigastralgia o síntomas de pirosis, los cuales pueden pasar inadvertidos. En el carcinoma avanzado, los síntomas son más evidentes presentándose epigastralgia severa, pérdida del apetito, pérdida de peso, náuseas, vómito, hematemesis o melenas y deterioro del estado general. ¹⁴

4.3. ETIOLOGIA

4.3.1. Predisposición Genética

El cáncer gástrico es el segundo cáncer más frecuente a nivel mundial y aunque su incidencia ha disminuido, sigue considerándose un problema de salud pública. Los factores dietarios y la infección con *Helicobacter pylori* son probablemente los factores de riesgo medioambientales más importantes, pero la agregación familiar y la alta heterogeneidad tanto morfológica como funcional hacen pensar en un amplio espectro de alteraciones genéticas que podrían conducir a diferentes orígenes etiológicos de la enfermedad como: la Pérdida de Heterocigocidad (PDH), las mutaciones en la proteína e-caderina y la Inestabilidad Microsatelital (IM)^{16,17}

Cáncer Gástrico Familiar

Para definir un síndrome de cáncer gástrico como familiar debe tenerse en cuenta el subtipo histológico cuando hay un patrón de segregación familiar; lo cual puede orientar la identificación del gen y por ende el origen a nivel etiológico de la enfermedad ¹⁷.

a. *Cáncer Gástrico Difuso Familiar (CGDF)*

Se define como un síndrome autosómico dominante que fenotípicamente se caracteriza por ser un cáncer polipoide de tipo difuso que generalmente esta ligado a mutaciones en el gen CDH1 que codifica para la proteína e-caderina. Los criterios clínicos para definir una familia como CGDF son los siguientes:

- ☞ Dos o más casos de cáncer gástrico difuso en primera/segunda generación, donde por lo menos uno haya sido diagnosticado antes de los 50 años de edad¹⁷.
- ☞ Tres o más casos de cáncer gástrico difuso en primera/segunda generación sin importar la edad de diagnóstico

Se considera que aproximadamente el 25% de las familias que cumplen estos criterios tienen mutaciones que inactivan la expresión de la e-caderina.

b. *Cáncer Gástrico Intestinal Familiar (CGIF)*

Los criterios clínicos para definir una familia como CGIF son determinados de acuerdo con la incidencia de este cáncer en la población. Así en países con alta incidencia como Japón y Portugal, se usan los criterios análogos a los criterios de Amsterdam para el Síndrome de Lynch¹⁷.

- ☞ Tres familiares con cáncer gástrico, de los cuales uno tenga relación en primer grado con otro
- ☞ Dos generaciones sucesivas afectadas con cáncer gástrico
- ☞ Un cáncer gástrico diagnosticado antes de los 50 años

En países con baja incidencia como USA y UK se define:

- ☞ Dos o más casos de cáncer gástrico difuso en primera/segunda generación, donde por lo menos uno haya sido diagnosticado antes de los 50 años de edad.
- ☞ Tres o más casos de cáncer gástrico difuso en primera/segunda generación sin importar la edad de diagnóstico

c. Cáncer Gástrico por CCHSP tipo II

El cáncer gástrico hace parte del fenotipo característico de las familias con Cáncer Colorectal Heredado Sin Poliposis CCHSP, Poliposis Adenomatosa Familiar PAF y el Síndrome de Peutz-Jegher, aunque los dos últimos no son muy frecuentes¹⁷.

El Cáncer Gástrico ha sido identificado como parte del amplio espectro de cánceres en el CCHSP. La primera familia descrita con CCHSP “La familia G”, tenía una amplia historia de cáncer gástrico, sin embargo al evaluar el riesgo de este cáncer en la familia se observó que tendía a disminuir¹⁸. El primer informe de una familia con riesgo de cáncer gástrico fue hecho por Vasen y col en 1.996, pero este no tenía la información suficiente a nivel histológico para realizar las conclusiones pertinentes¹⁹. El estudio más detallado de cáncer gástrico en CCHSP fue hecho por Aarnio y col en 1.997; el cual incluye 51 familias con mutaciones en los genes MLH1 o MSH2 o que cumplen los criterios de Amsterdam, de las cuales 62 personas tenían cáncer gástrico²⁰.

4.3.2. Infección por *Helicobacter pylori*

En la actualidad, la relación entre *H. pylori* (H.p) y carcinoma gástrico no se ha definido entre si el H.p es el que promueve la carcinogénesis en la mucosa gástrica o si la infección simplemente causa gastritis y metaplasia intestinal, haciendo a la mucosa susceptible a la instauración del carcinoma gástrico²¹

4.3.3. Factores Dietarios

Numerosos investigadores han postulado que la dieta podría ser el factor principal en la etiología del carcinoma gástrico. Una dieta de alto riesgo es la que contiene una escasa cantidad de grasa y proteínas animales, una alta cantidad de carbohidratos complejos, cereales en granos y tubérculos, pocos vegetales de hoja y frutas frescas y mucha sal²². Sin duda la incidencia es alta en los pacientes que abusan del consumo del tabaco y el alcohol.²³

4.4. GENÉTICA DEL CÁNCER GÁSTRICO

4.4.1. Mutación en el gen de la e-caderina

Las caderinas son una superfamilia de glicoproteínas transmembranales que median la adhesión entre células dependientes de calcio y son expresadas por todas las células que forman tejidos sólidos, pero de acuerdo con su localización se denotan de forma diferente, así la e-caderina está presente en el epitelio intestinal y la N-caderina, en el tejido neuronal.

Las caderinas, se encuentran organizadas en estructuras de unión llamadas *uniones adherentes* que permiten la comunicación entre células; se encuentran asociadas en procesos de regulación de la morfogénesis, en la diferenciación de líneas durante la embriogénesis, el establecimiento de polaridad celular y el mantenimiento de la morfología y diferenciación celular. ^{24,25}

La e-caderina tiene la capacidad de formar complejos intracelulares con las β -cateninas y las α -cateninas para formar complejos con las tubulinas y el citoesqueleto de actina y a la vez activar la vía de señalización que permite la formación de las uniones adherentes. ^{24,25}

Cuando existen mutaciones en la e-caderina, que impiden la unión con la β -catenina; esta se mantiene fosforilada en mayor número, quedando activa para pasar a la membrana nuclear y activar el factor de transcripción ***TCF-4*** (*Factor de crecimiento Tumoral*) que estimula de transcripción de los oncogenes ***c-myc*** y ***c-jun***, entre otros, acelerando procesos de división celular, estimulando el desarrollo del cáncer y disminuyendo la capacidad de adhesión, por tal motivo se considera un regulador de la β -catenina. La e-caderina además de estas dos funciones, puede formar complejos citoplasmáticos con APC. ^{24,25}

4.4.2. Vía Mutadora

En esta vía se observa ausencia de mutación en los genes tumorales comunes y acumulación de numerosas mutaciones en microsatélites constituidos principalmente por polidesoxiadenosinas. La acumulación de estas mutaciones tiene consecuencias

significativas para la estructura y función del genoma; ellas pueden alterar la organización de la cromatina e inducir cambios en la estructura del nucleosoma o modificar el patrón de expresión génica por alteración de los potenciadores y/o promotores del gen. ²⁶

La inestabilidad genómica en los microsatélites se explicó al identificar mutaciones en los genes de reparación del ADN a las cuales, Larry Loeb denominó *Mutaciones del Fenotipo Mutador* (MFM). Las MFM identificadas, se localizan en los cromosomas 2q15-16 y 3p21, donde se ubican los genes hMSH2 y hMLH1. Estas mutaciones a su vez inducen nuevas mutaciones como la inactivación del gen *BAX* que regula la apoptosis; ya que este gen tiene una secuencia de ocho desoxiuanosinas la cual sufre adiciones o deleciones. ²⁶

La expresión del gen **hMLH1** ubicado en 3p21 es esencial para el mantenimiento de la estabilidad de los microsatélites y el funcionamiento del sistema de reparación que además de iniciar todo el proceso, aparentemente interviene en la regulación de los puntos de control en las fases G₁, M y G₂ del ciclo celular, la segregación y la formación de quiasmas durante la meiosis. Los genes **hMLH1** y **hMSH2** se expresan durante todo el ciclo celular. Los productos de los genes MLH y MSH dan origen a dos incisiones en el ADN que contiene la

base mal apareada y no metilada, luego el gen *uvrB* elimina el fragmento abriendo un espacio de una kilobase como mínimo. Posteriormente la ADN polimerasa llena dicho espacio polimerizando los nucleótidos correctos y finalmente actúa la ADN ligasa ²⁷⁻²⁹.

4.5. INESTABILIDAD MICROSATELITAL

Los microsatélites o STR (Short Tandem Repeat) son pequeñas secuencias de ADN que se repiten en tandas, las cuales son bastante polimórficas fueron involucradas en 1990 en un nuevo mecanismo de tumorigénesis descubierto por Investigadores de Estados Unidos y Finlandia (Aaltone et al 1.993) ⁸ en pacientes con HNPCC, a la cual se le definió como Inestabilidad Microsatelital (IM). Esta inestabilidad ocurre cuando un nuevo alelo es detectado en el tejido tumoral y esta ausente en el tejido normal de la misma persona. Se

observa en el 90 a 95% de los tumores de pacientes con HNPCC y en una serie de tumores esporádicos incluyendo los de CCR (7-20%), gástrico (17 a 59%) y endométrio (10-25%).^{30,31}

La inestabilidad Microsatelital ha sido hallada como consecuencia de mutaciones en cinco de los genes del sistema de reparación metil dirigido o Mismatch (MLH1, MSH2, MSH3, MSH6 y PMS1), la mayoría de pacientes con HNPCC tienen la mutación germinal o somática en MLH1 o MSH2 ³¹. La inactivación de ambos alelos del gen mutado es necesaria para generar el fenotipo inestable. Pero no solo la presencia de mutaciones puede

inactivar estos genes; si no que en un gran número de pacientes se han visto factores epigenéticos involucrados como la hipermetilación de la isla CpG en la región promotora observada en la mayoría de CCR IM positivos pero esporádicos ³²

Molecularmente, la Inestabilidad ocurre cuando se incorpora mal una base, se forman loops en la secuencia microsatelital durante la replicación o cuando el ADN viene disociado desde un principio, estos loops que se forman llevan a inserciones o deleciones en STRs mono, di, tri o tetranucleotídicas.

Un grupo de seis microsatelites fue propuesto en el Work Shop de Inestabilidad Microsatelital en 1998 (D2S123, D17,D5,BAT40, BAT25,BAT26); para definir un paciente como IM Alto (dos o más microsatelites inestables), MI bajo (Un microsatélite inestable) o MI estable (Ningún microsatélite inestable) ^{8,33}

5. METODOLOGÍA

5.1 TIPO DE ESTUDIO

Estudio descriptivo de casos, donde se busco identificar la presencia de IM en los tumores de pacientes con cáncer gástrico que asistieron al Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo, durante el periodo de Junio del 2001 a Junio del 2002.

5.2. VARIABLES

Las variables estudiadas fueron: lugar de procedencia, edad de diagnóstico, antecedentes personales de neoplasia, antecedentes familiares de neoplasia, sexo, presencia de IM, tipo de IM, localización del tumor, tipo histológico, clasificación endoscópica, presencia de patología gástrica previa, estadio y tratamiento quirúrgico.

5.3. EVALUACIÓN CLINICA

Los pacientes son seleccionados previo diagnóstico Histopatológico

5.4. POBLACION DE ESTUDIO

Pacientes con cáncer gástrico que asistieron al Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo, durante el periodo comprendido entre Junio del 2001 a Junio del 2002

5.5. MUESTRA

Teniendo en cuenta que este es un estudio descriptivo de casos no es necesario definir un tamaño muestral.

5.6 PROCEDIMIENTO

IDENTIFICACION DE PACIENTES

Se incluyeron en el estudio 20 pacientes con cáncer gástrico que asistieron a nuestra institución entre Junio del 2001 a Junio del 2002, procedentes del departamento del Huila.

MUESTRAS

La muestra de tumor fue obtenida a partir de bloques de parafina, tumor fresco y biopsia

TIPO DE MUESTRA	
Tejido fresco	9
Bloque de Parafina	2
Biopsia	9

EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ADN a partir de sangre periférica se realizó utilizando el kit comercial Wizard de promega y el ADN de tejido se obtuvo con fenol cloroformo, empleando los siguientes protocolos:

Extracción Tejido Fresco

1. Colocar una muestra (*del tamaño de un confeti*) finamente picada en un eppendorff de 2 ml con 450 μ l de Buffer de digestión (Tris HCl 50mM, NaCl 100 mM), 25 μ l de SDS al 20% y 25 μ l de proteinasa K 20mg/ml.
2. Incubar 12h a 55°C
3. Adicionar $\frac{1}{2}$ V de NaCl 5M y 1V cloroformo - alcohol isoamílico (24:1), agitar por 10 m y centrifugar 10 m a 4.000 r.p.m.
4. Pasar la fase acuosa a un eppendorff nuevo, adicionar 0.6V de Isopropanol y centrifugar 10 m a 12.000 r.p.m
5. Descartar sobrenadante, adicionar 2V de etanol frío al 100% y centrifugar 10 m a 12.000 r.p.m
6. Lavar con etanol al 100% y al 70% y dejar secar y reconstituir en 100 μ l de agua MQ.
7. Incubar 30 m a 37°C
8. Almacenar a 4°C

Extracción Tejido en bloques de parafina

1. Cortar entre 20 y 30 trozos de tejido de 5µm y colocarlos en un eppendorff de 2 ml
2. Adicionar 1 ml de xileno, incubar por 10 m a temperatura ambiente y centrifugar a 10.000 r.p.m por 10 min. Repetir una o dos veces más.
3. Adicionar 1 ml etanol al 100%, incubar por 10 m a temperatura ambiente y centrifugar a 10.000 r.p.m por 10 min. Repetir una vez más.
4. Dejar secar a temperatura ambiente y adicionar 1 ml de buffer de digestión (proteinasas K 0.3 mg/ml, Nacl 100mM, Tris HCL pH8.0 10 mM, EDTA pH 8.0 25mM y SDS 0.5%).
5. Incubar 12 h a 55°C y adicionar 10 µl de proteinasas K 20mg/ml
6. Incubar nuevamente 12 h a 55°C y volver a adicionar 10 µl de proteinasas K 20mg/ml
7. Dejar incubando hasta que se deshaga el tejido (24 a 72h más)
8. Adicionar 500 µl de fenol –cloroformo – alcohol isoamílico (25:24:1)
9. Incubar 10 m a T° ambiente y centrifugar 10 min a 4.000 r.p.m
10. Tomar la fase acuosa, adicionar 500 µl de acetato de amonio y 1 ml de etanol frío al 100%.
11. Centrifugar 20 m a 13.000 r.p.m, descartar sobrenadante y lavar con etanol frío al 100% y 70%.
12. Dejar secar a °T ambiente y reconstituir en 40 µl de agua MQ
13. Incubar 30 m a 37°C y almacenar a 4°C

PCR ANALISIS DE INESTABILIDAD MICROSATELITAL (IM)

Debido a la alta probabilidad de encontrar falsos positivos, se decidió realizar la amplificación de cada uno de los microsatélites de forma independiente. Cuando se encontró IM positiva se repitió el experimento de dos a tres veces de acuerdo con la cantidad de ADN tumoral con el que se contaba.

Amplificación: Se amplificaron en sangre y tumor los 6 microsatélites establecidos internacionalmente para definir IM. El protocolo de amplificación estandarizado para cada microsatelite es el siguiente (volumen por tubo):

	Conc	BAT25	BAT26	BAT40	D17S250	D2S123	D5S346	Tetra
Agua MQ		13.5	14.5	15.5	15.5	13.5	14.5	19.7
Buffer	10x	2	2	2	2	2	2	2.25
MgCl ₂	25mM	2	1.0	1.0	1.0	2	1.0	0.25
dNTPs	2mM	2	2	2	2	2	2	1.25
Primer CY5	50pM	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.208
Primer R	50pM	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.20.8
Taq pol	5U/μl	0.0.5	0.0.5	0.0.5	0.0.5	0.0.5	0.0.5	0.0.5
Vol total	20	20	20	20	20	20	20	24
ADN Sangre	3	3	3	3	3	3	3	3
ADN tumor	10	10	10	10	10	10	10	10

El programa de termociclador es:

94 °C	2 min	} 35 ciclos
94 °C	1 min	
60 °C	1 seg	
70 °C	1 seg	
70 °C	10 min	

Posteriormente, se realiza una electroforesis en un gel denaturante de poliacrilamida al 8% preparado comercialmente (*Reprogel High Resolución de Pharmacia Biotech*), donde se corren 40 muestras. Los microsatelites BAT-26 y D17S250, D2S123 y BAT-25 del mismo paciente y tipo de tejido, se mezclan post PCR para aumentar el número de análisis por corrida electroforetica.

La electroforesis y el análisis de los fragmentos se realizó con un secuenciador Automático ALFexpress 2.0 de Amershan Pharmacia.

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se obtuvieron muestras de 20 pacientes de los cuales, 13 son hombres y siete mujeres, 13 del área urbana y siete del área rural, procedentes de los municipios de Neiva (siete pacientes), Iquira (tres pacientes), Palermo (tres pacientes), Aipe (dos pacientes) y Rivera, Garzón, Vegalarga, Algeciras y la Plata con un paciente. El promedio de edad fue de 57.5 años, con un rango entre los 24 hasta los 77 años.

Cuatro de los 20 pacientes tienen algún antecedente familiar de neoplasia, lo cual equivale al 20% y un paciente tuvo antecedentes de adenocarcinoma prostático (estadio C) diagnosticado un año y medio antes.

Todos los pacientes fueron diagnosticados en estadio avanzado (compromiso más allá de la muscular), debido a múltiples factores como: la falta de definición del cuadro clínico, la consulta tardía de los pacientes y las dificultades logísticas para la solicitud de exámenes en este tipo de instituciones.

Según el diagnóstico endoscópico, se encontraron los siguientes resultados: Borrman I (tres pacientes), Borrman II no se presentaron casos, Borrman III (13 pacientes), Borrman IV (dos pacientes) y Borrman V (dos pacientes), confirmado el diagnóstico de cáncer gástrico en nuestro medio de forma tardía.

El estadio diagnóstico (clasificación TNM), fue:

- Estadio II 1 paciente
- Estadio IIIA 3 pacientes
- Estadio IIIB 8 pacientes
- Estadio IV 8 pacientes

El sitio donde se ha localizado el tumor fue:

- Cuerpo 5 pacientes
- Antro 4 pacientes
- Cardias 2 pacientes
- Unión gastroesofágica 1 paciente
- Cardias y cuerpo 3 pacientes
- Antro y cuerpo 2 pacientes
- Antro, cardias y cuerpo 2 pacientes

Los más frecuentes, fueron los de la zona proximal, lo que está de acuerdo con el incremento en los últimos años del cáncer en esta localización según la literatura por causas aún no definidas.

Sólo un paciente, había presentado patología gástrica previa diagnosticada como úlcera gástrica por endoscopia e histología, tres años antes de la presentación del cáncer gástrico.

Los procedimientos quirúrgicos realizados, fueron los siguientes:

- Gastrectomía total más Y de Roux 10 pacientes
- Gastrectomía subtotal más Y de Roux 1 paciente
- Gastrectomía subtotal más Billroth II 1 paciente
- Tumor irresecable 6 pacientes
- Tumor inoperable 1 paciente
- Laparotomía más parche epiploon más drenaje de peritonitis 1 paciente

Es de anotar que hay una gran cantidad de pacientes a los cuales no se les puede ofrecer ningún tratamiento quirúrgico por su estadio avanzado de enfermedad.

Se encontraron tres pacientes con IM alta (15%) y dos pacientes con IM baja (10%). Un solo paciente con antecedente personal de neoplasia.

PACIENTE	1	2	3	4	5
<i>BAT-25</i>	<u>IM</u>	E	E	E	E
<i>BAT-26</i>	<u>IM</u>	E	E	E	<u>IM</u>
<i>BAT-40</i>	<u>IM</u>	E	E	E	E
<i>D2S123</i>	<u>IM</u>	<u>IM</u>	E	E	E
<i>D17S250</i>	E	<u>IM</u>	E	<u>IM</u>	E
<i>D5S346</i>	E	E	<u>IM</u>	E	<u>IM</u>

Tres pacientes tuvieron tipo difuso (dos con IM alta) y dos pacientes tipo intestinal (uno con IM alta).

Tres se encontraron en estadio IIIB (dos con IM alta) y dos en estadio IV (uno con IM alta).

Uno de los pacientes de 29 años con antecedentes familiares de cáncer gástrico, hígado y pulmón por su árbol genealógico, no presento IM, esto nos hace suponer que debe existir algún factor genético predisponente diferente al de mutaciones germinales o somáticas (como evento secundario) del sistema de reparación Mismatch .

A pesar de que el cáncer gástrico es una enfermedad frecuente, hasta el momento no han sido definidos los marcadores moleculares que permitan entender completamente el desarrollo del tumor ni desarrollar metodologías que permitan hacer el diagnóstico en estadios avanzados y aunque la IM hallada, ha sido asociada por algunos estudios dentro del proceso de tumorigénesis como un evento inicial en la progresión del cáncer, hasta el momento no ha sido del todo definida su importancia biológica ni sus implicaciones clínicas en el cancer gástrico.

CONCLUSIONES

- El cáncer gástrico sigue siendo una enfermedad de alta presentación en nuestro medio, encontrándose aproximadamente 5 casos por mes en el año 2002, similar al comportamiento entre 1990 al 2000 donde se presentaron en promedio 3 casos por mes.¹¹
- El cáncer gástrico es de diagnóstico en estadios tardíos en nuestro medio, por las dificultades logísticas para su diagnóstico clínico y por la consulta tardía de los pacientes que en un buen porcentaje son procedentes de áreas rurales.
- La frecuencia de inestabilidad microsatelital en nuestro estudio hasta el momento es del 25% (5/20 pacientes analizados), porcentaje similar a la informado en la literatura mundial.

BIBLIOGRAFIA

1. Leung W, Kim J, Kim J y cols. Microsatellite Instability in Gastric Intestinal Metaplasia in Patients with and Without Gastric Cancer. *A. J Path* 156(2) 2.000: 537-43.
2. Chong J, Fukayama M, Hayashi Y. Microsatellite Instability in the Progressión of Gastric Carcinoma. *Can Research* 54(1994):4595-7.
3. Instituto Nacional de Cancerología. Informe Epidemiológico 2002. Datos aún no editados.
4. Patiño J. Cáncer gástrico en LECCIONES DE CIRUGÍA. Patiño J. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 2000.
5. Halling K, Harper J, Moskaluk C y cols. Origin of Microsatellite Instability in Gastric Cancer. *A. J* 155(1)Path 1.999: 205-11.
6. Inestabilidad Microsatelital en Pacientes con Cáncer Colorrectal Hereditario Sin Poliposis (CCHSP). Montenegro Y, Muñetón C, Ramírez A y cols. Memorias II Congreso Internacional y V Congreso Colombiano de Genética “ Genética en el Siglo XXI: Avances y Desafíos. Universidad Nacional Mayo 2002.
7. Montenegro Y, Ramírez A, Muñetón C, Isaza L, Ramírez J. Comportamiento del Cáncer Colorrectal en Pacientes Menores de Cuarenta Años del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva (HUHMP) y El Hospital Universitario San Vicente de Paúl de Medellín (HUSVP) Entre 1980 y el 2.000. *Rev Colomb Cir*17(1) 2002:10-14
8. Atkin N. Microsatellite Instability. *Cytogenet Cell Genet* 92. 2001:177-81.
9. Leung W, Yu J, Enders K y cols. Concurrent Hypermethylation of Multiple Tumor Related Genes in Gastric Carcinoma and Adjacent Normal Tissues. *CANCER* 91(12) 2001:2294 – 301.
10. Jun Y, Song J, Lee Y y cols. Microsatellite Instability-associated Mutations Asóciate Preferentially with the intestinal Type of Primary Gastric Carcinomas in High – Risk Population. *Canc Research* 56. 1.996:4662-5.
11. Ramírez A. Montenegro Y. Comportamiento del Cáncer Gastrico en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo entre 1.990 y el 2001. Trabajo en evaluación.
12. Greenlec R, Hill Harmon M, Murray T, Thun M. Cancer Statistics, 2001. *CA Cancer J. Clin* 5(11)2001:15-36.

13. Park J, Yang H, Kim W. Report on the First Meeting of Hereditary Gastric Cancer. The International Collaborative Group on Hereditary Gastric Cancer. *J. Nat Cancer Inst* 92(21). 2.000:1781-82.
14. Instituto Nacional de Cancerología. Guías de Práctica Clínica en Enfermedades Neoplásicas. Ministerio de Salud. República de Colombia. Segunda Edición 2001. 170-84.
15. Siewert J, Höfler H, Fink U y cols. Gastric Cancer. *Current Problems In Surgery*. 34(11).1997: 837-938.
16. Habano W, Sugai T, Nakamura S, Uesugi N, Yoshida T y Sasou S. Microsatellite Instability and Mutation of Mitochondrial and Nuclear DNA in Gastric Carcinoma. *Gastroenterology* 118. 2000: 835-41.
17. Caldas C, Carneiro F, Lynch H y cols. Familial Gastric Cancer: Overview and guidelines for management. *J med Genet*. 36. 1999:873-80.
18. Lynch HT, Krush A. Cancer Family "G" revisited:1895 – 1970. *Cancer* 27. 1971: 1505 – 11.
19. Vasen H, Wijnen J, Menko F. Cancer risk in families whit hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. *Gastroenterology* 110. 1.996: 1020 –7.
20. Aarni M, Salovaara R, Aaltonen L y cols. Features of gastric cancer in hereditary nonpolyposis colorectal Syndrome. *Int J. cancer*. 74. 1.997: 551-5.
21. Aoki Teruaki, Takayama S, Nimura H, Tsutsumi J. Effects of Medical Treatment on Gastric Mucosal Abnormalities in Gastroduodenal Ulcer Disease. (*World J. Surg*. 24 (3). 2000: 321-27.
22. Correa P. Carcinoma Of the Stomach. *Proc Nutr Soc*. 46. 1985:111.
23. Rocín Richard: pag 927 en OPERACIONES ABDOMINALES Maingot. Zinner M, Schwartz S, Ellis H. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana,1998
24. Chung C. Daniel. The genetic basis of colorectal cancer: Insights into critical pathway of tumorigenesis. *Gastroenterology* 119(3). 2000: 854-65.
25. Jawhari A, Farthing M and Pignatelli M. The importance of the E-cadherin-catenin complex in the maintenance of the intestinal epithelial homoestasis: more than intercellular glue?. *Gut* 41. 1997: 581-4.
26. Perucho M. Cancer del Fenotipo mutador de Microsaélites. *Inv y Ciencia*. 1998:46-55.

27. Fishel R. Mismatch Repair, Molecular Switches and signal transduction. *Genes & Development* 12. 1.998: 24727-30.
28. Wood R. Nucleotide Excision Repair in Mammalian Cells. *J of Biol Chemistry*. 272(38). 1.997: 23465 – 68.
29. Josef jiricny. Replication errors: challenging the genome. *The EMBO j*. 17(22). 1998: 6427 –6436.
30. Curran B, Lenehan K, Mulcahy H y cols. Replication errors phenotype, clinicopathological variables, and patient outcome in Dukes B satage II (T3, NO, MO) colorectal cancer. *Gut* 46 2.000:200-4.
31. Pyatt R, Chadwick R, Johnson C y cols. Polymorphic variations at BAT-25 and BAT-26 Loci in individuals of African Origin. *Am J of Phatology* 155(2). 1.999: 349-353.
32. Chung D. The Genetic Basis of Colorectal Cancer: Insights into Critical Pathways in colorectal carcinogenesis. *Prot Natl Acad Sci. USA* .94. 1.997: 12122-7.
33. Ward R, Meagher A, tomlinsin I y cols. Microsatellite Instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. *Gut* 48. 2001: 821-9.
34. Fleisher A, Esteller N, Wang S y cols. Hypermethylation of the hMLH1 Gene promoter in Human Gastric Cancers With Micosatellite instability. *Cancer Research* 59.1999:1090 –5.
35. Montenegro Y, Ramírez A, Muñeton C. Cancer Colo-rectal heredado. *RevColomb Cir* 17(1) 2002: 30-6.

DETERMINACION DE INESTABILIDAD MICROSATELITAL EN PACIENTES CON CANCER GASTRICO DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO HERNANDO MONCALEANO PERDOMO

A nivel mundial, el cancer gastrico (CG) es considerado la segunda causa mas frecuente de cancer y la segunda causa de mortalidad por esta enfermedad, particularmente en países como China, Japón y Costa Rica. En Colombia, según el Instituto Nacional de Cancerología, se estima que anualmente son diagnosticados 26.684 nuevos casos de cáncer en hombres y 35.150 en mujeres, siendo el CG el tercero mas común en mujeres, después del de cuello uterino y mama, mientras que en hombres ocupa el primer lugar(21/100mil), seguido por el de próstata; por lo cual se considera un problema de salud publica en Colombia; donde existen zonas de alto riesgo como: Caquetá-Huila-Tolima, Boyacá-Cundinamarca-Meta, Bogota, Antiguo Caldas, Norte de Santander, Medellín, Pasto y Valle. El Huila es el noveno departamento con mayor frecuencia a nivel nacional; así entre 1990 y el 2000 han sido diagnosticados 292 casos solamente en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo(HUHMP).

OBJETIVO: Evaluar la presencia de Inestabilidad Microsatelital(IM) en los pacientes con CG, que asistieron al HUHMP entre el 1 de Junio del 2001 al 30 de Junio del 2002, empleando técnicas de biología molecular, para establecer la importancia que tiene la vía mutadora en la etiología de esta enfermedad en nuestra región.

METODOLOGIA: Es un estudio descriptivo de casos, donde fueron estudiadas las siguientes variables: lugar de procedencia, edad de diagnostico, antecedentes personales de neoplasia, antecedentes familiares de neoplasia, sexo, presencia de IM, tipo de IM, localización del tumor, tipo histológico, clasificación endoscopica, presencia de patología gástrica previa, estadio y tratamiento quirúrgico.

RESULTADOS: Se obtuvieron muestras de 20 pacientes, 13 hombres y 7 mujeres; 13 del área urbana y 7 del área rural, procedentes de los municipios de Neiva(siete pacientes), Iquira(tres pacientes), Palermo(tres pacientes) Aipe(dos pacientes),Rivera, Garzon, Vegalarga, Algeciras y la Plata con un paciente. El promedio de edad fue de 57.5 años, con un rango entre los 24 a 77 años. 20% tenían algún antecedente familiar de neoplasia y un paciente tenia antecedente de adenocarcinoma de próstata. Todos los paciente fueron diagnosticados en estadio avanzado(Compromiso mas allá de la muscular).Se encontraron tres pacientes con IM alta(15%) y dos pacientes con IM baja(10%). Tres pacientes tuvieron tipo histológico difuso (dos con IM alta) y dos pacientes tipo intestinal (uno con IM alta). Tres pacientes se encontraron en estadio IIIB (dos con IM alta) y dos en estadio IV (uno con IM alta).

CONCLUSIONES: El CG sigue siendo una enfermedad de alta presentación en nuestro medio, encontrándose aproximadamente 5 casos por mes en el año 2002, similar al comportamiento entre 1990 al 2000 donde se presentaron en promedio 3 casos por mes. Es de diagnostico en estados tardíos, por las dificultades logísticas para su diagnostico clínico y por la consulta tardía de los pacientes.

La frecuencia de IM en nuestro medio hasta el momento es del 25%, porcentaje similar al informado en la literatura mundial.

DETERMINATION OF INSTABILITY MICROSATELITAL IN PATIENT WITH GASTRIC CANCER OF THE UNIVERSITY HOSPITAL HERNANDO MONCALEANO PERDOMO

At world level, the gastric cancer (CG) the second cause is considered but it frequents of cancer and the second cause of mortality for this illness, particularly in countries like China, Japan and Costa Rica. In Colombia, according to the National Institute of Cancerology, considered that annually 26.684 new cases of cancer are diagnosed in men and 35.150 in women, being the CG the third but common in women, after that of cervix and breast, while in men squatter the first lugar(21/100mil), continued by that of prostate; reason why it is considered a problem of health it publishes in Colombia; where areas of high risk exist like: Caquetá-Huila-Tolima, Boyacá-Cundinamarca-Meta, Bogotá, Old Caldas, North of Santander, Medellín, Pasto and Valle. The Huila is the ninth department with more frequency at national level; this way between 1990 and the 2000, 292 cases have been diagnosed only in the University Hospital Hernando Moncaleano Perdomo(HUHMP). **OBJECTIVE:** Evaluate the presence of Instability Microsatelital(IM) in the patients with CG that attended the HUHMP among June 1 from the 2001 to June 30 the 2002, using technical of molecular biology, the importance that has the way mutadora in the etiology of this illness in our region.

METHODOLOGY: it is a descriptive study of cases, where the following variables were studied: origin place, age of diagnose, personal records of neoplasia, family records of neoplasia, sex, presence of IM, type of IM, localization of the tumor, histological type, endoscopic classification, presence of previous gastric pathology, stadium and surgical treatment.

RESULTS: samples of 20 patients, 13 men and 7 women were obtained; 13 of the urban area and 7 of the rural area, coming from the municipalities of Neiva(seven patient), Iquira(three patien), Palermo(three patient) Aipe(two pacientes),Rivera, Garzon, Vegalarga, Algeciras and La Plata with a patient. The age average was of 57.5 years, with a range among the 24 to 77 years. 20% had some family antecedent of neoplasia and a patient antecedent with of prostate adenocarcinoma. All the patient was diagnosed in stadium avanzado(but there of the muscular)Three patients met with IM alta(15%) and two patients with IM baja(10%). Three patients had diffuse histological type (two with high IM) and two patient intestinal type (one with high IM). Three patients were in stadium IIIB (two with high IM) and two in stadium IV (one with high IM).

CONCLUSIONS: The CG continues being an illness of high presentation in our means, being 5 cases approximately per month in the year 2002, similar to the behavior among 1990 at the 2000 where they were presented 3 cases on the average per month. It is of diagnose in late states, for the logistical difficulties for their diagnose clinical and for the late consultation of the patients.

The frequency of IM in our means until the moment is of 25%, similar percentage to the informed one in the world literature.