

BREVE CURRICULUM VITAE

I – NOME: Álvaro Martins Ferreira Alemão

II – DADOS BIOGRÁFICOS:

Natural do Porto (Paranhos); Nascido a 17 de Março de 1945; Filho de: Daniel Ferreira Alemão, regente agrícola, Açoreano (falecido aos 81 anos) e de Maria Inês Martins Ferreira, doméstica, Açoreana (actualmente com 90 anos de idade);

III – HISTÓRIA DO PERCURSO ESCOLAR

PRÉ-GRADUADO:

- 01 – De 1952 a 1956 – frequentou as escolas primárias do Amial (Porto) e de Gueifães (Maia);
- 02 – De 1956 a 1963 – frequentou o liceu D. Manuel II (Porto);
- 03 – De 1963 a 1969 – estudos universitários (1º ao 4º anos de Faculdade de Medicina do Porto e 5º e 6º anos na Faculdade de Medicina de Lisboa). Enquanto estudante Universitário era também Delegado de Informação Médica de um Laboratório Farmacêutico – (Estudante – trabalhador);
- 04 – Média de Curso – 15 valores.

IV – PREPARAÇÃO POS-GRADUADA:

- 01 – 1970 – ESTÁGIO NOS HOSPITAIS CIVIS DE LISBOA – Estágios nos serviços de: **a)** Cirurgia Geral (6 meses no Hospital de São José – Director: Dr. Ramos Dias); **b)** Medicina Interna (6 meses no Hospital de São José – Director: Prof. Oliveira Machado); **c)** Pediatria (3 meses no Hospital no Hospital D. Estefânia – Director: Dr. Silva Nunes); **d)** Ginecologia/Obstetrícia (3 meses na Maternidade de Stª Bárbara – Hospital de São José – Chefe de Serviço – Dr. Dinis da Fonseca);
- 02 – 1971/72 – estágio no Hôpital Cantonal de Lausanne (Suíça), no serviço de Anestesiologia/Reanimação/Cuidados Intensivos ;
- 03 – 1971 – Aprovação no exame americano do **ECFMG** - Educational Council for Foreign Medical Graduates ;

04 – Em **1972/3/4** – Serviço Militar Obrigatório, com estadia em Moçambique (Tete, Mueda e Nampula)– durante 26 meses, tendo desempenhado funções de **anestesiologista/reanimador, em zona de guerra, com vasta experiência em feridos de guerra ;**

05 – Entre **1974 e 1978**– Internship (1974), em Chicago, e parte do Residence (1975 a 1978), em New York ;

06 – Em **1977 e 1978** – Parte do Internato de Cirurgia Geral, no Hospital de São José, com estágios rotativos, de 6 meses cada, em Neurocirurgia (Hospital de São José – Director: Dr. Vasconcelos Marques), Ortopedia e Traumatologia (Hospital de Curry Cabral – Director: Dr. Azevedo Gomes) e Cirurgia Córdio-Torácica (Hospital de Stª Marta –Director: Prof. Machado Macedo);

07 – Em **1978** – Curso Teórico-Prático de Gastroenterologia na Escuela Profesional de Patologia Digestiva - Universidade Autónoma de Barcelona – Director – Prof. Francisco Vilardell;

08 – De **1978 a 1981** – Assistente Hospitalar de Cirurgia Geral (eventual) no Serviço 4 do Hospital de São José;

09 – **1983** – Estágio no Hôpital La Pitié–Salpêtrière–Paris - Service de Chirurgie Générale – Directeur – professeur J.P. Vayre;

10 – **1985** – Concurso de Provimento para Assistente Hospitalar de Cirurgia Geral da Carreira Médica Hospitalar – Zona Centro;

11 – De **1982 a 1997** – Cirurgião Geral, em regime de clínica privada, no Hospital Clínico das Amoreiras (Lisboa);

12 – Também, de **1983 a 2000**- períodos intercalados de 1,5 meses (três vezes por ano) nas funções de Cirurgião Geral, no Hospital Simão Mendes (na Guiné – Bissau);

13 – **Desde 2001, Início de actividade académica e Hospitalar na UNIVERSIDADE COMPLUTENSE DE MADRID.**

V – TRABALHOS PUBLICADOS:

01 – “PÉPTIDOS HORMONAIIS GASROINTESTINAIS ASPECTOS ESSENCIAIS SOBRE A SUA LOCALIZAÇÃO, LIBERTAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO”, “O Médico”, nº 1811, em 1986;

02 – “SISTEMA ENDÓCRINO DIFUSO E SISTEMA APUD”, “O Médico”, nº 1812, em 1986;

03 – “DOENÇA CÉREBRO-VASCULAR: BASES DIAGNÓSTICAS E OPÇÕES DE TRATAMENTO DA DOENÇA ATEROMATOSA DOS GRANDES VASOS CERVICAIS (EXTRACRANIANOS)”, “O Médico”, nº 1836, em 1986;

04 – “IMPLICAÇÕES CLÍNICAS DA INTEGRAÇÃO NEURO-HORMONAL DO SISTEMA ENDÓCRINO DIFUSO (CÉLULAS APUD)”, “O Médico”, nº 1842, em 1987;

05 – “SISTEMA NEUROENDÓCRINO DIFUSO. Mecanismos fisiológicos e bioquímicos do sistema de células APUD”, “O Médico”, nº 1845, em 1987;

06 – “SISTEMA ENDÓCRINO DIFUSO. Expressão clínico-laboratorial da acção biológica, de alguns péptidos hormonais antroduodenais”, “O Médico”, nº 1848, em 1987;

07 – “Estudo evolutivo do comportamento celular e suas aplicações clínicas”, “O Médico”, nº 1912, em 1988;

08 – “ Transplantação hepática. Condições para a sua realização e definição de morte cerebral ao dador”, “O Médico”, nº 1991, em 1990;

09 – “Transplantação hepática. Operação de recolha do fígado e outros órgãos para transplantações”, “O Médico”, nº 2007, em 1991;

10 – “Transplantação Hepática. Hepatectomia do receptor”, “O Médico”, nº 2010, em 1991;

11 – “Transplantação Hepática. Operação de implantação do fígado dador”, “O Médico”, nº 2010, em 1991;

12 – “REFLUXO GASTROESOFÁGICO E HÉRNIA DO HIATO ESOFÁGICO POR DESLISAMENTO – aspectos fisiopatológicos da JUNÇÃO GASTROESOFÁGICA e suas implicações na terapêutica Cirúrgica”, “O Médico”, nº 1423, em 1978;

13 – “Colestase – abordagem diagnóstica das icterícias de causa cirúrgica”, “O Médico”, nº 125, em 1991.

VI – CONGRESSOS E REUNIÕES

CIENTÍFICAS:

01 - Reunião Internacional de Cirurgia Digestiva, realizado na Faculdade de Medicina do Porto, de 26/29 de Jan. 1977;

02 - IV Curso Internacional de Actualização em Cirurgia do Aparelho Digestivo, realizado na Universidade Complutense (Madrid) de 25/30 de Mai. 1981;

03 - II Reunião Internacional de Patologia Vascular, realizado na Faculdade de Medicina de Coimbra, de 27/29 de Mai. 1980;

04 - I Colóquio Luso-Espanhol de Gastroenterologia-Diagnóstico da Colestase, realizado em Lisboa, de 14/15 de Dez. 1979;

05 - VI Reunião Internacional de Cirurgia Digestiva, realizada na Faculdade de Medicina do Porto, de 25/29 de Jan. 1982;

06 - Simpósio sobre “Farmacoterapia en Cirugía”, no Hospital de la Santa Cruz y S. Pablo, em Barcelona, a 27/28 de Nov. 1981;

07 - IV Reunião Internacional de Patologia Vascular, realizada na Faculdade de Medicina de Coimbra, de 22/24 de Out. 1984;

08 - III Reunião Internacional de Patologia Vascular, realizada na Faculdade de Medicina de Coimbra, de 17/20 de Mai. 1982;

09 - Curso Complementar de Cirurgia, organização do 6º Congresso Mundial do CICD e SPC, realizado em Lisboa, em 15/16 de Set. 1980;

10 - Encontro Internacional de Endocrinologia realizado em Lisboa, em 12/15 de Ou. 1979; 11 - Curso de Pancreatologia para pós-graduados e no Encontro Internacional de Gastroenterologia, realizado em Lisboa, de 18/22 de Jun. 1979;

12 - 6º Congresso Mundial do CICD, realizado em Lisboa, de 16/19 de Set. 1980;

13 - I Reunião Internacional de patologia vascular, realizado na faculdade de medicina de Coimbra, de 16/18 de Out. 1978;

14 - I Jornadas Internacionais de Cirurgia de Urgência, realizado em Lisboa, a 29/30 de Mai. 1987;

15 - III Reunião Internacional de Cirurgia Digestiva, realizado na Faculdade de Medicina do Porto, de 29. Jan. a 02. Fev. De 1979;

16 - I Encontro Internacional de Endocrinologia Ginecológica, realizado no Oura-Hotel, em Praia da Oura, de 10/11 de maio, 1991;

17 - Simposium Internacional sobre esterilidade feminina realizado na Figueira da Foz, a 20/21 de Out. 1978;

18 - III Jornadas Internacionais de Estudos de Reprodução, realizado na Figueira da foz, a 28/29 de Out. 1983;

19 - Curso de Pós-Graduado de Endocrinologia Ginecológica, realizado na Figueira da Foz, a 10 Out. 1986;

20 - I Encontro Internacional de Endocrinologia Ginecológica, realizado no Oura-Hotel na Praia da Oura, em 10/11 de Maio, 1991;

- 21** - Jornadas Internacionais de Estudos de Reprodução, na Figueira da Foz, em 01. Nov. 1981;
- 22** - 1º Simpósio sobre o tratamento do Cancro da Mama, realizado no Estoril, em 10/11 de Abr. 1980;
- 23** - Jornadas Internacionais de Endocrinologia Ginecológica, realizadas na Figueira da Foz, em 08. Nov. 1980;
- 24** - XXIX Curso de Cirurgia Abdominal, no Hospital de la Santa Cruz Y San Pablo, em Barcelona, em Dez. 1980;
- 25** - V Curso Internacional de Actualização em Cirurgia do Aparelho Digestivo, realizado na Universidade Complutense (Madrid), em 24/29. Mai. 1982;
- 26** - Simpósio sobre “Cancer de mama”, realizado no Hospital de la Santa Cruz Y S. Pablo, em Barcelona, a 07/06 de Dez. 1977;
- 27** - Simpósio sobre “Post - operatório”, no Hospital de la Santa Cruz Y S. Pablo, em Barcelona, a 28/29 de Nov. 1980;
- 28** - Simpósio sobre “Pared Abdominal Y Hernias”, no Hospital de la Santa Cruz Y S. Pablo, em Barcelona, a 24/24 de Nov. 1978;
- 29** - Simpósio sobre “Traumatismos Abdominales”, no Hospital de la Santa Cruz Y S. Pablo, em Barcelona, a 30 Nov. e 01 Dez. de 1979;
- 30** - V Reunião Internacional de Cirurgia Digestiva, Faculdade de Medicina do Porto, 30 Jan. 1981;
- 31** - Curso de Hepatologia Clínica para Pós-Graduados, realizado na Universidade Livre de Lisboa, de 07/09 de Jan. 1980;
- 32** - Curso de Patologia Digestiva, na Universidade Autónoma de Barcelona, em Nov. 1978; **33** - 1º Simpósio Internacional de Proctologia, na Faculdade de Medicina do Porto, em 22. Mar. 1980;
- 34** - Sócio da Sociedade das Ciências Médicas de Lisboa, em 27. Maio. 1980;
- 35** - XXVII Curso de Cirurgia Abdominal, no Hospital de la Santa Cruz Y San Pablo, em Barcelona, em Dez. 1978;
- 36** - XII Curso Anual de Cirurgia del Aparato Digestivo, da Faculdade de Medicina de Barcelona, em Nov. 1980;
- 37** - XXVI Curso de Cirurgia Abdominal, no Hospital de la Santa Cruz Y San Pablo, em Barcelona, em Dez. 1977;
- 38** - IV Reunião Internacional de Cirurgia Digestiva, no Hospital de S. João, no Porto, em 01. Fev. 80;
- 39** - XXVIII Curso de Cirurgia Abdominal, no Hospital de la Santa Cruz Y San Pablo, em Barcelona, em Dez. 1979;
- 40** - Jornadas Internacionais de Reprodução, em Espinho, a 3/4. Abr. 1982;
- 41** - XIV Curso Internacional de Actualização – Cirurgia General Y del Aparato Digestivo, na Universidade de Madrid, em 20/25 de Mai. 1991;
- 42** - Miembro Numerario da Asociacion de Cirujanos de Los Cursos del Hospital de La Santa Cruz Y San Pablo, em Barcelona, de 06. Dez. 1979;
- 43** - XI Curso Anual de Cirurgia do Aparelho Digestivo, na Faculdade de Medicina da Universidade de Barcelona, de Nov. 1979;
- 44** - Reunião Internacional de Cirurgia Digestiva, realizado na Faculdade de Medicina do Porto, de 26/29 de Jan. 1977;
- 45** - IV Curso Internacional de Actualização em Cirurgia do Aparelho Digestivo do Aparelho Digestivo, realizado na Universidade Complutense (Madrid), de 25/30 de Mai. 1981;
- 46** - II Reunião Internacional de Patologia Vascolar, realizado na Faculdade de Medicina de Coimbra, de 27/29 de Maio. 1980;
- 47** - I Colóquio Luso-Espanhol de Gastroenterologia-Diagnóstico da Colestase, realizado em Lisboa, de 14/15 de Dez. 1979;
- 48** - “Doenças e Medicações no Idoso”, de Out. 1990;
- 49** - IV Seminário dos Hospitais Distritais subordinados aos temas: tórax e mama, cirurgia vascular, realizado no Hospital Distrital de Setúbal, em 10. Dez. 1984;

VII – GRAUS ACADÉMICOS:

01 - DEA (Diploma de Estudos Avançados – grau de suficiência, como investigador PRINCIPAL) pela **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE de MADRID – 2005** (Mestrado), sobre Factores de Risco e Diagnostico Molecular, de que se destacam as seguintes matérias básicas em oncologia :

1. ALGUNOS CONCEPTOS BÁSICOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR
 - 1.1 LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS DE MAMÍFEROS Y SUS NÚCLEOS
 - 1.2 PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR – PROCESOS CELULARES ESENCIALES Y INTERCONECTADOS
 - 1.3 PROLIFERACIÓN CELULAR
 - 1.4 MUERTE CELULAR
 - 1.5 ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR
 - 1.6 DE CÓMO LAS PROTEINAS DEL CICLO REGULAN LAS FASES DE TRANSICIÓN G0-G1-S

2. DE LA NATURALEZA DE LA ESTRUCTURA DEL GENOMA
 - 2.1 LA COMPLEJIDAD DEL GENOMA
 - 2.2 LA COMPLEJIDAD DE LOS GENOMAS DE LAS BACTERIAS Y DE LOS VIRUS
 - 2.3 LA COMPLEJIDAD DE LOS GENOMAS EUCARIOTAS
 - 2.4 SECUENCIAS DE DNA ACENTUADAMENTE REPETIDAS (FRACCIÓN DE REPETICIÓN ELEVADA)
 - 2.5 SECUENCIAS DE DNA REPETIDO MODERADAMENTE
 - 2.6 SECUENCIAS DE DNA NO REPETIDAS

3. ONCOGENESIS ALGUNOS FACTORES RELACIONADOS
 - 3.1 GENERALIDADES
 - 3.2 FACTORES DE CRECIMIENTO
 - 3.3 RECEPTORES DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO
 - 3.4 TRANSDUCERS DE SEÑAL
 - 3.5 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN
 - 3.6 GENES SUPRESORES DE TUMOR
 - 3.7 GEN RETINOBLASTOMA(RB)
 - 3.8 P53
 - 3.9 INHIBIDORES CDK

4. ALTERACIONES GENÉTICAS EN LA CÉLULA CANCEROSA
 - 4.1 CONSIDERACIONES GENERALES
 - 4.2 MUTACIONES EN LAS CÉLULAS SOMÁTICAS HUMANAS
 - 4.3 MUTACIONES MÚLTIPLES EN LOS TUMORES HUMANOS
 - 4.4 INESTABILIDAD CROMOSÓMICA
 - 4.4.1 *Hibridación genómica comparativa*
 - 4.5 ANEUPLOIDIA
 - 4.6 INESTABILIDAD MICROSATÉLITE
 - 4.7 MUTACIONES SILENCIOSAS Y MÚLTIPLES EN GENES INDIVIDUALES
 - 4.8 EVOLUCIÓN DE UN FENOTIPO MUTANTE DURANTE LA PROGRESIÓN TUMORAL

- 4.9 ORDEN SECUENCIAL DE LAS MUTACIONES EN LA CARCINOGENESIS
- 4.10 EVENTOS INICIALES DE UN FENÓTIPO MUTANTE
- 4.11 GENES DE REPARACIÓN DEL DNA
- 4.12 POLIMERASAS DEL ADN
- 4.13 HELICASAS DEL DNA
- 4.14 OTROS GENES DIANA
- 4.15 CONEXIÓN ENTRE INDUCCIÓN DE MUTACIÓN Y SELECCIÓN CLONAL
- 4.16 CONSECUENCIAS DE UN FENOTIPO MUTANTE
- 4.17 IMPLICACIONES DEL FENOTIPO MUTANTE EN UN CANCER
- 4.18 CONSIDERACIONES GLOBALES

5. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER COLORECTAL

- 5.1 ASPECTOS GENERALES
- 5.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS ESPECÍFICOS

6. MUTAGENIOS EN LA ALIMENTACIÓN HUMANA

- 6.1 MUTAGÉNESIS Y CARCINOGENESIS
- 6.2 AFLATOXINA B1
- 6.3 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (PAH)
- 6.4 N-NITROSAMINAS
- 6.5 AMINAS HETEROCÍCLICAS

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

- 7.1 ASPECTOS GENERALES DE LA EVALUACIÓN DEL RIESGO DE CÁNCER HEREDITARIO: IDENTIFICACIÓN DE PERSONAS COM RIESGO AUMENTADO
- 7.2 CONSTRUCCIÓN DE UN ÁRBOL GENEALÓGICO
- 7.3 ACONSEJAMIENTO GENÉTICO Y TESTS
- 7.4 EL PROCESO DE ACONSEJAMIENTO GENÉTICO
- 7.5 COMPONENTES DEL CONSETIMIENTO INFORMADO
- 7.6 IMPLICACIONES DE UN RESULTADO POSITIVO O NEGATIVO Y POSIBILIDAD DEL TEST A NO SER INFORMATIVO
- 7.7 IMPLICACIONES PSICOLÓGICAS DE LOS RESULTADOS DE LOS TESTS
- 7.8 RIESGOS DE DISCRIMINACIÓN EN EL TRABAJO O EN LOS SISTEMAS DE SEGUROS DE SALUD
- 7.9 CÁNCER DEL COLON HEREDITARIO Y FAMILIAR
- 7.10 SÍNDROMES HEREDITARIOS
- 7.11 SÍNDROMES ENVOLVIENDO A MUTACIONES EN EL GEN APC (ADENOMATOSIS POLYPOSIS COLI)
- 7.12 FAP ATENUADA
- 7.13 POLIMORFISMO DEL GEN APC EN LOS JUDÍOS ASHKENAZI
- 7.14 HNPCC
 - 7.14.1 Aspectos clínicos y test genético para HNPCC
 - 7.14.2 Riesgo de cancer con HNPCC
- 7.15 EDAD JOVEN DEL COMIENZO
- 7.16 TEST DE INSTABILIDAD MICROSATÉLITE

8. HNPCC + FAP

- 8.1 INTRODUCCIÓN
- 8.2 POLIPOSIS ADENOMATOSA FAMILIAR (FAP)

- 8.3 HNPCC (SÍNDROME DE LYNCH)
- 8.4 GENÉTICA MOLECULAR DEL HNPCC
- 8.5 MUTACIONES “FOUNDER” FUNDADORAS
- 8.6 LAS POSIBILIDADES DEL DIAGNÓSTICO DE HNPCC
- 8.7 INCIDENCIA DEL HNPCC
- 8.8 TUMORES EXTRACOLÓNICOS EN EL HNPCC
- 8.9 SÍNDROME MUIR-TORRE
- 8.10 FENOTIPO Y CORRESPONDIENTES MUTACIONES EN EL HNPCC
- 8.11 PATOLOGÍA Y PRONÓSTICO DEL CRC EN EL HNPCC
- 8.12 PATOGENIA EN LAS CRIPTAS ABERRANTES DEL COLON
- 8.13 PREVENCIÓN Y ACTUACIÓN CLÍNICA EN HNPCC
- 8.14 POTENCIALIDADES DE LA COLECTOMIA PROFILÁTICA EN HNPCC Y OTRAS MODALIDADES DE PROFILAXIA
- 8.15 POSIBILIDADES DE EXPERIMENTACIÓN Y MECANISMOS GENÉTICOS EN HNPCC
- 8.16 INFLUENCIA DE LA METILACIÓN EN HNPCC
- 8.17 SILENCIAMIENTO GENÉTICO
- 8.18 DEFICIENCIA DE “REPAIR MISMATCH”
- 8.19 GENES BAJA PENETRACIÓN Y MUTACIÓN I1370K DEL GEN APC 169
- 8.20 EL HNPCC EN LA INVESTIGACIÓN CLÍNICA

9. QUIMIOPREVENCIÓN DEL CÁNCER COLORECTAL.

- 9.1 INTRODUCCIÓN
- 9.2 QUIMIOPREVENCIÓN DEL CÁNCER COLORECTAL POR LA ASPIRINA
- 9.3 EVIDENCIA EXPERIMENTAL DE LA QUIMIOPREVENCIÓN DEL CÁNCER COLORECTAL CON LA ASPIRINA

10. BASES MOLECULARES DE LOS TESTS DE DNA EN LAS HECES EN EL CRC

- 10.1 ORÍGEN DEL CÁNCER HUMANO
- 10.2 EL RIGOR DE LA REPLICACIÓN DEL DNA HUMANO
- 10.3 INESTABILIDAD GENÓMICA EN EL CRC
- 10.4 INESTABILIDAD CROMOSÓMICA Y VÍA SUPRESORA
- 10.5 INESTABILIDAD MICROSATÉLITE Y “FENOTIPO MUTANTE”
- 10.6 FENOTIPO METILADOR DE LAS ILAS CPG Y VÍA METILADORA
- 10.7 SOBREPOSICIÓN ENTRE CIMP Y MSI
- 10.8 VÍAS MÚLTIPLES PARA CRC

11. RASTREO Y DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL CRC

- 11.1 INTRODUCCIÓN
- 11.2 TESTS DE RASTREO DE CÁNCER COLORECTAL TRADICIONALES
 - 11.2.1 – *Test de sangre oculta en las heces*
 - 11.2.2 – *Enema de bario con doble contraste*
 - 11.2.3 – *Visualización directa sigmoidoscopia y colonoscopia*
 - 11.2.3.1 – *Sigmoidoscopia flexible*
 - 11.2.3.2 – *Colonoscopia*
- 11.3 – ANÁLISIS DEL DNA DE LAS HECES

12. DIANAS GENÉTICAS MÚLTIPLES EN EL DNA DE LAS HECES

- 12.1 INTRODUCCIÓN
- 12.2 TESTES DEL DNA FECAL
- 12.3 ESTUDIOS CLÍNICOS MUESTRAN LA EVOLUCIÓN DEL TEST

- 12.4 REFINAMIENTO DE TECNOLOGÍA
- 12.5 EL RASTREO ES POCO UTILIZADO
- 12.6 LA BASE MOLECULAR DEL TEST DE HECES
- 12.7 ENSAYOS CLÍNICOS CON TESTES DE DNA EN LAS HECES
- 12.8 PACIENTES CON RESULTADO POSITIVO

13. POSIBILIDADES DE CREACIÓN Y EL POTENCIAL DE UN INSTRUMENTO DE ENCUESTA PARA EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DE CÁNCER DE COLON Y RECTO

02 — TESE DE DOUTORAMENTO – COM A CLASSIFICAÇÃO DE VINTE VALORES COM DISTINÇÃO E LOUVOR, POR UNANIMIDADE, PELA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID – EM 15 DE MARCO DE 2007, SOBRE CANCRO COLORECTAL, INTITULADA :

RIBOGRAMA: CONCEPTO Y APLICACIONES EN LA CLÍNICA ONCOLÓGICA DE COLON Y RECTO.

Este novo metodo, nao invasivo, único a nivel da comunidade científica mundial, permitirá o DIAGNOSTICO y RASTREO NO INVASIVO DEL CANCER COLORECTAL (CCR).

Da TESE de DOUTORAMENTO, destaca-se apenas o índice de matérias abordadas, como meio de saber-se qual o teor de matérias abordadas em termos de novidade científica:

- 1.1 Una perspectiva en la biología de las células malignas
- 1.2 Acumulación de ribosomas en el proceso de oncogénesis
- 1.3 Aplicaciones biomédicas potenciales resultantes del conteo de los ribosomas
- 1.4 El nucléolo

VISIÓN GENERAL SOBRE EL CÁNCER COLORRECTAL (CCR) ALGUNOS ASPECTOS ESTADÍSTICOS Y EPIDEMIOLÓGICOS DEL CCR FACTORES DE RIESGO

- 4.1 La alimentación, hábitos y estilos de vida
 - 4.1.1 La comida cocinada
 - 4.1.2 Actividad mutagénica, mecanismos de acción sobre el ADN y riesgo de cáncer
 - 4.1.3 Cuestiones básicas
 - 4.1.4 Descansillos para el cáncer
 - 4.1.5 Bioactivación
 - 4.1.6 Mecanismos del ADN
 - 4.1.7 Detección de ADN ADUCTS
 - 4.1.8 Efecto de las “dosis” bajas
 - 4.1.9 Aspecto de un ADDUCTO
 - 4.1.10 Reparación del ADN
 - 4.1.11 Mutágenos alimentarios y el riesgo de cáncer
 - 4.1.12 Riesgo y dosis
 - 4.1.13 Grado del riesgo
 - 4.1.14 Biomarcadores y mutagenios en la alimentación humana
 - 4.1.15 Mutagénesis y carcinogénesis
 - 4.1.16 Aflatoxina B1

- 4.1.17 Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH-polycyclic aromatic hydrocarbons)
- 4.1.18 N-Nitrosaminas
- 4.1.19 Aminas heterocíclicas
- 4.2 Factores de riesgo hereditario
 - 4.2.1 Historia familiar e identificación en la susceptibilidad hereditaria del cáncer
 - 4.2.2.1 Identificación de personas con riesgo aumentado
 - 4.2.2.2 Construcción de un árbol genealógico
 - 4.2.3 Consejo genético y tests
 - 4.2.4 Cáncer colorrectal heredofamiliar
 - 4.2.5 Síndromes hereditarios
 - 4.2.6 Síndromes envolviendo a mutaciones en el gen APC (Adenomatosis Polyposis Coli)
 - 4.2.6.1 Aspectos clínicos y test genético para HNPCC
 - 4.2.6.2 Riesgo de cáncer en HNPCC
 - 4.2.7 Test de inestabilidad microsatélite

ABORDAJE DEL DIAGNÓSTICO Y RASTREO DEL CÁNCER COLORRECTAL ANTES DE LA ERA DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR

- 5.1 Tests tradicionales de rastreo y diagnóstico del cáncer colorrectal
- 5.2 Estudio por visualización directa
 - 5.2.1 Sigmoidoscopia
 - 5.2.2 Sigmoidoscopia y sangre oculta en las heces (SOH)
 - 5.2.3 Colonoscopia
 - 5.2.4 Test de sangre oculta en las heces
 - 5.2.5 Enema de bario con doble contraste
- 5.3 Estadiage del cáncer colorrectal
 - 5.3.1 Sistema AJCC/TNM:
 - 5.3.1.1 Categorías T de cáncer colorrectal
 - 5.3.1.2 Categorías N de cáncer colorrectal
 - 5.3.1.3 Categorías M de cáncer colorrectal:
 - 5.3.1.4 Agrupamiento de etapas
 - 5.3.2 Clasificación de Dukes
 - 5.3.3 Clasificación de Astler y Collier:

EL CÁNCER COLORRECTAL EN LA ERA DE LA BIOLOGÍA Y LA GENÉTICA MOLECULAR

- 6.1 Bases moleculares de los tests de ADN en las heces en el CCR
- 6.2 Origen del cáncer humano
- 6.3 El rigor de la replicación del ADN humano
- 6.4 Inestabilidad genómica en el CCR
- 6.5 Inestabilidad cromosómica y vía supresora
- 6.6 Inestabilidad microsatélite y "fenotipo mutante"
- 6.7 Fenotipo metilador de las islas CpG y vía metiladora
- 6.8 Sobre posición entre CIMP y MSI
- 6.9 Vías múltiples para CCR
- 6.10 Dianas genéticas múltiples en el ADN de las heces
- 6.11 Estudios clínicos sobre la evolución del test ADN en las heces
- 6.12 Grado de adherencia al test
- 6.13 Pacientes con resultado positivo
- 6.14 Prevención
 - 6.14.1 Prevención primaria
 - 6.14.2 Prevención secundaria

ALGUNOS CONCEPTOS BÁSICOS DE BIOLOGÍA CELULAR MOLECULAR

- 7.1 La célula
- 7.2 Estructura General de la Célula
 - 7.2.1 La membrana celular
 - 7.2.2 Citoplasma
 - 7.2.3 Organelos celulares
- 7.3 Estructura y función de las células de mamíferos y sus núcleos
- 7.4 Proliferación y muerte celular – procesos celulares esenciales y interconectados
- 7.5 Muerte celular
- 7.6 Ciclo celular
 - 7.6.1 Fases del ciclo celular
 - 7.6.2 Análisis del ciclo celular
 - 7.6.3 G₀, G₁ y Punto de Restricción
 - 7.6.4 Proteínas que regulan la fase de transición G₀-G₁-S en el ciclo celular
- 7.7 Proliferación celular
- 7.8 Expresión de la información genética
- 7.9 Ribosomas
 - 7.9.1 Composición y estructura de los ribosomas
 - 7.9.2 Ribosomas libres y adheridos a sistemas vesículo-membranosos
 - 7.9.3 Estructura ribosomal procarionte
 - 7.9.4 Estructura ribosomal eucarionte
 - 7.9.5 Proteínas ribosomales
- 7.10 Traducción de mensajes del núcleo celular
 - 7.10.1 Mecanismo de la síntesis de proteínas y su distribución en la célula
 - 7.10.2 Código genético
 - 7.10.3 Esquema de la síntesis proteica
 - 7.10.4 Pasos de la síntesis proteica
 - 7.10.5 Modificaciones tras la síntesis
- 7.11 Modificaciones del ARN mensajero
- 7.12 Mecanismos de transducción de señal
- 7.13 Condiciones estructurales para la exportación de proteínas
- 7.14 Tipos de señales
- 7.15 Destino de las proteínas

ABORDAJE BIOMOLECULAR DE LA MUCOSA COLORRECTAL

- 8.1 Aspectos históricos de la radio autografía
- 8.2 Organización general del epitelio del tubo digestivo
- 8.3 Líneas de células en el colon
- 8.4 Línea de células vacuolo-columnar
- 8.5 Línea de células “goblet”
- 8.6 Líneas de células secretoras de la cripta profunda
- 8.7 Líneas celulares enteroendocrinas
 - 8.7.1 Células pre-enteroendocrinas
 - 8.7.2 Células enteroendocrinas
- 8.8 Líneas de células “caveolated”
 - 8.8.1 Células “pre-caveolated”
 - 8.8.2 Células “caveolated”
- 8.9 Características fenotípicas del contenido de una célula según el grupo poblacional al que pertenece

- 8.10 Renovación y jerarquía celular del epitelio del tubo digestivo (origen, diferenciación y destino)
- 8.11 Criptas y vellosidades del epitelio del tubo digestivo
 - 8.11.1 Células columnares del epitelio del aparato digestivo
 - 8.11.2 Migración de las células columnares
 - 8.11.3 "Stem cells"
 - 8.11.4 "STEM CELLS" del epitelio del tubo digestivo
- 8.12 Naturaleza y número de ribosomas en las células de los mamíferos
- 8.13 Principios de biología molecular de la célula cancerosa
 - 8.13.1 Control de la síntesis proteica
- 8.14 Biogénesis de los ribosomas y contenido celular de ARN
- 8.15 Contenido de ribosomas en células atípicas. La hipótesis de creación de un RIBOGRAMA

ESTUDIO DE CASO

OBJETIVOS

MATERIAL Y MÉTODOS

RESULTADOS

DISCUSIÓN

- 12.1 Acumulación de ribosomas en el proceso de oncogénesis. Ribograma
- 12.2 Biogénesis de los ribosomas
- 12.3 Consideraciones teóricas sobre una curva gráfica de RIBOGRAMA
- 12.4 Características de la malignidad versus conteo de ribosomas libres.

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

- 15.1 TABLA 1 (ORGANELOS CELULARES)
- 15.2 CUADROS DE RIBOSOMAS LIBRES
- 15.3 TÉCNICAS Y MÉTODOS PARA AISLAMIENTO DE LOS RIBOSOMAS LIBRES
 - 15.3.1 Cosecha de heces
 - 15.3.2 Células exfoliadas del colon
 - 15.3.2.1 Colonocitos exfoliados
 - 15.3.2.2 Fraccionamiento subcelular
 - 15.3.2.3 Homogenización
 - 15.3.2.4 Técnicas de rotura de células y tejidos
 - 15.3.2.5 Centrifuga
 - 15.3.2.6 Centrifugación
 - 15.3.2.7 Velocidad de sedimentación
 - 15.3.2.8 Centrifugación diferencial
 - 15.3.2.9 Equilibrio de sedimentación
 - 15.3.2.10 Preparación de ribosomas
 - 15.4 Técnicas de marcación fluorescente de ribosomas
 - 15.4.1 (transcripción de artículo original de la bibliografía en idioma inglés):
 - 15.4.2 COMUNICACIÓN / NEGOCIACIÓN ENTRE EL AUTOR DE ESTA TESIS Y LA EMPRESA INVITROGEN (LABORATORIO MULTINACIONAL EXPERTO EN FABRICACIÓN POR MEDIDA DE INMUNOCONJUGADOS DE PARTÍCULAS –RIBOSOMAS LIBRES –PARA ESTUDIO DE CONTEO)
 - 15.4.3 RESPUESTA DE INVITROGEN
 - 15.4.4 POTENCIALIDADES DE ELABORACIÓN DE INMUNOCONJUGADOS FLUORESCENTES PARA UTILIZACIÓN EN CITOMETRÍA DE FLUJO (INVITROGEN)
 - 15.4.5 NANOTECNOLOGÍA

15.5 TÉCNICAS Y MÉTODOS PARA CONTEO DE RIBOSOMAS LIBRES. "FLOW CYTOMETRY" (CFM)

15.5.1 Citometría de flujo: instrumento para la investigación básica y la aplicación clínica

15.5.2 Conceptos sobre inmunofluorescencia con utilidad en la citometria de flujo

15.5.3 Parámetros que se pueden analizar por citometria de flujo

15.5.4 La citometria de flujo y la inmunofenotipificacion

15.5.5 APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO A LA INVESTIGACIÓN BÁSICA

15.5.6 Análisis secuencial

15.5.7 CITOMETRÍA DE FLUJO Y VIH

15.5.8 LA CITOMETRÍA DE FLUJO E EL FUTURA EN LA INVESTIGACIÓN CLÍNICA ONCOLÓGICA

15.5.9 FABRICANTES DE APARATOS DE CONTEO DE PARTICULAS

VIII – PROYECTO EM CURSO :

2008

CRIACAO E COORDENACAO de PROYECTO DE POST-DOUTORAMENTO:

Proyecto europeo de creacao de:

UN NUEVO METODO DE DIAGNOSTICO y RASTREO NO INVASIVO DEL CANCER COLORECTAL (CCR)

PROYECTO DE APLICACION EN LA PRATICA CLINICA

**RIBOGRAMA: CONCEPTO Y APLICACIONES EN LA CLÍNICA ONCOLÓGICA DE COLON Y RECTO
AUTOR: **A. FERREIRA ALEMAO MD, PhD****

(Doctorado por la UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID)

ABSTRACT

*El objetivo del presente trabajo de investigación, que ha sido presentado, como TESIS DOCTORAL, en la **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**, con el título enunciado, es el siguiente:*

*La elaboración fundamentada, con técnicas y conceptos actuales de Biología Molecular, de un método de diagnóstico, rastreo y seguimiento de la enfermedad oncológica del colon y recto. Este método permite el diagnóstico "pre-carcinoma in situ" dado que se basa en el fenotipo de las células de la mucosa constituido por las cantidades muy elevadas de **ribosomas libres** en su citoplasma, que se pueden cuantificar por medio de la Citometría de Flujo, después de su aislamiento y marcados con fluorocromos. Los registros sucesivos de esas cantidades de ribosomas libres constituyen una curva gráfica que representa la tendencia de malignización, que por encima de un cierto nivel de concentración permite*

afirmar que las células de un tejido (del colon y recto p. ej.) se pueden considerar que están en un proceso de desarrollo de carcinoma en la mucosa colo-rectal, antes de cualquier visualización macroscópica (endoscopia). O sea, estamos ante un método nuevo, a nivel biomolecular, evidente, como se demuestra en esta TESIS, que permite una buena antelación sobre la macroscopía (endoscopia).

Este método sobrepasa el ámbito de otros métodos no invasivos del colon-recto (teste de sangre oculta en las heces y teste de las mutaciones del ADN en las mismas heces, el último de los cuales comenzó a practicarse clínicamente hace poco más de un año en los EE. UU. de América y en Europa al presente apenas en sus inicios).

Merced a este método es posible un programa de rastreo (por método no invasivo con gran adhesión de la población), por el cual todos los ciudadanos con elevación significativa de la curva de RIBOGRAMA deben ser chequeados obligatoriamente con una endoscopia diagnóstico-terapéutica y al mismo tiempo permanecer bajo observación y terapia (dieta post encuesta alimentaria y antiinflamatorios no esteroides y ácido acetilsalicílico), con demostrada eficacia en la prevención y disminución de la tendencia a la formación de pólipos o lesiones premalignas, con lo que ello representa de ahorro en la inversión terapéutica del cáncer.

A. FERREIRA ALEMAO, **MD, PhD**

Doctorado por la UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CANCER COLORECTAL

Statistics

- In Europe colorectal cancer (cancer of the colon and rectum) is the most common form of all the cancers.
- Each year over 200,000 citizens in Europe die from colorectal cancer (nearly two thirds of all cases diagnosed).
- Colorectal cancer is the third most common cancer worldwide.
- Yet this disease is preventable in most cases and highly treatable if diagnosed in its early stages.

1.1 Una perspectiva en la biología de las células malignas

Varias líneas de evidencia, algunas bien establecidas y recientes, sostienen acentuadamente la idea de que el contenido de ARN es elevado en las células cancerosas y que los eventos genéticos que llevan al cáncer están frecuentemente ligados, directa o indirectamente, a la biogénesis de los ribosomas (178,179). Por otro lado, el problema inverso se verifica en los casos de “anemia ineficaz idiopática” (IIE – idiopathic ineffective erythropoiesis), en que existen tasas insuficientes de proliferación celular, y los pacientes tienen eritroblastos que contienen solamente 70% de los niveles normales de ARNr (185). Entonces, en una situación de exceso de proliferación celular (cánceres agresivos) los niveles de ARNr están amplificados, mientras en una situación de proliferación celular insuficiente (ciertas anemias por hipoplasia medular) los niveles de ARNr están deprimidos.

Se han desarrollado investigaciones por oncobiólogos que han demostrado que la expresión de las alteraciones de ADNr (ácido desoxiribonucleico ribosómico) y de los genes de las proteínas ribosómicas están asociadas con el desarrollo de tumores, así como varios estudios citológicos evidencian que los nucleolos de las células cancerosas están aumentados porque tienen una actividad transcripcional aumentada, representando aspectos predictivos de la tasa de proliferación celular y de pronóstico de los

pacientes (186,187). Estos investigadores han demostrado que las células cancerosas con expresión elevada de estas proteínas ribosómicas tienen contenidos más elevados de ribosomas. Las alteraciones genéticas asociadas con el desarrollo del cáncer implican, muy frecuentemente, cambios de las vías de señalización que llevan su efecto hasta el ADN (186,187). El panorama anteriormente descrito reitera lo conocido por los biólogos del cáncer: la biogénesis de los ribosomas y la oncogénesis están íntimamente ligadas.

1.2 Acumulación de ribosomas en el proceso de oncogénesis

En las décadas de 60 y 70 fueron publicados estudios sobre ribosomas libres y ribosomas ligados a membranas (201,202) y sobre su acumulación durante la inducción de crecimiento en muchos órganos y tejidos (191- 194). En la secuencia de estas investigaciones se publicaron estudios que han intentado cuantificar la acumulación de **ribosomas** en las zonas interfoliculares de la piel del dorso de ratones durante la inducción química de crecimiento neoplásico, en dos fases, mediante iniciación por 7,12-dimetilbenz(a)antraceno y promoción provocada por 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (1073). La epidermis es un epitelio de superficie y, como otros epitelios, que están en contacto directo con el medio externo, tales como los revestimientos de los aparatos respiratorio y gastrointestinal, muestran una elevada incidencia de neoplasias. De este modo, la epidermis ha servido como un modelo útil para constituir un sistema de desarrollo comprensible del papel de la acumulación de ribosomas durante el crecimiento neoplásico (207).

1.3 Aplicaciones biomédicas potenciales resultantes del conteo de los ribosomas

La preparación de ribosomas, según el tejido bajo estudio, se puede hacer a través de algunas modificaciones de adaptación, publicadas en estudios previos (196-200). La preparación de ribosomas puede ser utilizada para muchos objetivos, como por ejemplo, para el estudio del crecimiento y desarrollo de tejidos inducidos por acción hormonal (1071), el estudio de la expresión de los genes, incluyendo la síntesis de las proteínas ribosómicas que están bajo control translacional (204-205), el estudio del “assembling” de los ribosomas (1072), estudio de la expresión diferencial de las proteínas ribosómicas de la mucosa del colon y recto normal y neoplásica (206), de entre muchas otras potencialidades, como, muy probablemente, en las enfermedades no malignas.

La identificación de los cambios de la estructura del citoplasma, como por ejemplo el aumento acentuado del número de **ribosomas** (método cuantitativo) acumulados en el citoplasma de una comunidad de células de un determinado tejido puede constituir uno de los aspectos fenotípicos de la expresión de malignidad de la estructura fina de las células transformadas, lo que puede ser esencial para caracterizar la evolución del comportamiento celular. En este sentido, por ejemplo, se podría estudiar el perfil gráfico de los cambios del número de ribosomas por célula (o por unidad de volumen), en un período de tiempo definido, dentro de una media aritmética de las células exfoliadas de la mucosa colorectal de un paciente, que formarán una **curva patrón/media del número de ribosomas por unidad de volumen (RIBOGRAMA)**, con relación a las células de la mucosa del colon y recto, aisladas y separadas de las heces.

Como muchos campos de las ciencias de la vida, la biología del cáncer es un campo en expansión exponencial y enormemente complejo, incluyendo trabajo que tiene una amplitud desde la biología molecular de los oncogenes hasta la epidemiología del ambiente. Las tasas de supervivencia para los varios cánceres, una vez que se manifiesten clínicamente, han mostrado modesta mejoría durante las últimas décadas.

Existe una fuerte motivación para integrar diversos campos del conocimiento en la biología del cáncer e introducir un nuevo armazón conceptual y teórico que pueda mejorar la comprensión de los investigadores sobre la dinámica tumoral para así, poder desarrollar mejores medidas terapéuticas. Será muy importante la producción de modelos predictivos mecanísticamente basados en la dinámica tumoral

que puedan abstraerse del significado de los detalles biológicos más avanzados relativamente a la oncogénesis y progresión tumoral. Aunque sea cierto que el cáncer es una enfermedad multifacetada con una variedad de “triggers” cercanos en diferentes tejidos y en diferentes pacientes, hay también una fuerte posibilidad que los cánceres compartan una funcionalidad central originándose a partir de una maquinaria celular común de la cual las células dependen para su proliferación (177). El aspecto más visible de las neoplasias malignas agresivas es la proliferación celular aumentada, la cual tiene en su base un acentuado aumento de la síntesis proteica. En los procesos de la respuesta mitogénica normal, hay un aumento transitorio y cíclico del índice de la síntesis genérica de proteínas. El aumento general en la síntesis proteica es un fenómeno necesario controlado que se observa antes de la división celular, llevando a la duplicación del contenido y al aumento del tamaño antes de la mitosis normal. Así, el tamaño medio de las células es mantenido durante el proceso de respuesta proliferativa fisiológica.

Uno de los mecanismos llave de la pérdida del control de la síntesis proteica en las células transformadas, es la incapacidad de disminución del número de **ribosomas** que está correlacionado con la proliferación celular en medios de cultura frescos sin adición de factores de crecimiento al suero (156). Muchos investigadores han observado, en cultivos de tejidos, diferencias en las propiedades de crecimiento entre células normales y sus contrapartes malignas, una de las cuales apunta hacia el fallo de estas en mostrar una variación cíclica de algunos parámetros celulares y bioquímicos a través del ciclo celular o ciclo de crecimiento (159-162). Anteriormente, otros investigadores han prestado su atención a las modificaciones que ocurren en el ritmo de la síntesis proteica y en la función de la maquinaria “translacional” de la célula, relativamente al ciclo celular, una vez que tales cambios son necesarios en las transiciones de crecimiento y multiplicación en condiciones normales.

1.4 El nucléolo

En este sentido, es lógico hablar sobre el hecho de que muchos patólogos, durante el examen de rutina de evaluación de material de biopsia, frecuentemente prestan atención a los nucleolos (los sitios en donde el rARN es sintetizado y los ribosomas son “*assembled*”), pues en los neoplasmas malignos, los nucleolos están alterados, de alguna manera, relativamente al número y tamaño. Así, la asociación de nucleolos alterados con perturbaciones neoplásicas ha sido referida en trabajos de investigación desde hace más de cincuenta años (157). El nucleolo es una unidad estructural funcional bien definida en la interfase celular en la cual están localizados los genes ribosómicos y donde ocurre la síntesis del ARN ribosómico (163). De entre otras funciones, el nucleolo, que es un organelo llave, coordina la síntesis y el ensamblaje de las unidades ribosómicas.

La producción de ribosomas es una actividad metabólica importante y por eso la función del nucleolo está íntimamente ligada al crecimiento celular y recientes datos sugieren que el nucleolo también juega un importante papel en la regulación del ciclo celular, la senescencia y las respuestas al estrés (188).

La biogénesis de los ribosomas envuelve la síntesis de rARN, la maduración y el ensamblaje del ARN y de las proteínas ribosómicas en las sub-unidades ribosómicas, pequeñas y grandes. Este proceso es regulado a través del ciclo celular, primariamente al nivel de la síntesis de rARN (189). La transcripción de rADN llega a su punto más alto durante la fase S y G₂, se interrumpe cuando la célula entra en mitosis y reactiva cuando las células salen de la mitosis (190).

En los últimos diez años han sido adquiridos importantes conocimientos en cuanto al significado de los cambios del nucleolo en la patología tumoral, a través de estudios de modificaciones de distribución de un grupo de proteínas nucleolares, las proteínas AgNOR (*argyrophilic nucleolar organiser region*) en tejidos malignos. Estas proteínas son necesarias para la biogénesis de los ribosomas y son selectivamente teñidas por los métodos de plata (164). Las dos proteínas más importantes son la nucleolina y la proteína B23, que están envueltas en la síntesis y procesamiento del rARN. (165).

En estudios hechos en fragmentos de biopsia tumoral para observación citohistológica *in situ* y en proteínas aisladas, se verifica que la cantidad de proteínas AgNOR aumenta progresivamente cuando las células en reposo entran en el ciclo mitótico desde G1 hasta el final de la fase S (166-168). También, hay evidencia que la cantidad de proteínas AgNOR está directamente relacionada con la rapidez de la proliferación celular en líneas de células de cáncer humano establecido (169-171). Los NOR (*nucleolar organiser region*) son sitios de transcripción de rARN, de la modificación post-transcripcional de los transcritos de ARN y de su "assembly" en ribosomas funcionales. El número de NORs expresados en un tejido está relacionado con la tasa de la proliferación celular, con la diferenciación y con la transformación neoplásica. Esto ha sido utilizado para demostrar el potencial neoplásico y para evaluar el pronóstico y agresión de los tumores malignos (173-175).

Las células hematopoyéticas quiescentes, tales como los linfocitos T y B no activados, y las células progenitoras pluripotentes, son pequeñas con más bajo contenido de proteínas y ARN que sus contrapartes en estado de proliferación. Durante la transición de G0 para G1 existe un aumento obligatorio de la masa celular y del número de ribosomas (1069) y un aumento de la tasa de la síntesis proteica debido, en parte, a un aumento del factor de iniciación eIF-4E (1070). En tumores de la piel en ratones, inducidos por la aplicación de promotores de tumores, la relación ARN: ADN y el contenido de ARN (porcentaje de masa seca contribuida por ARN) eran 2 a 3 veces más elevadas que en los tejidos normales (180). En varios tipos de leucemia, el contenido de ARN de linfocitos estaba fuertemente correlacionado con la cinética del crecimiento celular acelerado y con el pronóstico del enfermo (181).

En un estudio de cánceres ginecológicos en que los tejidos neoplásicos fueron comparados con sus contrapartes normales, el contenido de ADN y el contenido de ARN en los tejidos neoplásicos estaban aumentados 1.6 y 2.4 veces, respectivamente (182). De igual modo, el contenido de ARN celular estaba aumentado por un factor de 1.4 en células de neuroblastoma *myc*-transfectadas relativamente a las células normales (183). En otro estudio de cáncer de mama el teste del contenido de ADN celular estaba normal, pero el contenido de ARN celular estaba bien correlacionado con el grado del tumor, con el tipo histológico, con el status hormonal y con la supervivencia del paciente (184).

(la bibliografía de este INTROITO se encuentra en la TESIS DOCTORAL, cuyo contenido integral se encuentra incluido en este PROYECTO RIBOGRAMA)

I - INTRODUCCION

La importancia de un diagnóstico cada vez más precoz es incuestionable, porque permite un tratamiento menos agresivo e más eficaz así como mayor posibilidad de cura. Cuanto mejor y más informadas estuvieren las personas sobre la enfermedad oncológica y sus inherencias, mejor será la colaboración y decisión en su plano terapéutico. El potencial de curación para el cáncer de colon y recto (CCR), después de su resección quirúrgica, no ha evolucionado en los últimos 50 años, a pesar de la mejora significativa de los métodos de técnica quirúrgica y en los cuidados peri-operatorios. Los medios formales y clásicos de prevención y tratamiento dependen de técnicas invasivas para visualización directa, tales como sigmoidoscopia flexible, colonoscopia o el enema de bario de doble contraste, los cuales, no han conseguido por sí solos hacer bajar su incidencia como causa de muerte.

El cáncer colorectal es la segunda enfermedad maligna visceral más frecuente en los Estados Unidos y en el mundo con hábitos de alimentación y estilos de vida occidental, y si es diagnosticado antes del apareamiento de los síntomas o de las señales clínicas, los pacientes tienen más del doble de las hipótesis de tener enfermedad limitada (Dukes' A o B) y mejor pronóstico y potencialidad de curación.

El **CCR** es una de las principales causas de muerte por cáncer en el mundo con estilo de vida occidental, pero está dentro de los cánceres mejor curables cuando es identificado en un estadio precoz.

Tiene una fase pre-maligna larga y una progresión lenta desde la fase de enfermedad confinada a la pared del órgano, hasta las fases de invasión local y de enfermedad metastática distante. Por eso, hay una amplia oportunidad para identificar a los pacientes en un estadio curable con la realización de vastos rastreos. El cáncer colorectal (**CCR**) es una enfermedad que puede ser prevenida con antelación cuando los pólipos colorectales son removidos, o sea la enfermedad es altamente curable cuando es detectada en su estado inicial.

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

Hay necesidad de crear una política sanitaria epidemiológica, que tiene, en parte, que encararse con los síndromes de cáncer hereditario y con cuestiones de genética y comprensión de la maquinaria biomolecular subyacente a la etiopatogenia del desencadenamiento y desarrollo del fenotipo mutante hacia el apareamiento del cáncer con sus señales y síntomas, en el que la curación ya es una incógnita y una incertidumbre. Hoy ya no se puede esperar por señales y síntomas, pero sí ir al encuentro del advenimiento de las causas del cáncer. La estrategia no es esperar, sino avanzar en el camino al encuentro de las causas y combatir y descubrir el cáncer precoz en la fase de la curación. Todo debe ser hecho en la fase “**pré-in situ**”, que es el momento en que mejor se puede hablar en curar el cáncer.

El **CCR** tiene una fase pre-maligna larga y una progresión lenta desde la fase de enfermedad confinada a la pared del órgano, hasta las fases de invasión local y de enfermedad metastática distante. Por eso, hay una amplia oportunidad para identificar a los pacientes en un estadio curable con la realización de vastos rastreos. En la actualidad, existen métodos de abordaje que sin embargo no son específicos, tales como la indagación de sangre oculta en las heces, o bien aquellos que dependen de técnicas invasivas para visualización directa, tales como sigmoidoscopia flexible, colonoscopia, o enema de bario. Los recientes avances en química clínica y biología molecular llevaron al apareamiento de nuevas técnicas de abordaje no invasivas, basadas en la propia biología subyacente del **CCR**. Este abordaje identifica mutaciones que son conocidas por estar asociadas con el **CCR** en el DNA que es desprendido en las heces por las lesiones malignas y premalignas del colon.

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

En Europa, ha habido generalmente más declinio en la mortalidad de la mujer que en el hombre, lo que puede ser debido a un aumento del uso de contraceptivos y de la terapéutica de sustitución hormonal. La mortalidad ha bajado recientemente en muchos estados de la Unión Europea, pero esta aumentando en Grecia, Portugal y España. A pesar de la evidencia acumulada, incluyendo varios estudios controlados randomizados sobre la eficacia de la indagación de sangre oculto en las heces, que permite afirmar la existencia de una reducción de la mortalidad por cáncer colorectal en un programa aplicado a una cierta población, muchas personas en países desarrollados no se han sometido a cualquier rastreo.

Una quinta parte de las series del “Annual Reports to the Nation the Status of Cancer” destaca los datos de los cuatro cánceres más comunes – pulmón, mama de la mujer, próstata y colorectal – que en total representan mas de la mitad de los casos de cáncer y de muertes por cáncer en Estados Unidos. Estos cuatro cánceres tienen la misma importancia en la mayor parte de Europa. Hay más de 20 años, Doll y Peto utilizando datos de estudios hechos en 1970 y antes, concluyeron que los datos de la mortalidad eran generalmente más creíbles que los datos de la incidencia. Aun así, los datos de los registros de cáncer de la mundialmente afamada oficina de datos epidemiológicos SEER (Surveillance, Epidemiology and End Result) del “National Program of Cancer Registries (NPCR), que sigue los criterios de alta calidad divulgados por la “North American Association of Central Cancer Registries” (NAACCR), y de un gran número de registros en todo el mundo, signen los mas elevados estándares de calidad divulgados por el IARC (International Association of Cancer Registries), siendo por eso muy creíbles. Los datos de la mortalidad nunca fueran exentos de tendencia ó criticismo.

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

En Europa, los sistemas de registro de cáncer de la población, desde hay muchos años, con cobertura nacional en cada país (muchas veces regionalmente organizados), y con follow-up de los casos, completa virtualmente existen en los países nórdicos (Dinamarca, Finlandia, Islandia, Noruega y Suecia), en el Reino Unido y en muchos países del Báltico y Europa Central de la anterior Unión Soviética. La cobertura en otras partes de Europa, como en Francia, Alemania, Italia, Portugal y España, es, sin embargo, relativamente pobre. En este contexto, el establecimiento de un registro de cáncer riguroso es una vía importante en el sentido del control del cáncer.

Hasta el momento, los métodos de diagnóstico no invasivo existentes, como la indagación de sangre oculta en las heces, no han sido específicos. Los ensayos publicados basados en el método de la sangre oculta (con busca de la molécula de hierro) en las heces, hechos bianualmente, han demostrado una baja de 15%-18% en la mortalidad, mientras que el método inmunológico da una baja de 30%, siendo más específico y más seguro. La positividad del teste de sangre oculta en las heces tiene un porcentaje elevado de falsos positivos, así como los falsos negativos no son despreciables. Cuando un tumor sangra, esto significa que la barrera mucosa ha sido ya destruida con erosión / invasión de la sub-mucosa, con sus vasos sanguíneos y linfáticos, no garantizando seguridad en cuanto a la metastización e invasión ganglionar, o sea, el tumor no es un Tis/0.

El desarrollo de testes no invasivos, derivados del conocimiento de la biología tumoral básica, muestra la promesa de mejoría de las barreras apuntadas para la colonoscopia, como un examen de rastreo y diagnóstico de **CCR**. Se sabe que hay mutaciones del ADN humano en las heces, que están asociadas con el **CCR** y los pólipos colorectales premalignos. El conocimiento de este hecho ha llevado al aparecimiento de una metodología de base (de detección precoz del **CCR**) que estudia las mutaciones del ADN de las células descamadas de la mucosa colorectal. La ciencia subyacente al estudio de las mutaciones del ADN es sofisticada. Cuando los neoplasmas se desarrollan, las células y fragmentos son descamados y liberados en las heces en la luz intestinal, llevando, así, el ADN en las heces que constituyen la muestra para el teste. El teste de mutaciones de ADN en las heces tiene falsos positivos y falsos negativos, que varían con gran amplitud, según los autores. Las mutaciones en los tests de ADN en las heces pueden ser de otros órganos (árbol respiratorio, aparato digestivo, a montante del colrecto,

etc.), no permitiendo la garantía de la localización de un eventual tumor. Además, las mutaciones en esos testes (mutaciones del ADN en las heces) pueden ser fenotipos no mutantes, lo que contribuye para los abundantes falsos positivos.

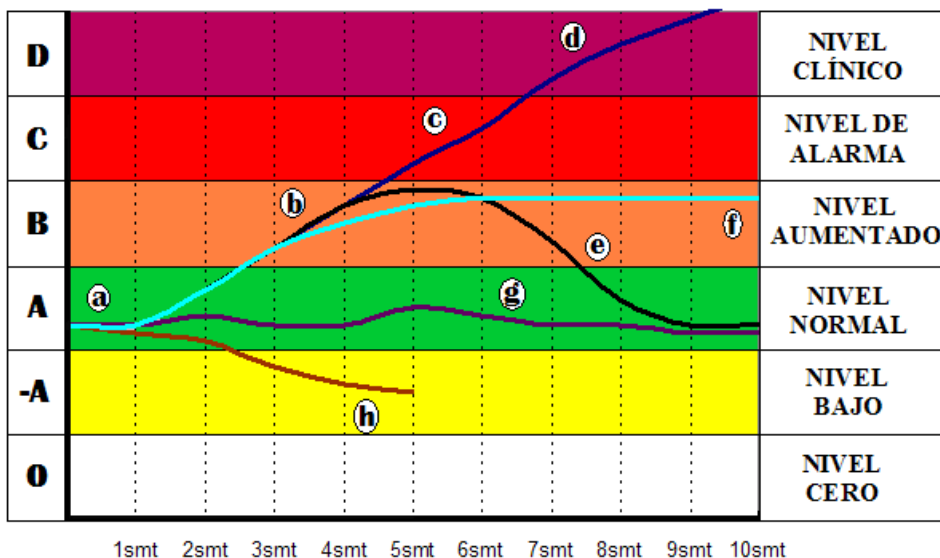
II - PROCEDIMIENTOS PARA PREPARACIÓN Y CONTEO DE RIBOSOMAS LIBRES TÉCNICAS Y FASES PARA CONCRETIZACIÓN DEL METODO

Para el recuento de ribosomas libres en la unidad de volumen bajo estudio se utilizarán las siguientes técnicas y/o fases:

- 01 - Cosecha de heces
- 02 - Colecta de colonocitos exfoliados
- 03 - Rotura de tejidos y células
- 04- Homogeneización
- 05 - Fraccionamiento subcelular
- 06 - Centrifugación
- 07- Sedimentación
- 08 - Centrifugación diferencial
- 09 - Equilibrio de sedimentación
- 10 - Preparación de ribosomas libres y marcación con fluorocromos
- 11- Recuento de ribosomas libres con utilización de citometria de flujo


III – CURVA DE RIBOGRAMA


Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características del método, se acompaña a la presente memoria descriptiva, como parte integrante del mismo, de un juego de planos, en los que con carácter ilustrativo y no limitativo se ha representado lo siguiente:





La figura muestra un ejemplo de un esquema en cuyos ejes, que representan las dos coordenadas cartesianas, se construye una curva gráfica, de los cambios de número de ribosomas libres por célula (o por unidad de volumen), en un período de tiempo definido, dentro de una media aritmética de las células exfoliadas de la mucosa colorrectal de un paciente.


INTERPRETACIÓN DE LA CURVA DEL GRAFICO (RIBOGRAMA)


 **a** **b** → Curva que comienza en el nivel normal y que llega al nivel aumentado, lo que implica la atención para un estudio profiláctico sobre las razones o causas que determinaran su apareamiento. Las células en este nivel (aumentado) aún no tienen características seguras de malignidad, pero si su número aumentado de ribosomas libres continua creciendo, la célula se transformará en un fenotipo maligno (nivel de alarma). En este momento es fundamental existir un estudio alimentario por encuesta, así como la identificación de posibles mutaciones responsables por el aumento no-controlado de la biogénesis de los ribosomas, en un proceso de carcinogénesis;


 **a** **c** → Segmento de la curva derivado de la anterior (segmento a-b), que corresponde ya a las alteraciones fenotípicas visibles en microscopia óptica, en las cuales las células ya se presentan con características fenotípicas de malignidad;

 **a** **d** → Segmento de la curva, en continuación del segmento anterior, que representa ya el nivel de los signos y síntomas de la enfermedad CCR (nivel clínico);

 **a** **e** → Este segmento de la curva corresponde a un cambio de sentido de la curva a-b que resultará de una acción preventiva y terapéutica (medicaciones y dieta específica);

 **a** **f** → Corresponde a una curva en que las células se desarrollan (se multiplican u proliferan) dentro de un autocontrol de los mecanismos de proliferación aumentada, como en el caso de los tubos seminíferos, u del endometrio. En este nivel aumentado de ribosomas el control de la biogénesis de los mismos se sitúa dentro de los mecanismos fisiológicos (no malignos);

 **a** **g** → Curva de nivel normal;

 **a** **h** → Este trabajo se destina al estudio del tema cáncer colorrectal (CCR), en que la curva de ribograma estará elevada, y por eso no es oportuno hablar sobre el significado de ella en el nivel bajo, que todavía servirá para estudiar condiciones de degeneración e involución de células y tejidos, ya sea de la mucosa intestinal, o de otro tejido extra-intestinal.

IV - ESENCIA DEL METODO

- En el esquema de la comentada **figura** están diseñados los dos ejes que representan las dos coordenadas cartesianas (abscisa o eje horizontal y ordenada o eje vertical), relativamente a los cuales se construye una curva gráfica. Esta curva es caracterizada por dos variables relativas a los ribosomas libres de las células de la comunidad citológica bajo estudio (las células epiteliales de la mucosa colorrectal o coloncitos). Esas variables son:

- la “cantidad (número) media de ribosomas libres” en el citoplasma de cada célula y
- el “tiempo” a lo largo del cual es observado el comportamiento de ciertas variaciones de esa “cantidad (número) media de ribosomas libres”.

- Habrá necesidad de criar experimentalmente perfiles gráficos de valores numéricos “cantidad (número) media de ribosomas libres” que puedan ser fijados como normales, a partir de los cuales se pueda trazar una curva-mediana-padrón. Así, será posible hacer estudios comparativos de grandes grupos poblacionales, en los cuales será posible divisar una multiplicidad potencial de tendencias de enfermedad maligna (por elevación de la curva) en una determinada comunidad de células de un tejido bajo investigación.

- En estudios correlacionados de microscopia electrónica y bioquímica los datos bioquímicos son usualmente cuantitativos, mientras la información morfológica (de la microscopia electrónica) es más limitada o semicuantitativa, basada en descripciones dependientes de criterios subjetivos.

- Este criterio subjetivo de abordaje en la microscopia electrónica no permite una mensuración estadística de los datos, con rigor matemático, impidiendo una correlación paramétrica de los datos morfológicos con los correspondientes datos bioquímicos.

- En el esquema de la **figura** hay un registro de la evaluación cuantitativa de los ribosomas libres, en el sentido estático y dinámico, como información recogida de fracciones subcelulares, que puede ser correlacionada con otros parámetros de mensuración biológica celular cuantitativa (como por ejemplo, algunos marcadores tumorales, e.g. CEA.).

- A partir del conocimiento del intervalo de valores "cantidad (número) media de ribosomas libres" considerados dentro de la normalidad (intervalo **A**) se podrán considerar otros intervalos, que en el esquema de la **figura** están representados por **B** nivel aumentado, **C** nivel de alarma, **D** nivel cínico, **-A** nivel bajo y **0** nivel inexistente.

- En el eje de las abscisas se inscriben los múltiplos de períodos de tres meses, (1, 2, 3,...,10) contados a partir del inicio de la monitorización de los registros de los valores de la "cantidad (numero) media de ribosomas libres" de las células bajo estudio.

- Las descripciones de mediciones de las células con características fenotípicas de malignidad varían según el grado de menor o mayor diferenciación de su textura, o morfología, pero esas descripciones son subjetivas, dependiendo de cada observador que hace la investigación. Lo mismo pasa cuando a los ribosomas libres que sufren una variación progresiva de cantidad, se desplazan del fondo de una cripta intestinal hasta al vértice de las vellosidades. Los ribosomas libres pueden ser aritméticamente contados, o sea su cantidad puede ser mensurable y comparable con el transcurrir del tiempo.

- Con los ribosomas libres es posible cuantificarlos a través de conteo, utilizando técnicas de citometría de flujo. Así, el procedimiento para el rastreo y diagnóstico precoz del cáncer colorrectal, que la presente invención preconiza, se basa esencialmente en el control cuantitativo o estudio del perfil gráfico de los cambios de número de ribosomas por célula (o por unidad de volumen), en un período de tiempo definido, dentro de una media aritmética de las células exfoliadas de la mucosa colorrectal de un paciente cuyos registros secuenciales formarán una curva patrón/media del número de ribosomas por unidad de volumen, con relación a las células de la mucosa del colon y recto, aisladas y separadas de las heces, para lo cual, en primer lugar, se realizará un adecuado aislamiento de los ribosomas libre mediante las siguientes técnicas:

- **Cosecha de heces.** Un número significativo de células permanecen intactas y viables en las heces y pueden ser aisladas. Ha sido demostrado que estas células son exclusivamente representantes de todo el colon y que pueden ser muy útiles en investigación clínica de procesos de enfermedad.

- **Células exfoliadas del colon (colonocitos exfoliados):** Los colonocitos exfoliados en las heces pueden ser colectados en un medio de transporte, a la temperatura ambiente, en un colector adecuado para tal función y aislados, obteniéndose, así, células para detección y estudio del numero (cantidad) de ribosomas libres, en un padrón medio predefinido de células epiteliales de la mucosa.

- La aplicación de técnicas de biología molecular a las células exfoliadas del colon y recto aumenta profundamente la sensibilidad de la detección del cáncer colorrectal o de su tendencia para la malignización, haciendo posible su utilización en el diagnóstico y en el rastreo.

- Los tests de heces, con base en la biología molecular (conteo de ribosomas libres) tienen varias ventajas importantes sobre otros tests de rastreo, porque

- a) - no son invasivos;
- b) - no necesitan de preparación intestinal,
- c) - ni enemas de limpieza,
- d) - ni preparación desagradable de catárticos.
- e) - no necesitan de consulta a un centro de exámenes médicos.
- f) - el paciente no tiene de alterar su ritmo de vida,
- g) - ni alterar la rutina de sus actividades diarias o de trabajo.
- h) - no tienen necesidad de alterar el ritmo y tipo de alimentación;

- La curva de **RIBOGRAMA** tiene una base matemática (pudiendo ser reproducible en circunstancias equivalentes), que corresponde a un lenguaje no subjetivo;

- El análisis de las tendencias y variaciones encontradas en esa curva constituirá un indicador seguro sobre el grado de evolución y propensión para la malignización;

- El **RIBOGRAMA** corresponde a un aspecto fenotípico con carácter cuantitativo, que puede proporcionar una información cuantitativa, por niveles de riesgo y de significación, con antelación a la malignización "abierta", y con información sobre el perfil de riesgo hereditario y del perfil alimentario, dietético y de hábitos de vida;

- Comparativamente a los tests no invasivos existentes en uso (análisis de sangre oculta en las heces y análisis de mutaciones de ADN de los coloncitos) el **teste del conteo de ribosomas** tiene, teóricamente, algunas características que constituyen grandes ventajas sobre los tests existentes:

- i. Sabiendo que se van a estudiar coloncitos aislados según la técnica propia y específica, la especificidad de los resultados es de 100% relativamente al conteo de los ribosomas libres;
- ii. La existencia de niveles de cantidades de ribosomas libres, según criterios de riesgo y significación, permite antelación de actitudes preventivas y terapéuticas ante una tendencia de malignización, mientras que en el teste de descubrimiento de mutaciones del ADN en las heces, la respuesta es solamente positivo/negativo, no permitiendo una cuantificación según niveles o grados con una significación de riesgo;
- iii. El teste de mutaciones de ADN en las heces tiene falsos positivos y falsos negativos, que varían con gran amplitud, según los autores;
- iv. La positividad del teste de sangre oculta en las heces tiene un porcentaje elevado de falsos positivos, así como los falsos negativos no son despreciables;
- v. Cuando un tumor sangra, esto significa que la barrera mucosa ha sido ya destruida con erosión / invasión de la sub-mucosa, con sus vasos sanguíneos y linfáticos, no garantizando seguridad en cuanto a la metastización e invasión ganglionar, o sea, el tumor no es un Tis/0;

- vi. Las mutaciones en los tests de ADN en las heces pueden ser de otros órganos (árbol respiratorio, aparato digestivo, a montante del colon, etc.), no permitiendo la garantía de la localización de un eventual tumor;
- vii. Además, las mutaciones en esos tests (mutaciones del ADN en las heces) pueden ser fenotipos no mutantes, lo que contribuye para los abundantes falsos positivos;
- viii. El teste de conteo de ribosomas libres, al que correspondan niveles significativamente aumentados del número de ribosomas libres en los colonocitos aislados de las heces, representa la existencia de un verdadero aumento de la síntesis descontrolada de las proteínas, no pudiendo, por eso, existir falsos positivos, porque un tumor depende esencialmente de una fabricación exagerada de proteínas en el proceso de crecimiento, y eso en la célula solo puede ser hecho por los ribosomas libres;”

V - AMBITO DEL METODO

El método se refiere a un procedimiento para el rastreo y diagnóstico precoz del cáncer colorrectal. De forma más concreta, el método consiste en un procedimiento basado en el control cuantitativo (o estudio del perfil gráfico) de los cambios de número de ribosomas libres por célula (o por unidad de volumen), en un período de tiempo definido, dentro de una media aritmética de las células exfoliadas de la mucosa colorrectal de un paciente, cuyos registros secuenciales formarán una curva patrón/media del número de ribosomas libres por unidad de volumen, con relación a las células de la mucosa del colon y recto, aisladas y separadas de las heces, lo cual permitirá el rastreo, control y diagnóstico precoz del cáncer colorrectal (en adelante cáncer CCR).

VI - MOTIVACIÓN E JUSTIFICACIÓN PARA EL METODO

6.01 - El cáncer CCR es una de las principales causas de muerte por cáncer en el mundo con estilo de vida occidental, pero está dentro de los cánceres mejor curables cuando es identificado en un estadio precoz.

6.02 - Este tipo de cáncer tiene una fase pre-maligna larga y una progresión lenta desde la fase de enfermedad confinada a la pared del órgano hasta las fases de invasión local y de enfermedad metastática distante. Por eso, hay una amplia oportunidad para identificar a los pacientes en un estadio curable con la realización de rastreos vastos.

6.03 - En un estudio sobre rastreo del CCR se explicaron las ventajas y desventajas de los varios métodos de tests o pruebas a 100 pacientes y después se les preguntó cuál de los métodos conocidos preferían como rastreo. Los resultados fueron que un tercio de pacientes declinan cualquier forma de teste invasivo, pero se someterían a una prueba no invasiva.

6.04 - El rastreo del CCR ha probado ser efectivo tanto en la disminución de la mortalidad por CCR, como, más recientemente, en la disminución de la incidencia.

6.05 - Existen ciertas condiciones que disminuyen las potencialidades de los resultados de los rastreos, que están asociadas con algunos factores, incluyendo

- a) - el número de estrategias del rastreo;

- b) - sus esquemas variados de recomendación manipulación e inadecuación impropia para los tests de sangre fecal;
- c) - consumo excesivo de tiempo y preparación incómoda para el paciente en las etapas de limpieza intestinal; y
- d) - naturaleza invasiva de muchas modalidades de rastreo riguroso;

6.06 - Todos estos factores contribuyen a bajar las ventajas y disminuyen el valor global del esfuerzo de indagación.

6.07 - El rastreo de CCR no ha penetrado adecuadamente en la muestra de población susceptible de ser estudiada y con indicaciones para tal, como por ejemplo, los mayores de 40/50 años de edad.

6.08 - La creación de sistemas de recordación clínica de rastreos de CCR para garantizar que los pacientes mantengan fidelidad a programas de rastreo apretados es igualmente necesaria, y condicionada por la complejidad que conlleva la preparación de los organigramas de rastreos.

VII - FUNDAMENTOS BIOMOLECULARES DEL METODO

7.01 - Se ha verificado que las células cancerosas, con expresión elevada de las proteínas ribosómicas, tienen contenidos más elevados de ribosomas.

7.02 - En las décadas de 60 y 70 fueron publicados estudios sobre ribosomas libres y ribosomas ligados a membranas y sobre su acumulación durante la inducción de crecimiento en muchos órganos y tejidos.

7.03 - En la secuencia de estas investigaciones se publicaron estudios que han intentado cuantificar la acumulación de ribosomas en las zonas interfolliculares de la piel del dorso de ratones durante la inducción química de crecimiento neoplásico, en dos fases, mediante iniciación por 7,12-dimetilbenz(a)antraceno y promoción provocada por 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato.

7.04 - La epidermis es un epitelium de superficie y, como otros epitelios, que están en contacto directo con el medio externo, tales como los revestimientos de los aparatos respiratorio y gastrointestinal, muestra una elevada incidencia de neoplasias. De este modo, la epidermis ha servido como un modelo útil para constituir un sistema de desarrollo comprensible del papel de la acumulación de ribosomas durante el crecimiento neoplásico.

7.05 - El panorama anteriormente descrito reitera lo conocido por los biólogos del cáncer: **la biogénesis de los ribosomas y la oncogénesis están íntimamente ligadas.**

7.06 - El propósito del presente método, con estos conocimientos básicos de biología molecular, es definir algunos principios orientadores sobre el valor del número aumentado de ribosomas libres, como traducción clínica de la dinámica del proceso bioquímico hacia la malignización de las células en una comunidad celular específica de un tejido, u órgano, mediante la verificación y comprobación en el ámbito de observaciones de microscopia electrónica de las cantidades de ribosomas libres en tejidos neoplásicos, o pre-malignos y de la construcción de una curva grafica de las cantidades de ribosomas libres de esos tejidos, que pueda definir la tendencia de malignización de una comunidad celular, bajo ciertas condiciones que predisponen para el crecimiento de un tejido en la dirección de la malignización.

7.07 - Será muy importante la producción de modelos predictivos mecanísticos (conteo de ribosomas libres) basados en la dinámica tumoral, con traducción en el fenotipo celular, como, por

ejemplo, con el conteo de ribosomas libres en una célula en proceso de alteración fenotípica, bajo el estímulo oncogénico.

7.08 - Será más útil para la práctica clínica concreta que los investigadores puedan abstraerse del significado de los detalles biológicos más avanzados relativamente a la oncogénesis y progresión tumoral, que dependen de incontables factores variables.

7.09 - La identificación de los cambios de la estructura del citoplasma, como por ejemplo el aumento acentuado del número de ribosomas libres (método cuantitativo) acumulados en el citoplasma de una comunidad de células de un determinado tejido puede constituir uno de los aspectos fenotípicos de la expresión de malignidad de la estructura fina de las células transformadas, lo que puede ser esencial para caracterizar la evolución del comportamiento celular.

7.10 - En este sentido, el presente método preconiza estudiar el perfil gráfico de los cambios del número de ribosomas por célula (o por unidad de volumen), en un período de tiempo definido, dentro de una media aritmética de las células exfoliadas de la mucosa colorrectal de un paciente cuyos registros secuenciales formarán una curva patrón/media del número de ribosomas por unidad de volumen, con relación a las células de la mucosa del colon y recto, aisladas y separadas de las heces.

7.11 - Esto puede permitir una fuerte motivación para integrar diversos campos del conocimiento en la biología del cáncer e introducir nueva armazón conceptual y teórica que pueda mejorar la comprensión de los investigadores sobre la dinámica de la formación tumoral para, así, poder desarrollar mejores métodos preventivos, diagnósticos y terapéuticos.

7.12 - Aunque sea cierto que el cáncer es una enfermedad multifacética con una variedad de desencadenantes o "triggers" cercanos en diferentes tejidos y en diferentes pacientes, hay también una fuerte posibilidad de que los cánceres comparten una funcionalidad central originándose a partir de una maquinaria celular común de la cual las células dependen para su proliferación.

7.13 - El aspecto más visible de los neoplasmas malignos agresivos es la proliferación celular aumentada, la cual tiene en su base un acentuado aumento de la síntesis proteica.

7.14 - En los procesos de la respuesta mitogénica normal hay un aumento transitorio y cíclico del índice de la síntesis genérica de proteínas.

7.15 - El aumento general en la síntesis proteica es un fenómeno necesario controlado que se observa antes de la división celular, llevando a la duplicación del contenido y al aumento del tamaño antes de la mitosis normal.

7.16 - Así, el tamaño medio de las células es mantenido durante el proceso de respuesta proliferativa fisiológica.

7.17 - Uno de los mecanismos llave de la pérdida del control de la síntesis proteica en las células transformadas es la incapacidad de disminución del número de ribosomas que está correlacionada con la proliferación celular en medios de cultura frescos sin adición de factores de crecimiento al suero.

7.18 - Muchos investigadores han observado, en culturas de tejidos, diferencias en las propiedades de crecimiento entre células normales y sus contrapartes malignas, una de las cuales apunta hacia el fallo de estas en mostrar una variación cíclica de algunos parámetros celulares y bioquímicos a través del ciclo celular o ciclo de crecimiento.

7.19 - La biogénesis de los ribosomas y el control de la traducción son procesos celulares esenciales controlados a muchos niveles.

7.20 - Varios supresores tumorales y proto-oncogenes han sido responsabilizados por la alteración de la formación de los ribosomas maduros y por la regulación de la actividad de proteínas conocidas como factores de traducción.

7.21 - La perturbación en una o más de las etapas que controlan la biosíntesis de las proteínas ha sido asociada con alteraciones en el ciclo celular y en la regulación del crecimiento de las células.

7.22 - Por eso, ciertos supresores tumorales y proto-oncogenes pueden regular la progresión maligna a través de la alteración de la maquinaria de la síntesis proteica.

7.23 - La producción de ribosomas maduros, que son competentes para la traducción celular del mRNA necesita de un proceso "multistep" (de múltiples etapas) que es altamente coordinado en las células eucariotas.

7.24 - El ribosoma, que es la fábrica central de síntesis de proteínas, puede ser visto como una máquina finamente regulada que funciona como un componente estático de los complejos procesos centrales ordenados a niveles más superiores.

7.25 - Los ribosomas tienen la misión de producir correcta y eficientemente todas las proteínas de la célula.

7.26 - Aunque sea conocido el hecho de que en las células cancerosas los componentes de la maquinaria de traducción están desarreglados o se expresan mal, su papel en la tumorigénesis ha sido largamente olvidado.

7.27 - En los comienzos de los años 70, los cambios en el nucleolo han sido reconocidos como un importante marcador de la transformación celular.

7.28 - Las mutaciones en los genes que codifican las proteínas que están directamente envueltas en la biogénesis de los ribosomas están asociadas con el cáncer y otras enfermedades.

7.29 - El crecimiento y proliferación celular están asociados con cambios en la tasa de producción de los ribosomas.

7.30 - Durante G1 hay un prerrequisito que es el aumento de la síntesis del rARN y del montaje de los ribosomas para el aumento de la síntesis proteica durante la fase S. Más aún, puede ser necesario la regulación de baja en la actividad de los ribosomas o de su formación, o ambos durante la fase M para asegurar la salida adecuada del ciclo celular. Por eso, existe una relación importante entre el ciclo celular y la producción de los ribosomas.

7.31 - Este balance es mantenido en la célula a través de los "checkpoints", que aseguran que la traducción del mRNA ocurra en niveles apropiados y durante una ventana del ciclo celular.

7.32 - La síntesis del rARN es el primer evento en la biogénesis del ribosoma. Depende de la regulación del rADN por la ARN polimerase I (Pol I) en el nucléolos. La síntesis de rARN en la célula

puede ser inducida por estímulos extracelulares en ciertos momentos cuando una célula necesita crecer y proliferar.

7.33 - El concepto de la regulación de la síntesis del rARN ha sido originalmente verificado en las células en que la privación de un aminoácido resultaba en una rápida terminación de la síntesis del rARN.

7.34 - La desregulación aumentada de las r-proteínas en las células cancerosas corresponde razonablemente a su involucramiento en la producción de ribosomas.

7.35 - Similarmente, al aumento de la actividad transcripcional de Pol I que resulta en un aumento de la síntesis de rARN, las r- proteínas podrían también regular el número de ribosomas funcionales en la célula.

7.36 - En ambos casos las células que contienen más ribosomas tendrían una tasa de traducción aumentada, que promovería la transformación celular.

7.37 - El crecimiento y proliferación celular están asociados con cambios en la tasa de producción de los ribosomas y la biogénesis de los ribosomas y puede servir como un sensor para que las células ultrapasen importantes "checkpoints" durante el ciclo celular.

7.38 - En las células transformadas, que muestran producción de ribosomas aumentada el ciclo celular, el número de ribosomas puede ser alterado como consecuencia de las alteraciones en la biogénesis de los ribosomas.

7.39 - Este sistema apretado de autorregulación entre los ribosomas y el ciclo celular podrá funcionar para mantener la homeostasis celular.

7.40 - Un aumento en la cantidad de ribosomas, como consecuencia de algún efecto a montante, afecta la traducción de las proteínas y puede contribuir al proceso de transformación.

7.41 - Sin embargo, en el presente, no es posible saber en concreto si hay algún "cross-talk" o interferencia entre los ribosomas y el ciclo celular.

7.42 - El epitelium colorrectal normal se renueva cada 3 a 8 días. Está en constante actividad proliferativa, para compensar las elevadas pérdidas normales, y para mantener la homeostasis de la mucosa colorrectal.

7.43 - Históricamente, está demostrado que las células epiteliales de la mucosa colorrectal migran de la cripta hasta las vellosidades, sufriendo diferenciación y senescencia, hasta que se liberan en el lumen del intestino.

7.44 - La renovación epitelial no siempre resulta de exfoliación, también puede resultar de reciclaje fagocítica a través de macrófagos subepiteliales en el transcurso de fenómenos de apoptosis, lo que representa una vía alternativa.

7.45 - La liberación de colonocitos a partir de neoplasmas colorrectales es diferente, sea cualitativa, sea cuantitativamente, de la del epitelium normal.

7.46 - Hay evidencia, desde hay mucho tiempo, que la liberación de colonocitos a partir de los cánceres es significativamente mayor que de la mucosa normal. La densidad celular de eritrocitos, células

inflamatorias, colonocitos y debris celulares es 100-200 veces más abundante en el moco sobre las superficies de los cánceres de la mucosa que sobre la superficie normal de la mucosa.

7.47 - La tasa elevada de exfoliación de colonocitos a partir de los cánceres puede ser debida a factores tales como proliferación epitelial aumentada, apoptosis proporcionalmente menor, reducción de la adhesión célula-célula y perturbación de la remoción fagocítica.

7.48 - Parece existir una supervivencia mayor para las células malignas cuando son comparadas con la de las células de la mucosa normal y la apoptosis está aumentada en las células normales cuando se separan de la membrana basal. Este fenómeno es debido a la activación de las caspases y otras señales de muerte.

7.49 - En contraste con los colonocitos normales, los colonocitos malignos adquieren cambios genéticos que les confieren capacidad de anclaje independiente para crecimiento, lo que les permite entrar en circulación y eventualmente ocasionar metastización. Aunque los colonocitos malignos puedan escapar a la apoptosis, estos pueden ser vulnerables a los ácidos biliares y otros agentes citóxicos en el milieu de las heces. Hay información suficiente que revela una mayor concentración de colonocitos sobre la superficie de las heces.

VIII - CONCRETIZACION Y EJECUCIÓN DEL METODO

En este proyecto se van reunir las condiciones materiales, científicas y de recursos humanos para la **concretización y ejecución del metodo del RIBOGRAMA**. Se deberán criar experimentalmente perfiles graficos de los valores ("cantidad") medios de **ribosomas libres** que van a ser fijados como normales, para que a partir de los cuales se pueda trazar una curva-mediana-padrón, del tipo de la ejemplificada en la figura del ribograma.

La **curva normal de ribograma** deberá ser definida con limites de amplitud, dentro de una zona considerada de normalidad, con base en los resultados de mediciones de concentraciones de **ribosomas libres** provenientes de colonocitos de la mucosa colorectal de personas adultas jóvenes sanas, con edades entre los veinte y los cincuenta años, de quienes se obtendrán las muestras de heces para aislamiento de colonocitos.

Después de bien definidos los limites de la normalidad de las concentraciones de **ribosomas libres** será posible hacer estudios comparativos, lo que permitirá criar niveles de tendencias de la enfermedad maligna (por elevación de la curva) a partir de la secuencia de ciertos valores de los resultados encontrados.

El método es concebido para trabajar con productos de excreción del cuerpo humano, que en circunstancias corrientes y habituales son lanzadas en el sistema de alcantarilla publica. En el desarrollo del metodo no hay ningún procedimiento sobre el cuerpo humano, y la tramitación técnico-científica obedecerá al anonimato y confidencialidad medica en lo que respecta a la identificación de cada persona de la cual serán obtenidas las muestras de heces para estudio. De esta forma, no será posible a nadie saber a quien pertenecen las muestras de heces bajo trabajo de estudio laboratorial.

Para trazar los limites del estudio en la población diana hay que tener en cuenta que el cancer colorectal (CCR) esporádico (lo que no depende de características heredofamiliares) tiene esencialmente su **aparición a partir de los cincuenta años de edad**.

Así, para este **estudio prospectivo**, para la construcción de la curva grafica normal del ribograma y de los tramos de esa curva fuera de los límites de la normalidad, serán constituidos **seis grupos** de personas/pacientes, utilizando los siguientes criterios:

GRUPO I – Personas/pacientes con **edad no superior al límite máximo de los cincuenta años**, clínicamente sanas, que no tengan en su historia clínica hábitos intestinales de defecación con cualquier episodio de pérdida macroscópica de sangre en las heces, en los últimos tres años, **de las cuales se obtendrán muestras de heces**;

GRUPO II – **Muestras de heces** de personas sometidas a rectosigmoidoscopia/colonoscopia con resultado macroscópico negativo para pólipos o formaciones polipoides;

GRUPO III – **Muestras de heces y material de biopsia** de personas sometidas a rectosigmoidoscopia/colonoscopia, con resultado macroscópico positivo para pólipos o formaciones polipoides;

GRUPO IV - **Muestras de heces y material de biopsia** de personas sometidas a rectosigmoidoscopia/colonoscopia con resultado macroscópico positivo para lesiones sospechas de cancer;

GRUPO V – **Muestras de heces y material de biopsia** de personas sometidas a rectosigmoidoscopia/colonoscopia, con resultado microscópico positivo para pólipos, formaciones polipoides, o lesiones sospechas de cancer;

GRUPO VI – **Muestras de heces y material de biopsia** de piezas operatorias de personas sometidas a cirugía de cancer colorectal.

El numero de muestras de **personas dichas normales, y clínicamente sin quejas y sin síntomas atribuibles al trayecto del colon y recto**, para calibración de la curva normal, no deberá ser inferior a 1000.

Se obtendrá de cada **persona sana seleccionada**, para el estudio de calibración de la curva normal, una muestra con intervalos de 3 meses, lo que significa que cada persona proporciona **4 muestras en cada año**.

El estudio para calibración descorrerá durante por lo menos dos años, lo que significa que se obtendrán **8 muestras de heces de cada persona** en un periodo de dos años. De esta forma, serán garantidamente necesarias 150 a 200 personas voluntarias, en las condiciones descritas en el **GRUPO I**.

Las personas en las condiciones descritas en los **GRUPOS II, III, IV, V y VI** serán seleccionadas de **INSTITUCIONES** o **SERVICIOS DE SALUD** en donde se realicen colonoscopias y/o rectosigmoidoscopias, así como cirugía de colon y recto relativamente al **GRUPO VI**.

IX - REIVINDICACIONES

10.01 - PROCEDIMIENTO PARA EL RASTREO Y DIAGNÓSTICO PRECOZ DEL CÁNCER COLORRECTAL, caracterizado por el hecho de consistir en el control cuantitativo o estudio del perfil gráfico de los cambios de número de ribosomas por célula (o por unidad de volumen), en un periodo de

tiempo definido, dentro de una media aritmética de las células exfoliadas de la mucosa colorrectal del paciente.

10.02 - PROCEDIMIENTO PARA EL RASTREO Y DIAGNÓSTICO PRECOZ DEL CÁNCER COLORRECTAL, según la reivindicación , **caracterizado** por el hecho de que los registros secuenciales de las cantidades de ribosomas libres (del número de ribosomas por unidad de volumen) obtenidos a partir dicho control cuantitativo, forman una curva patrón/media, con relación a las células de la mucosa del colon y recto, aisladas y separadas de las heces.

10.03 - PROCEDIMIENTO PARA EL RASTREO Y DIAGNÓSTICO PRECOZ DEL CÁNCER COLORRECTAL, según las reivindicaciones 01 y 02, **caracterizado** por el hecho de que se realiza un registro de la evaluación cuantitativa de los ribosomas libres, en el sentido estático y dinámico, como información recogida de fracciones subcelulares, que puede ser correlacionada con otros parámetros de mensuración biológica celular cuantitativa (como por ejemplo, algunos marcadores tumorales, e.g. CEA.); y porque a partir del conocimiento del intervalo de valores “cantidad (número) media de ribosomas libres” considerados dentro de la normalidad se podrán considerar otros intervalos.

10.04 - PROCEDIMIENTO PARA EL RASTREO Y DIAGNÓSTICO PRECOZ DEL CÁNCER COLORRECTAL, según las reivindicaciones I a XI, **caracterizado** por el hecho de que para la consecución del control cuantitativo o conteo de ribosomas libres en la unidad de volumen a estudio se utilizarán las siguientes **técnicas y/o fases**:

- I - Cosecha de heces
- II - Colecta de colonocitos exfoliados
- III- Rotura de tejidos y células
- IV- Homogeneización
- V - Fraccionamiento subcelular
- VI - Centrifugación
- VII- Sedimentación
- VIII- Centrifugación diferencial
- IX- Equilibrio de sedimentación
- X- Preparación de ribosomas libres y marcación con fluorocromos
- XI- Conteo de ribosomas libres con utilización de citometria de flujo

X - VENTAJAS DEL MÉTODO RIBOGRAMA SOBRE OTROS MÉTODOS DE DETECCIÓN NO INVASIVOS DE CCR.

- El metodo del **RIBOGRAMA** (conteo de ribosomas libres,de los colonocitos exfoliados de la mucosa colo rectal que se mezclan con las heces en el interior del intestino grueso) es un test de heces, que se basa en técnicas de biología celular y molecular, tiene fuertes e importantes ventajas sobre otros testes de heces de diagnostico y rastreo (Test de sangre oculta en las heces y test de identificación de mutaciones del DNA en las heces). **Por las características, que a continuación se desglosan, el presente test de RIBOGRAMA son de fácil adhesión hacia los pacientes, por su sencillez y aspecto practico como se va a demostrar.**

En el test de **RIBOGRAMA**:

- a)** - no hay acto invasivo;
- b)** - no hay necesidad, por parte del pacientes, de realizar manipulacion de sus propias heces en su cosecha,
- c)** - no hay molestia de olores de heces una vez que el colector de estas ya que tiene un diseño industrial en ese sentido.

- d)** - no es necesario preparación intestinal,
- e)** – no son necesarios enemas de limpieza,
- f)** – no es necesaria la utilización de catárticos.
- g)** - no es necesaria el desplazamiento del paciente a la consulta medica o a un centro de exámenes médicos.
- h)** - el paciente no tiene de alterar su ritmo de vida,
- i)** – el paciente no tiene que alterar la rutina de sus actividades diarias o de trabajo.
- j)** – el paciente no tiene necesidad de alterar su ritmo y tipo de alimentación
- k)** – el paciente no tiene que interrumpir ni modificar ninguna medicación
- l)** – no existen resultados de falsos negativos, ni falsos positivos, porque en su especificación el test, se limita a contar los **ribosomas libres** de los colonocitos, que son la celulas que están malignizadas en los casos de CCR o en los procesos en procedimiento de malignización.

En resumen, las ventajas del test del RIBOGRAMA, sobre los otros test invasivos son doce factores evidentes que por si solos permiten una buena adhesión de los pacientes y una preferencia determinante para los profesionales de la salud, porque no hay resultados falsos positivos ni falsos negativos.

Un número significativo de células de la mucosa de colon y recto, permanecen intactas y viables en las heces y pueden ser aisladas. Ha sido demostrado que estas células son exclusivamente representantes de todo el colon y que pueden ser muy útiles en investigación clínica de procesos de enfermedad.

Los colonocitos exfoliados (células de la mucosa del colon y recto) en las heces, de pacientes en estudio, pueden ser recolectados en un medio de transporte (colector de heces diseñado y patentado para este metodo), a la temperatura ambiente, y aislados, obteniéndose, así, células para el estudio del numero (cantidad) de **ribosomas libres**, que se definirán matemáticamente en un padrón medio, a partir del padrón medio predefinido resultante de las celulas epiteliales de la mucosa normal (obtenido en un estudio de **mas de dos mil pacientes sin patologia**).

- La aplicación de técnicas de biología molecular de las células exfoliadas del colon y recto **aumenta profundamente la sensibilidad de la detección del cáncer colorrectal o de su tendencia para la malignización, haciendo posible su utilización en el diagnostico y en el rastreo.**

Con este metodo **RIBOGRAMA** es posible, **efectivamente**, bajar **significativamente**, por primera vez, en los **últimos cincuenta años**, la incidencia, la mortalidad y la morbilidad de la enfermedad **CCR**, porque este nuevo metodo permite ir al encuentro de la tendencia de malignización (o ya en el estado de malignización) antes de cualquier endoscopia realizada, que será negativa a los ojos del endoscopista.

Relativamente al test de sangre oculta en las heces hay un aspecto determinante:

- El test de sangre oculta en las heces, en el caso, efectivo de positividad, la sangre detectada ya viene de los vasos sanguíneos de la submucosa, lo que significa que ya existe una invasión de la vasculatura bajo la mucosa malignizada, que ya ha invadido la circulación, con lo que significa de diseminación de celulas malignizadas, tanto en la circulación sanguínea y linfática, donde no será extraño la existencia de potenciales micrometastasis, las cuales significan y representan la incertidumbre en el pronostico, una vez que no hay metodos de imagen que permitan saber si hay o no micrometastasis en la circulación.

Relativamente al test de mutaciones del DNA en las heces hay un aspecto determinante:

- El test de identificación de mutaciones del DNA en las heces define apenas la alteración genética de los principales genes conocidos como responsables por potencial malignización del DNA de los colonocitos. Es sabido de la genética molecular que las alteraciones genéticas de los genes predefinidos como responsables por la malignización de la mucosa colo rectal no inducen obligatoriamente la malignización de las células en donde ocurren una vez que hay **simultáneamente** un proceso de reparación genética, que es un fenómeno de oposición a la aparición de las mutaciones.
- En las heces pueden venir partículas de DNA, de otros puntos del aparato digestivo, como la mucosa del intestino delgado, de la mucosa gástrica y duodenal, de la mucosa de las vías biliares, de la mucosa de conductos excretores de páncreas, de la mucosa del esófago y de la mucosa de aparato respiratorio, una vez que en este caso el moco y la expectoración son prácticamente deglutidos. Así, no es sorprendente la existencia de abundantes falsos positivos. En la literatura científica sobre las sensibilidades de este test existen variaciones que pueden situarse entre valores de cincuenta por ciento al ochenta y cinco por ciento de sensibilidad.

De lo expuesto sobre los tests no invasivos ya existentes en el mercado (test de sangre oculta en las heces y test de identificación de mutaciones de DNA en las heces) se concluye que el test del **RIBOGRAMA**, es muy superior a los tradicionales no invasivos en el mercado actual, destacándose su total sensibilidad (100%). Además el test del RIBOGRAMA es **cuantitativo**, permitiendo una comparación dinámica con el curso del tiempo, lo que no es posible con los otros dos tests.

- La curva de **RIBOGRAMA** tiene una base matemática (pudiendo ser reproducible en circunstancias equivalentes), que corresponde a un lenguaje no subjetivo;
 - El análisis de las tendencias y variaciones encontradas en esa curva constituirá un indicador seguro sobre el grado de evolución y propensión para la malignización;
 - El **RIBOGRAMA** corresponde a un aspecto fenotípico con carácter cuantitativo, que puede proporcionar una información cuantitativa, por niveles de riesgo y de significación, con antelación a la malignización “abierta”, y con información sobre el perfil de riesgo heredofamiliar y del perfil alimentario, dietético y de hábitos de vida;
 - Comparativamente a los tests no invasivos existentes en uso (análisis de sangre oculta en las heces y análisis de mutaciones de ADN de los colonocitos) el teste del conteo de ribosomas tiene, teóricamente, algunas características que constituyen grandes ventajas sobre los tests existentes:
 - i. Sabiendo que se van a estudiar colonocitos aislados según la técnica propia y específica, la especificidad de los resultados es de 100% relativamente al conteo de los ribosomas libres;
 - ii. La existencia de niveles de cantidades de ribosomas libres, según criterios de riesgo y significación, permite antelación de actitudes preventivas y terapéuticas ante una tendencia de malignización, mientras que en el teste de descubrimiento de mutaciones del ADN en las heces, la respuesta es solamente positivo/negativo, no permitiendo una cuantificación según niveles o grados con una significación de riesgo;
 - iii. El teste de mutaciones de ADN en las heces tiene falsos positivos y falsos negativos, que varían con gran amplitud, según los autores;
 - iv. La positividad del teste de sangre oculta en las heces tiene un porcentaje elevado de falsos positivos, así como los falsos negativos no son despreciables;

- v. Cuando un tumor sangra, esto significa que la barrera mucosa ha sido ya destruida con erosión / invasión de la sub-mucosa, con sus vasos sanguíneos y linfáticos, no garantizando seguridad en cuanto a la metastización e invasión ganglionar, o sea, el tumor no es un Tis/0;
- vi. Las mutaciones en los tests de ADN en las heces pueden ser de otros órganos (árbol respiratorio, aparato digestivo, a montante del colorecto, etc.), no permitiendo la garantía de la localización de un eventual tumor;
- vii. Además, las mutaciones en esos testes (mutaciones del ADN en las heces) pueden ser fenotipos no mutantes, lo que contribuye para los abundantes falsos positivos;
- viii. El teste de conteo de ribosomas libres, al que correspondan niveles significativamente aumentados del número de ribosomas libres en los colonocitos aislados de las heces, representa la existencia de un verdadero aumento de la síntesis descontrolada de las proteínas, no pudiendo, por eso, existir falsos positivos, porque un tumor depende esencialmente de una fabricación exagerada de proteínas en el proceso de crecimiento, y eso en la célula solo puede ser hecho por los ribosomas libres;”

X I- Otros beneficios

Además de el método de diagnóstico ser específico de la enfermedad del CCR, **sin falsos positivos ni falsos negativos**, va a determinar un comportamiento personal y familiar basado en la información convincente y persuasiva de que la **elevación significativa** de la curva de **RIBOGRAMA** esta dando orientaciones para los cuidados de existir o no la necesidad de la realización de exámenes diagnósticos y/o terapéuticos en los grupos de riesgos (curvas elevadas del **RIBOGRAMA**).

No habrá así realización de endoscopias a ciegas, es decir, solo se realizaran endoscopias de diagnóstico en los casos concretos de elevación de la curva, con el correspondiente y significativo ahorro de molestias al paciente, así como la eliminación de ausencias laborales y los costes propios de las pruebas diagnosticas.

Esto significa, desde luego, una **información segura** sobre los riesgos y posibilidades de malignización de eventuales lesiones de la mucosa colón rectal, con mucha antelación de cualquier invasión de la submucosa que es el punto mas importante para la desiminación maligna, porque en este momento los vasos sanguíneos y linfáticos de la submucosa pueden ya estar invadidos por micrometastasis en el proceso de malignización.

La gran ventaja, además de las descritas anteriormente, de estos fundamentos patogénicos, es el hecho de no haber incertidumbres sobre la posibilidad de diagnóstico en los casos de malignización abierta, una vez que solo será sorprendido con la enfermedad quien no haga el test, lo que esto significa de influencia y persuasión a los restantes familiares de un paciente con curva de **RIBOGRAMA** significadamente elevada.

En las condiciones concretas de pacientes con curva de elevación significativa de la curva del **RIBOGRAMA** y en que la colonoscopia no muestre ninguna lesión sospechosa de eventual malignización, esto significa que el paciente esta en un proceso de potencial desarrollo de una proliferación aumentada de algún punto de la mucosa que todavía no es visible microscópicamente (endoscopia).

Entonces, una vez que este bien establecido, la relación causa-efecto de ciertos alimentos en la contribución estadísticamente significativamente en provocar la proliferación aumentada de los tejidos,

como la mucosa colorrectal, estos pacientes con curvas de **RIBOGRAMA** con una elevación significativa deberán ser sometidos a una encuesta alimentarias propias de estos casos realizadas también en el seno del estudio realizado con lo que habrá respuestas concretas sobre los desvíos de la normalidad relativamente a ciertos tipos de alimentos y su influencia cultural en la forma de cocinar, donde es posible encaminar a estos pacientes para una consulta de asesoramiento alimentario.

De esta forma, se ve que el método instruye a las personas sobre que alimentos deberán de incidir repetidamente en ciertos alimentos. El sistema científico permitirá una fuerte utilización de monitorización en casos postoperatorios de cirugía colorrectal por **CCR**.

Hoy esta inequívocamente probado que el ácido acetilsalicílico y drogas antiinflamatorias no esteroides, tienen un gran efecto antiproliferativo sobre la mucosa colorrectal.

De esta forma, en un paciente con una elevación significativa de la curva del **RIBOGRAMA** se puede actuar a través de dos medidas sencillas:

- Dieta sin contenido de alimentos que provoquen hiperproliferación de la mucosa colorrectal, orientada según las informaciones y conclusiones de dicha encuesta alimentaria.
- Disminución del nivel elevado de la curva de **RIBOGRAMA** con medicamentos ya utilizada en otros dominios terapéuticos para los cuales han sido aprobados por los organismos oficiales correspondientes.

Reflexiones:

Estamos ante una nueva concepción de actuación medica, en que es el paciente que busca el medico para tratar una sospecha de enfermedad antes de que haya cualquier síntoma o señal clínica.

Esto significa, definitivamente, que una persona solo evolucionará para **CCR**, si le de la espalda que se plantea en este método del **RIBOGRAMA**, que es el cuerpo del presente proyecto que sera evaluado y validado por el Fondo Social Europeo, que ha sido dado el Visto Bueno ante un Tribunal Académico de la Universidad Complutense de Madrid.

Paralelamente, es lo mismo que chequear curvas elevadas de glucosa, colesterol y bajar estos niveles con medidas dietéticas y el uso de medicamentos especiales para estas dolencias.

De esta manera los servicios sociales de salud de los estados pueden, activamente, en modo dirigido, combatir la tendencia de malignización mediante acciones preventivas y curativas, a través de campañas de información en los medios de comunicación sociales, con lo cual tendrá una fuerte repercusión, humana, social política y económica.

Se llega así a un punto ideal de actuación efectiva y eficaz de combate contra un cancer que provoca el mayor numero de victimas en Europa, asi como morbilidad, lo que implica gran discapacidad, hospitalizaciones, utilización de quirófanos, uso de ingresos, UCI, UVI, servicios de radioterapia y quimioterapia, programas de seguimiento de la enfermedad bajo tratamiento, postoperatorio, medicaciones múltiples, análisis de control, TAC, y exámenes de imágenes para descubrir posibles metástasis-

Es sabido que estos pacientes, cuya incidencia de aparición de enfermedad esta cifrada a partir de los cincuenta años de edad, inician un periodo de incapacidad laboral transitoria, con lo que significa que dejan de contribuir a la seguridad social del país, siendo un coste pesado para esta. Una vez que la enfermedad incide sobre pacientes con edad mayor de cincuenta años, esto significa la masa intelectual critica diferenciada del saber de este universo de personas va ha tener influencia substancial en el aparato de formación de los mas jóvenes, que es un aspecto socio científico dentro de la sociedad.

P.S. – Como se torna evidente, o candidato pode expor e apresentar, pessoalmente, qualquer documento comprovativo de tudo quanto expôs no presente curriculum vitae, quando oportunamente solicitado por qualquer entidade hospitalar ou Universitária.