

RIBOGRAMA: nuevo concepto y aplicaciones en el cáncer de colon y recto

POSIBILIDADES DE APLICACIÓN PRÁTICA DEL MÉTODO RIBOGRAMA

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.

I - ABSTRACT

RIBOGRAMA: CONCEPT AND APPLICATIONS IN COLON AND RECTUM ONCOLOGIC CLINIC

The purpose of this research, which was presented as Doctoral Thesis, with the above title, is the following:

Draft a method of diagnosis, tracking and monitoring the colon and rectum cancer founded on technical and current concepts of Molecular Biology. This allows the "pre-carcinoma in situ" diagnostic since it is based in the phenotype of mucosa cells composed of very high quantities of free ribosomes in its cytoplasm, which can be quantified by means of the of the flow cytometry, after its isolation, and marked with fluorochromes.

The repeated records of those quantities of free ribosomes, establish a graphic curve that represents a malignant tendency, which above a certain level of concentration, allows to say that the cells in a tissue (of the colon and rectum, e.g..) can be considered in the process of developing carcinoma in the colon-rectum mucosa, before any macroscopic viewing (endoscopy). This means, we are facing a new method, on a clear biomolecular level, as shown in this Thesis, which allows a good progress on the macroscopy (endoscopy).

This method exceeds the scope of other non-invasive methods of the colon-rectum (test of occult blood in feces and test of DNA mutations in the same feces, the last of which began to be clinically practiced a little more than a year in the USA and is, at the moment, only in an initial phase in Europe. Thanks to this method, it is possible to have a tracking program (through a non-invasive method with great acceptance by the population), in which all citizens who present a great curve of RIBOGRAMA must be mandatory checked with a therapeutic diagnosis endoscopy and, at the same time, remain under observation and therapy (food diet survey and non-steroidal anti-inflammatory and acetylsalicylic acid), with proven efficiency in the prevention and reduction of the formation of polyps or premalignant tendency, representing savings in the therapeutic inversion of cancer.

II - 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 (1,2). 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 (3). 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 desoxirribonucleico 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 (4,5). 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 ADNr (4,5). El panorama anteriormente descrito reitera lo conocido por los biólogos del cáncer: la biogénesis de los ribosomas y la oncogénesis están íntimamente ligadas.

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 (6,7) y sobre su acumulación durante la inducción de crecimiento en muchos órganos y tejidos (8-11). 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 (12). 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 (13).

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 (14-18). 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 (19), el estudio de la expresión de los genes, incluyendo la síntesis de las proteínas ribosómicas que están bajo control translacional (20,21), el estudio del "assembling" de los ribosomas (22), estudio de la expresión diferencial de las proteínas ribosómicas de la mucosa del colon y recto normal y neoplásica (23), 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 amazon 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 comparten una funcionalidad central originándose a partir de una maquinaria celular común de la cual las células dependen para su proliferación (24). 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 (25). 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 (26-29). 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.

BIBLIOGRAFIA:

1. Darzynkiewicz Z. (1998) Cellular ARN content, a feature correlated with cell kinetics and tumor prognosis. *Leukemia*, 2, 777 – 787.
2. Ruggero D, Pandolfi P.P. (2003) Does the ribosome translate cancer? *Nature Reviews Cancer*, 3, 179 – 192.
3. Derenzini M., Sirri V., Treré D. (1994). Nucleolar organizer regions in tumor cells. *Cancer Journal*, 7, 71 – 77.
4. Pomeroy S.L. et al. (2002) Prediction of central nervous system embryonal tumor outcome based on gene expression. *Nature*, 415, 436 – 442.
5. Derenzini M., Treré D., Pession A., Montanaro L., Sirri V., Ochs R.L. (1998) Nucleolar function and size in cancer cells. *American Journal of Pathology*, 152, 1291 – 1297.
6. Blobel G. and Potter V.R. (1966) Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield. *Science*, 154, 1662.
7. Blobel G. and Potter V.R. (1967) Studies on free and membrane-bound ribosomes in rat liver. *J Mol Biol*, 26, 279.
8. Johnson L.F., Abelson H.T., Green H. and Penman S. (1974) Changes in ARN relation to growth of the fibroblast. I. Amounts of mARN, rARN, and tARN in resting and growing cells. *Cell*, 1, 95 – 100.
9. Loeb J.N. and Yeung L.L. (1975) Synthesis and degradation of ribosomal ARN in regenerating liver. *J Exptl Med*, 142, 575 – 587.
10. Malt R.A. and LeMaitre D.A. (1968) Turnover of ARN in the renoprival kidney. *Am J Physiol*, 214, 1041 – 1047.
11. Tata J.H. (1967) The formation and distribution of ribosomes during hormone-induced growth and development. *Biochem J*, 104, 1 – 16.
12. De Young, Lawrence M., Argyris, Thomas S. and Gordon, Gerald B., (1977), Epidermal Ribosome Accumulation during Two-Stage Skin Tumorigenesis, *Cancer Research* 37, 388-393.
13. Raick A.N. (1974) Cell differentiation and tumor-promotor action in skin carcinogenesis. *Cancer Research*, 34, 2915 – 2925.
14. Blobel G. and Potter V.R. (1967) Studies on free and membrane-bound ribosomes in rat liver. I. Distribution as related to total cellular ARN. *J Mol Biol*, 26, 279 – 292.
15. Mueller S.N. and Argyris T.S. (1975) Free and membrane-bound ribosomes in normal and methylcholantrene-treated mouse epidermis. *Lab Invest*, 32, 209 – 216.
16. Argyris T.S. and Nevar C. (1975) Further studies on the isolation of ribosomes from normal and methylcholantrene-treated mouse epidermis. *J Invest Dermatol*, 65, 334 – 336.
17. Sharma D.S. R., Reid I., Verney E. And Sidransky H. (1972) Studies on the nature of attachment of ribosomes to membranes in liver. I. Influence of Ethionine, Sparsomycin, CCl and Puromycin on membrane-bound polyribosomal disaggregation and on detachment of membrane-bound ribosomes from membranes. *Lab Invest*, 27, 39 – 47.
18. Sjostrand F.S. (1967) *In: Electron Microscopy of cells and tissues*, 444 – 445, New York: Academic Press, Inc.
19. Mueller, Stephen N. and Argyris, Thomas S.(1975), Free and Membrane-Bound ribosomes in normal and Methylcholanthrene-Treated mouse epidermis; Copyright by the International Academy of Pathology.
20. Amaldi F. and Pierandrei-Amaldi P. (1996) Top genes: A translationally controlled class of genes including those coding for ribosomal proteins. *In "Cytoplasmic Fate of Eukaryotic mARN"* (P. Jeanteur, ed.), *Prog Mol Subcell Biol*, 18, 1 – 17. Springer-Verlag, Heidelberg.
21. Meyuhas O., Avril D. and Sharma S. (1996) Translational control of ribosomal protein mARN in eukaryotes. In "Translational control", (J.W.B.Hershey, M.B. Mathews and N. Sonenberg, eds.), 363 – 388. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
22. Greco, Anna and Madjar, Jean-Jacques, preparation of Ribosomes and Ribosomal proteins from cultured cells; *A laboratory handbook*, Second edition, vol.2.
23. Kasai H., Nadano D., Hidaka E., Higuchi K., Kawakubo M., Sato T.A. and Nakayama J. (2003) Differential expression of ribosomal proteins in human normal neoplastic colorectum. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 51, 567 – 574.
24. Hanahan D., Weinberg R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57 – 70.
25. Stanners C.P., Adams M.E., Harkins J.L. and Pollard J.W. (1979). *J. Cell Physiol.* 100, 127 – 138.
26. Sakiyama, H., S. K. Gross and P. W. Robbins (1972). Glycolipid synthesis in normal and virus-transformed hamster cell lines. *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A)*, 69, 872 –876.
27. Bose, S. K. and B. J. Zlotnick (1973). Growth and density – dependent inhibition of deoxyglucose transport in Balb 3T3 cells and its absence in cells transformed by murine sarcoma virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A)*, 70, 2374 – 2778.
28. Hirschberg, C. B, B. A. Wolfund and P.R. Robbins (1975). Synthesis of glycolipids and phospholipids in hamster cells: Dependence on cell density and the cell cycle. *J. Cell. Physiol.*, 85, 31 – 40.
29. Chou, I. N., O'Donnell, P. H. Black and R.O Robbin (1977), Cell density-dependent secretion of plasminogen activator by 3T3 cells. *J. Cell. Physiol.*, 91, 31 – 32.

III - Acumulación de ribosomas en el proceso de oncogénesis. Ribograma

En las décadas de 60 y 70 fueron publicados estudios sobre ribosomas libres y ribosomas ligados a membranas (1,2) y sobre su acumulación durante la inducción de crecimiento en muchos órganos y tejidos (3-6). 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 (7).

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 (8). 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 (9).

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. 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.

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

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 colorrectal de un paciente cuyos registros secuenciales 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.

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.

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 (10).

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. 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 esta correlacionada con la proliferación celular en medios de cultura frescos sin adición de factores de crecimiento al suero (11). 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 (12-15).

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.

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 (16). 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 (17).

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 (18). 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 (19). En otro estudio de cáncer de

mama el test 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 (20).

BIBLIOGRAFIA

1. Blobel G. and Potter V.R. (1966) Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield. *Science*, 154, 1662.
2. Blobel G. and Potter V.R. (1967) Studies on free and membrane-bound ribosomes in rat liver. *J Mol Biol*, 26, 279.
3. Johnson L.F., Abelson H.T., Green H. and Penman S. (1974) Changes in ARN relation to growth of the fibroblast. I. Amounts of mARN, rARN, and tARN in resting and growing cells. *Cell*, 1, 95 – 100.
4. Loeb J.N. and Yeung L.L. (1975) Synthesis and degradation of ribosomal ARN in regenerating liver. *J Exptl Med*, 142, 575 – 587.
5. Malt R.A. and LeMaitre D.A. (1968) Turnover of ARN in the renoprival kidney. *Am J Physiol*, 214, 1041 – 1047.
6. Tata J.H. (1967) The formation and distribution of ribosomes during hormone-induced growth and development. *Biochem J*, 104, 1 – 16.
7. De Young, Lawrence M., Argyris, Thomas S. and Gordon, Gerald B., (1977), Epidermal Ribosome Accumulation during Two-Stage Skin Tumorigenesis, *Cancer Research* 37, 388-393.
8. Levin D.L., Devessa S.S., Godwin J.D. and Silverman D.T. (1974) Cancer rates and risks. Washington D.C: United States Department of Health Education and Welfare.
9. Raick A.N. (1974) Cell differentiation and tumor-promotor action in skin carcinogenesis. *Cancer Research*, 34, 2915 – 2925.
10. Hanahan D., Weinberg R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57 – 70.
11. Stanners C.P., Adams M.E., Harkins J.L. and Pollard J.W. (1979). *J. Cell Physiol.* 100, 127 – 138.
12. Sakiyama, H., S. K. Gross and P. W. Robbins (1972). Glycolipid synthesis in normal and virus-transformed hamster cell lines. *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A)*, 69, 872 –876.
13. Bose, S. K. and B. J. Zlotnick (1973). Growth - and density – dependent inhibition of deoxyglucose transport in Balb 3T3 cells and its absence in cells transformed by murine sarcoma virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A)*, 70, 2374 – 2778.
14. Hirschberg, C. B, B. A. Wolfund and P.R. Robbins (1975). Synthesis of glycolipids and phospholipids in hamster cells: Dependence on cell density and the cell cycle. *J. Cell. Physiol.*, 85, 31 – 40.
15. Chou, I. N., O'Donnell, P. H. Black and R.O Robbin (1977), Cell density-dependent secretion of plasminogen activator by 3T3 cells. *J. Cell. Physiol.*, 91, 31 – 32.
16. De Young L.M., Argyris T.S., Gordon G.B.(1977) Epidermal ribosome accumulation during two-stage skin tumorigenesis. *Cancer Research*, 37, 388 – 393.
17. Chu T.Y., Hwang K.S., Yu M.H., Lee H.S., Lai H.C., Liu J.Y. (2002) A research-based tumor tissue bank of gynaecologic oncology: Characteristics of nucleic acids extracted from normal and tumor tissues from different sites. *International Journal of Gynaecological Cancer*, 12, 171 – 176.
18. Boon K. et al. (2001) N-myc enhances the expression of a large set of genes functioning in ribosome biogenesis and protein synthesis. *EMBO Journal*, 20, 1383 – 1393.
19. Linaggar A.K., Kemp B.L., Sneige N., Hurr K.G., Steck K., Tu Z.N., Pritsche H.A., Singletary S.E., Balch C.M. (1996) Bivariate ARN and ADN content analysis in breast carcinoma: Biological significance of ARN content. *Clinical Cancer Research*, 2, 419 – 426.
20. Lourenco G., Embury S., Schrier S.L., Kedes L.H. (1978). Decreased ribosomal ARN content and in vitro ARN synthesis in purified bone marrow erythroblasts of patients with idiopathic ineffective erythropoiesis and DiGuglielmo disease. *American Journal of Hematology*, 5, 169 – 182.

IV - Consideraciones teóricas sobre una curva gráfica de **RIBOGRAMA**

En el esquema de la **fig. V.1** 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 va construir 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: a) - la “*cantidad (número) media de ribosomas libres*” en el citoplasma de cada célula y b) - el “*tiempo*” a lo largo del cual es observado el comportamiento de ciertas variaciones de esa “*cantidad (número) media de ribosomas libres*”.

Habrà necesidad de criar experimentalmente perfiles gráficos de valores numéricos de la “*cantidad (número) media de ribosomas libres*” que puedan ser fijados como normales, a partir de los cuales se pueda trazar una curva-mediana-padron. 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 de Ribograma) en una determinada comunidad de células de un tejido bajo investigación.

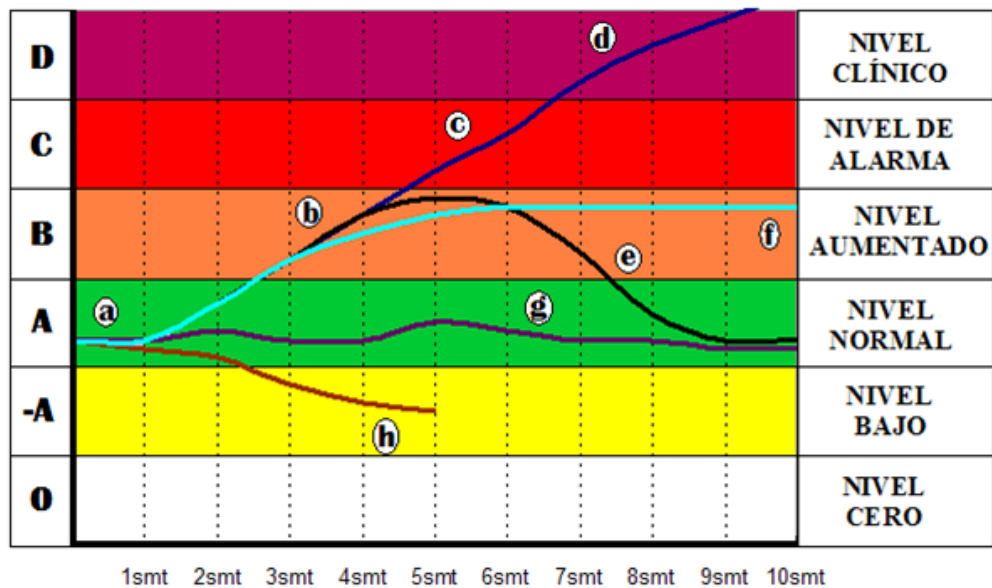
En estudios correlacionados de microscopía electrónica y bioquímica los datos bioquímicos son usualmente cuantitativos, mientras la información morfológica (de la microscopía electrónica) es más limitada o semicuantitativa, basada en descripciones dependientes de criterios subjetivos. Este criterio subjetivo de abordaje en la microscopía 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 Ribograma 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 la **fig. V.1** están representados por B, C y D.

En el eje de las abscisas se inscriben los múltiplos de períodos de seis meses, 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.

V – 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 fig. V.1 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 DE 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 continúa 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.

VI - Características de la malignidad versus conteo de ribosomas libres.

Se verifica que las descripciones de Microscopia Electrónica 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 se 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. En términos de biología molecular del cáncer, la transformación maligna de las células normales consiste en la adquisición progresiva de una serie de cambios genéticos específicos que actúan desobedeciendo a los fuertes mecanismos antitumorales que existen en todas las células normales, los cuales incluyen: a) - regulación de la transducción de señales; b) - diferenciación celular; c) - apoptosis; d) - reparación del ADN; e) - progresión del ciclo celular; f) - angiogénesis; g) - adhesión celular.

Al igual de las descripciones de ME, estos mecanismos de transformación maligna sólo son evaluados a través de criterios subjetivos, en que las características descritas no pueden ser cuantificables matemáticamente, como acontece con las descripciones enumeradas en el cuadro VI.1 . De igual modo, las propiedades de las células transformadas malignas, en crecimiento, en cultura de células, o in vivo, cuando observadas según técnicas de biología celular, o de biología molecular, no posibilitan una evaluación cuantitativa rigurosa, porque dependen de criterios subjetivos, sin límites numéricos, como son las propiedades enumeradas en el cuadro VI.1 (propiedades de las células transformadas malignas creciendo en cultura de células y/o in vivo). Con los ribosomas libres es posible cuantificarlos a través de conteo, utilizando la técnica de citometría de flujo.

CUADRO VI.1

Propiedades de las células transformadas malignas creciendo en una cultura de células y/o in vivo

1. Alteraciones citológicas parecidas con las células cancerosas *in vivo*, incluyendo basofilia citoplasmática aumentada; número y tamaño de los núcleos aumentado; relación núcleo-citoplasmática aumentada; formación de clusters y cordones de células;
2. Alteración en las características de crecimiento:
 - a. "Inmortalidad" de la células transformadas en cultura. Las células malignas transformadas se toman "inmortales", en que ellas pueden ser transferidas en cultura indefinidamente.

- b. Disminución de la inhibición dependiente de la densidad celular o pérdida de la “inhibición de contacto”. Las células transformadas frecuentemente crecen hasta una densidad mas elevada que sus contrapartes normales, y ellas pueden amontonarse en cultura en vez de parar de crecer cuando entran en contacto entre ellas.
 - c. Disminución de las necesidades de suero. Las células transformadas necesitan de concentraciones disminuidas de suero o de factores de crecimiento para replicarse en cultura comparativamente a las células no transformadas.
 - d. Pérdida de la dependencia para anclar y adquisición de la capacidad para crecer en agar blando. Las células transformadas pueden perder su necesidad para crecer adheridas a las superficies y pueden crecer como colonias libres en medio semisólido.
 - e. Pérdida del control del ciclo celular. Las células transformadas no paran en G1, o en el límite G1/S del ciclo celular cuando están sujetas a restricciones metabólicas de crecimiento.
 - f. Resistencia a la apoptosis (muerte celular programada).
3. Cambios en la estructura y función de la membrana celular – incluyendo aglutinación aumentada por las lecitinas de las plantas, alteración en la composición de las glicoproteínas de la superficie celular, proteoglicanos, glicolípidos y mucinas; apareamiento de antígenos asociados a tumores; y aumento de la captación de aminoácidos, hexoses y nucleosidos.
 4. Pérdida de las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular que fomenta la diferenciación celular.
 5. Pérdida de respuesta anti agentes inductores de diferenciación y receptores celulares alterados para estos agentes.
 6. Alteración de los mecanismos de transducción de señal, incluyendo receptores de crecimiento constitutivos, cascadas de fosforilación y mecanismos de defosforilación en vez de una función regulada.
 7. Expresión aumentada de proteínas oncogénicas debido a translocación, amplificación y mutación cromosómicas.
 8. Pérdida de productos proteicos de genes supresores de tumores debido a delección o mutación.
 9. Errores de lectura genómica que llevan a la sobreproducción de sustancias promotoras de crecimiento, e.g., IGF-2.
 10. Aumento o producción desreglada de factores de crecimiento, e.g., TGF-alfa, factores de angiogénesis tumoral, PDGF, factores de crecimiento hematopoiético (e.g., CSFs, interleucinas).
 11. Inestabilidad genética, llevando a la pérdida progresiva de la proliferación celular reglada, invasión aumentada y potencial metastático aumentado. Los genes “mutadores” pueden estar envueltos en este efecto.
 12. Alteración en los cuadros enzimáticos. Las células transformadas tienen niveles aumentados de enzimas envueltos en la síntesis de ácidos nucleicos y producen niveles más elevados de enzimas líticos, e.g., proteasas, colagenasas y glicosidasas.
 13. Producción de productos génicos de oncodesarrollo. Muchas células transformadas malignas creciendo en cultura o in vivo producen cantidades aumentadas de antígenos oncofetales (e.g. antígeno carcinoembrionario), hormonas placentales (e.g., gonadotropina coriónica), o isoenzimas de tipo feto-placentar (e.g., fosfatasa alcalina placentar).
 14. Capacidad para producir tumores animales experimentales. Esta es la condición *sine qua non* que define la transformación maligna *in vitro*. Si las células que se piensa han sido transformadas no produjeren tumores en animales huéspedes apropiados, entonces no pueden ser definidas como “malignas”. Sin embargo, el fallo para crecer en un modelo animal no excluye el hecho que ellas puedan ser tumorigénicas en un animal de tipo diferente.
 15. Capacidad para evitar respuesta inmune antitumoral del huésped.

De estas características, con la evolución de la variable tiempo, no es posible obtener un registro numérico, que pueda constituir, en un conjunto de valores, una expresión gráfica o tendencia, que traduzca matemática y reproduciblemente la tendencia dinámica del estado de crecimiento y proliferación de un conjunto de células pertenecientes a un dado tejido, como en el caso de la mucosa de colon y recto, que es el objeto del ámbito de este estudio.

VII - PROVA DE CONCEITO

Para a compreensão de alguns pontos essenciais da prova de conceito do RIBOGRAMA apresentam-se certos aspectos que se prendem com as fases sobre como irá decorrer a vertente da sua aplicação no cancro colorrectal, para criar um novo método de diagnóstico precoce do Cancro Colorectal, de natureza não invasiva (METODO DO RIBOGRAMA).

A ideia e o fundamento científico encontram-se no *Abstract* de uma TESE DE DOUTORAMENTO (com mais de mil referências bibliográficas), intitulada “**RIBOGRAMA: concepto y aplicaciones en la clinica oncológica de colon y recto**”, que foi submetida a um TRIBUNAL ACADÉMICO DA UNIVERSIDADE COMPLUTENSE DE MADRID, onde obteve a classificação máxima.

Debruçando-nos de uma forma mais analítica sobre a estrutura do trabalho a desenvolver, desde logo se percebe que há vários patamares/secções, que são determinantes para a contagem dos ribossomas livres, numa

determinada unidade de volume, a que se chamam FASES E/OU TÉCNICAS PARA CONCRETIZAÇÃO DO METODO, a saber:

- 01 – Colheita de fezes
- 02 – Colecta e isolamento de colonócitos exfoliados
- 03 - Rotura de tecidos e células
- 04 - Homogeneização
- 05 - Fracionamento subcelular
- 06 - Centrifugação
- 07 - Sedimentação
- 08 - Centrifugação diferencial
- 09 - Equilíbrio de sedimentação
- 10 – Isolamento e preparação de ribossomas livres y marcação com fluorocromos
- 11 - Contagem de ribossomas livres com utilização de citometria de fluxo.

Relativamente a implicações da concretização e execução do método, neste projecto pretendem-se reunir as condições materiais, científicas e recursos humanos para a concretização e execução do método do **RIBOGRAMA**. Deverão ser criados, experimentalmente, perfis gráficos dos valores (“quantidades”) médios de ribossomas livres, que vão ser fixados como normais, para que a partir dos quais se possa traçar uma curva-média-padrão, do tipo da exemplificada na figura da curva gráfica do **RIBOGRAMA**.

A curva normal do **RIBOGRAMA** deverá ser definida com limites de amplitude, dentro de uma zona considerada de normalidade, com base nos resultados de medições de concentrações de ribossomas livres provenientes de colonócitos da mucosa colórectal de pessoas adultas jovens sãs, com idades entre os vinte e os cinquenta anos, de quem se obterão amostras de fezes para isolamento de colonócitos.

Depois de bem definidos os limites da normalidade das concentrações de ribossomas livres será possível fazer estudos comparativos, o que permitirá criar níveis de tendências da doença maligna (por elevação da curva de **RIBOGRAMA**) a partir da sequência de certos valores dos resultados encontrados, com o decurso do tempo.

O método é concebido para trabalhar com produtos de excreção do corpo humano, que em circunstâncias correntes e habituais são lançados no sistema de esgotos da rede pública. No desenvolvimento do método não há nenhum procedimento sobre el corpo humano, e a tramitação técnico-científica obedecerá ao anonimato e confidencialidade médica, no que respeita a identificação de cada pessoa da qual serão obtidas as amostras de fezes para estudo. Desta forma, não será possível a ninguém saber a quem pertencem as amostras de fezes sob estudo laboratorial.

Para traçar os limites do estudo na população alvo há que ter em conta que o cancro colórectal (CCR) esporádico (o que não depende de características heredofamiliares) tem essencialmente o seu aparecimento a partir dos cinquenta anos de idade.

Assim, para este estudo prospectivo, para a construção da curva gráfica normal do **RIBOGRAMA** e dos segmentos dessa curva fora dos limites da normalidade, serão constituídos quatro grupos de pessoas/pacientes, utilizando os seguintes critérios:

GRUPO I – Pessoas/pacientes com idade não superior ao limite máximo dos cinquenta anos, consideradas clinicamente saudáveis, que não tenham na sua história clínica hábitos intestinais de defecação com qualquer episódio de perda macroscópica de sangue nas fezes, nos últimos três anos, das quais se obterão amostras de fezes;

GRUPO II – Amostras de fezes de pessoas submetidas a rectosigmoidoscopia/colonoscopia, com resultado macroscópico negativo para pólipos ou formações polipoides;

GRUPO III – Amostras de fezes e material de biópsia de pessoas submetidas a rectosigmoidoscopia/colonoscopia, com resultado macroscópico positivo para pólipos, formações polipoides, ou suspeitas de cancro;

GRUPO IV – Amostras de fezes e material de biópsia de pecas operatórias de pessoas submetidas a cirurgia de cancro colórectal.

O número de amostras de pessoas consideradas normais, clinicamente sem queixas e sem sintomas atribuíveis ao tracto do colon e recto, para calibração da curva normal, deverá ser na ordem das 50.

Obter-se-á de cada pessoa saudável seleccionada, para o estudo de calibração da curva normal, uma amostra com intervalos de 3 meses, o que significa que de cada pessoa são obtidas 4 amostras em cada ano.

O estudo para calibração decorrerá durante pelo menos dois anos, o que significa que se obterão 8 amostras de fezes de cada pessoa num período de dois anos. Assim, serão necessárias 150 a 200 pessoas voluntárias, nas condições descritas no **GRUPO I**. As pessoas nas condições descritas serão seleccionadas de instituições públicas e/ou privadas, ou serviços de saúde, onde se realizem colonoscopias e/ou rectosigmoidoscopias, assim como de casos de cirurgia de colon e recto relativamente ao **GRUPO IV**.

São estes os aspectos essenciais para que se possa avançar para a prova de conceito deste novo método.

Do que ressalta do método é o seu aspecto de rigor, podendo quantificar e temporizar a evolução do processo de carcinogénese em curso, em qualquer paciente, aleatoriamente.

Daqui resulta a sua vertente prática e económica para a comunidade e o acesso fácil para a execução do método, quer para os pacientes/doentes, numa perspectiva de diagnóstico e follow up, quer para a população em geral, numa perspectiva de rastreio, com o que isso significa na poupança de vidas, quando se encara a incidência deste cancro numa população com os seus hábitos de vida e cultura alimentar transgeracional.

Para o médico o método toma-se num instrumento de monitorização, na medida em que permite verificar qual a evolução (quantificada) do risco de malignização das células da mucosa colorectal, permitindo-lhe intervir no curso do comportamento fenotípico dos colonócitos, através de medicação que já existe (ácido acetilsalicílico e anti-inflamatórios não esteróides) e com a seleção criteriosa de certos tipos de alimentos, quer na natureza dos mesmos, quer na forma como são confeccionados.

Tudo isto será como utilizar a mesma metodologia de procedimentos como a que se emprega no tratamento de qualquer doença que tenha uma componente metabólica, ou outra (gota, dislipidemias, diabetes, hipertensão, etc), cujo controlo médico depende de monitorização quantitativa, medicação, orientação na escolha dos alimentos e adesão do paciente aos princípios e conselhos veiculados pelo médico assistente.

Em síntese, pode dizer-se que se está perante um método eminentemente prático e económico, para o paciente e para o médico permite encarar a enfermidade oncológica do colon e recto como uma enfermidade crónica, que pode ser controlada, em larga escala, sem recurso a metodologias invasivas as cegas, salvo se o paciente chega ao médico já com pólipos formados. Há nesta metodologia a força prática que permite colocar os pacientes com curvas de **RIBOGRAMA** elevadas em grupos de risco, os quais, então, têm indicação formal para serem estudados e tratados por via endoscópica. Apesar de tudo, há “papers” publicados que falam em desaparecimento de pólipos com o tratamento com base em dieta e prescrição da medicação acima referida.

Com este método é possível fazer baixar significativamente o número de mortes por cancro colorrectal, nos 27 países da União Europeia, se adoptarem medidas sanitárias de rastreio e diagnóstico, porque o grau de adesão das populações será bastante elevado, atendendo ao seguinte somatório de factores “simpáticos”:

- 01- Não há acto invasivo;
- 02- Não há necessidade, por parte do paciente, de manipular as suas próprias fezes durante a colheita;
- 03- Não há incómodo do cheiro fecal uma vez que o colector de fezes está concebido industrialmente nesse sentido;
- 04- Não é necessária preparação intestinal;
- 05- Não são necessários clisteres de limpeza;
- 06- Não é necessária a utilização de catárticos;
- 07- Não é necessária a deslocação do paciente a uma consulta médica, ou a um centro de exames médicos;
- 08- O paciente não tem de alterar o seu ritmo de vida;
- 09- O paciente não tem que alterar a rotina das suas actividades diárias ou de trabalho;
- 10- O paciente não tem necessidade de alterar o seu ritmo e tipo de alimentação;
- 11- O paciente não tem que interromper, nem modificar nenhuma medicação;
- 12- Não existem resultados falsos negativos, nem falsos positivos, porque na sua especificação o teste limita-se a contar os **ribossomas livres** dos colonócitos, que são as células que estão malignizadas nos casos de cancro colorrectal, ou nos casos em processo de malignização.

Em resumo, as vantagens do teste do **RIBOGRAMA** sobre os outros testes não invasivos do cancro de colon e recto são doze factores evidentes que por si sós permitem uma boa adesão dos pacientes e uma preferência determinante para os profissionais da saúde, porque não há resultados falsos positivos nem falsos negativos, uma vez que se estão a estudar as cargas de ribossomas das células isoladas da mucosa colorrectal.

O projecto consiste na realização de uma prova de conceito, durante pelo menos dois anos, que permitirá a validação dos resultados, com os quais se poderão fazer estudos comparados e assim ser possível tomar como bons e credíveis os valores de quantificação dos níveis de ribossomas livres, que são os responsáveis pela fabricação das proteínas que servem para a duplicação do conteúdo proteico de célula, que nos estados de malignidade não tem um autocontrolo.

Com este método é possível evitar que as pessoas sejam surpreendidas com um cancro colorrectal, com invasão da submucosa, porque, como é visível, o aumento da quantidade de ribossomas livres, acima de um certo nível, definido na prova de conceito a desenvolver no projecto, antes da aparição de qualquer pólipo, é fácil saber que um paciente passou a ter um critério importante para ser incluído num grupo de risco, no qual ainda que não exista qualquer lesão com risco de malignização a nível histológico, como por exemplo um pólipo aparentemente benigno, já existe um perfil bioquímico de malignidade.

Este método é único a nível da comunidade científica mundial, e terá reflexos incomparáveis na economia dos países. Ou seja, antes que haja alguma lesão maligna, visível em microscopia óptica (anatomia patológica), perante uma colonoscopia, será possível o médico estar seguro se há ou não um processo de hiperproliferação celular, traduzido por um excesso de ribossomas livres no citoplasma dos colonócitos, o que é característica comum nos tecidos malignizados, ou com tendência para a malignização.

Face a este método, os marcadores celulares/tumorais, que são proteínas, são menos sensíveis para o estudo da malignização, uma vez que são elementos fabricados nos ribossomas livres, o que equivale a dizer que estes são os elementos fenotípicos de monitorização da malignidade, situados a montante (*upstream*) na cadeia de fabricação/proliferação celular. Ou seja, os marcadores celulares/tumorais, no seu aparecimento, estão a jusante (*downstream*) das variações da curva de concentração dos ribossomas livres (curva do **RIBOGRAMA**).

O método (**RIBOGRAMA**) permitirá, de uma forma quantificada e não invasiva, uma fácil adesão da população, através do estudo do padrão da quantidade dos ribossomas livres nas células da mucosa colorrectal, que se misturam nas fezes, sendo a colheita possibilitada a partir de um colector de fezes, encaixável no sanitário da casa de banho, em casa de cada paciente que opte por realizar o teste, sem que ele tenha necessidade de manipular as suas próprias fezes. Tal como se encontra descrito no *Abstract*, anexo a esta abordagem, o método dá um resultado numérico concreto, é convincente para o agregado familiar do paciente e para aqueles com quem ele fala, nas preocupações do dia-a-dia, levando a que outras pessoas sejam induzidas a realizá-lo, como acontece com o controlo de doenças tratáveis e controláveis.

Ao paciente basta levar para sua casa o “colector” de fezes, que o comprará numa farmácia, numa parafarmácia, ou numa superfície comercial e, depois da colheita de fezes orientada por um pequeno livro de instruções ilustrado, o entregará num laboratório de análises clínicas, que tenha idoneidade técnica e a respectiva acreditação.

As consequências práticas resultantes deste método levam a que haja uma diminuição acentuada dos gastos resultantes com o tratamento do cancro colorrectal, porquanto as pessoas sabem quando devem ir a uma consulta médica, quando a curva do seu **RIBOGRAMA** dá informações, em tempo precoce e útil, do seu risco de poderem vir a ter o aparecimento de um pólo maligno, que surgirá na sequência de um aumento persistente da curva de **RIBOGRAMA**, antes de qualquer colonoscopia.

Os pacientes podem repetir a sua prova de **RIBOGRAMA** dentro de uma periodicidade curta, sem o risco de serem surpreendidas com uma lesão no caminho da malignidade, a custos baixos, sem terem de fazer uma colonoscopia as cegas, com incomodidade, os seus custos e a sua preparação.

Falando de custos com a enfermidade, que uma vez diagnosticada num estadio de cancro que ultrapassou o limite da submucosa, pode-se falar em encargos múltiplos, como consequência do cancro colorrectal, que se podem enumerar de seguida:

- 01 - Encargos com bloco operatório;
- 02 - Encargos com cuidados intensivos e / ou sala de recobro de pacientes operados;
- 03 - Encargos com o internamento do paciente, como consequência da operação;
- 04 - Encargos com a quimioterapia e outros medicamentos;
- 05 - Encargos com os exames de follow up;
- 06 - O sistema de Segurança Social deixa de receber a contribuição de um cidadão activo e passa a pagar a um incapacitado;
- 07 - Usualmente o paciente não vai só a uma consulta e a tratamentos de follow up, levando com ele um familiar, ou amigo, que não trabalhará no seu local de trabalho, com perda da produtividade.

Seria útil a apresentação de um Simpósio relacionado com o tema, destinado a investigadores, docentes, empresários e a investidores sobre o tema **RIBOGRAMA**, focando os múltiplos aspectos ligadas ao comportamento fenotípico de uma célula em processo de malignização, para revelar as potencialidades do método, que se tomará uma ferramenta universal para o estudo e investigação em oncologia e outras áreas, como a toxicidade de substâncias sobre a homeostasia da célula, na indústria farmacêutica e na indústria agroalimentar.

VIII - FASES DE EXECUÇÃO

Para a realização da prova de conceito, relativamente ao **MÉTODO DO RIBOGRAMA**, torna-se imprescindível ter em consideração quais as fases para a concretização e/ou as técnicas do mesmo, o que equivale a dizer que têm de ser criadas as condições próprias para suportar a realização das várias fases e/ou técnicas enumeradas no elenco atrás referido (de 01 a 11):

Fase 01 – Colheita de fezes – para a qual já existe um protótipo industrial concebido, de que se apresenta um ficheiro em anexo, em suporte informático, no qual estão desenhos em 2D e 3D.

Esta fase desenrola-se em casa do paciente.

Fase 02 – Colecta e isolamento de colonócitos exfoliados – é a fase em que as células descamadas da mucosa colorrectal são arrastadas da superfície das fezes, mediante a introdução no colector de um soro de preservação de

colonócitos, através de uma abertura existente no colector, sem necessidade de manipulação das fezes, do que resulta um “lavado de fezes”. Atendendo ao “design” da forma como o colector foi concebido, toma-se simples a separação do “lavado de fezes” das próprias fezes, através de um sistema de duas câmaras cilíndricas ligadas por uma válvula unidirecional, que se abre com um simples gesto, de acordo com a ilustração do manual de instruções que acompanha o *kit* de colheita de fezes. Deste modo, o “lavado de fezes” é drenado para um cilindro inferior ao colector de fezes, as quais permanecem no cilindro superior que é descartável, com as mesmas. No cilindro inferior ficará colectado o “lavado de fezes” com grandes quantidades de colonócitos.

Esta fase desenrola-se em casa do paciente.

Fases 03 a 09 – **Estas fases desenrolam-se no laboratório**, com utilização de tecnologia standardizada, existente há décadas nas rotinas laboratoriais. Para este efeito, já se está em conversação avançada com duas instituições universitárias para eventual colaboração com o projecto.

Fase 10 – **Esta fase (nanotecnologia) desenrola-se no laboratório**, consistindo na ligação covalente de duas partículas: - um ribossoma e uma molécula de um fluorocromos (marcação dos ribosomas).

Fase 11 – Contagem dos ribosomas livre marcada, com utilização de aparelhos de *flow sensing* (do tipo dos de citometria de fluxo), que permitem a contagem de 50 a 70 mil partículas por segundo. Esta fase também se desenrola no laboratório.

Este protocolo de acções tem de desenrolar-se sem omissão de qualquer das fases, porquanto a metodologia do **RIBOGRAMA** é para ser utilizada nas condições de colheita que se enquadram num cenário que vai desde a proximidade do paciente ao laboratório até ao que vive afastado dum centro de recolha do produto biológico (células da mucosa do colon em soro de preservação, o qual não permite que haja autólise das mesmas, conseguindo-se, assim, a integridade dos ribosomas livres destinados a contagem). Com o registo gráfico dos resultados encontrados nas sucessivas leituras far-se-ão curvas gráficas (**RIBOGRAMA**), cuja leitura permite verificar qual a tendência proliferativa das células da mucosa colorrectal.

IX - MECANISMOS BIOMOLECULARES DE LA BIOGENESE DE LOS RIBOSOMAS LIBRES:

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

La producción de ribosomas maduros, que son competentes para la traducción celular del mRNA necesita de un proceso “multistep” que es altamente coordinado en las células eucariotas. 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.

De hecho, los ribosomas tienen la misión de producir correcta y eficientemente todas las proteínas de la célula. 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 tumorigenesis ha sido largamente olvidado. Por ejemplo, en los comienzos de los años 70, los cambios en el nucléolo han sido reconocidos como un importante marcador de la transformación celular (1).

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. El gen *DKC1* (Dyskeratosis congénita) está mutado en pacientes con la dyskeratosis congénita, que es una enfermedad caracterizada por envejecimiento prematuro y un aumento de la susceptibilidad para el cáncer (2,3). El *DKC1* codifica la disquerina, una sintasa pseudouridina que hace la mediación post-transcripcional del ARN ribosómico. Se identificaron mutaciones en el gen que codifica la proteína ribosómica S19 en otro síndrome que es caracterizado por un aumento de la susceptibilidad para el cáncer – Anemia de Diamond-Blackfan (4).

El crecimiento y proliferación celular están asociados con cambios en la tasa de producción de los ribosomas. 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 (5). 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 (6,7). Por eso, existe una relación importante entre el ciclo celular y la producción de los ribosomas.

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. La síntesis del rARN es el primero evento en la biogénesis del ribosoma. Está dependiente de la regulación del rADN por la ARN polimerasa I (Pol I) en el nucléolo. La síntesis de rARN en la célula puede ser inducida por estímulos extracelulares en ciertos momentos cuando una célula necesita de crecer y proliferar.

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 (8). Desde entonces, muchos otros artículos han mostrado que la iniciación de la transcripción de rARN está íntimamente ligada a la progresión del ciclo celular. La síntesis del rARN es máxima en las fases S y G2 y reprimida en la mitosis y aumentada en G1 (9,10,11).

Estas fluctuaciones en la síntesis de rARN dependientes del ciclo celular están dependientes de la actividad de Pol I. La transcripción del factor UBF (upstream binding factor) es una llave reguladora de la síntesis de rARN teniendo la capacidad de modular la actividad transcripcional de Pol I (12-14). Más aún, varios proto-oncogenes y supresores de tumores regulan directamente la síntesis de rARN por potenciación o represión de la actividad del UBF, respectivamente.

La primera proteína identificada que regula la actividad de UBF ha sido la CKII - casein kinase II (15), una quinasa serina - treonina que tiene aumentada su expresión en muchos cánceres, incluyendo leucemias y tumores sólidos. La CKII ha sido responsable de contribuir a la tumorigenesis a través de la interacción directa con la maquinaria del ciclo celular. Además, esta fosforila el UBF en el carboxilo terminal y por eso regula la transcripción del rADN. Hay estudios subsecuentes que han estudiado otras quinasas de UBF que también están desarreglados en el cáncer y afectan similarmente la síntesis del rARN (16,17). Se sabe, desde hace más de 25 años, que la tasa de proliferación y crecimiento celular es proporcional a la tasa de síntesis proteica (18,19). Además, la desregulación aumentada de las quinasas UBF en los cánceres puede estimular la síntesis de rARN y contribuir a sus propiedades oncogénicas. Por eso, la perturbación del control de la síntesis proteica puede toma las células más susceptibles para desarreglar el crecimiento y proliferación celular.

La desregulación aumentada de las r-proteínas en las células cancerosas corresponde razonablemente a su involucramiento en la producción de ribosomas. 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 reglar el número de ribosomas funcionales en la célula. En ambos casos las células que contienen más ribosomas tendrían una tasa de traducción aumentada, que promovería la transformación celular (20,21).

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. 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. Este sistema apretado de autorregulación entre los ribosomas y el ciclo celular podrá funcionar para mantener la homeostasis celular. Por eso, un aumento en la cantidad de ribosomas, como consecuencia de algún efecto a montante, afecta la traducción de las proteínas y puede contribuir para el proceso de transformación. Sin embargo, en el presente, no es posible saber en concreto se hay algún "cross-talk" entre los ribosomas y el ciclo celular.

BIBLIOGRAFIA

1. Ruggero, D. et al. Dyskeratosis congenita and cancer in mice deficient in ribosomal ARN modification. *Science* 299, 259-262 (2003).
2. Draptchinskaia, N. et al. The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nature Genet.* 21, 169-175 (1999).
3. Pardee, A. B. G1 events and regulation of cell proliferation, *Science* 246, 603-608 (1989).
4. Pyronnet, S. & Sonenberg, N. Cell-cycle-dependent translational control, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 13-18 (2001).
5. Grummt, I. Regulation of mammalian ribosomal gene transcription by ARN polymerase I. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 62, 109-154.
6. Grummt, I., Smith, V.A. & Grummt, F. Amino acid starvation affects the initiation frequency of nuclear ARN polymerase. *Cell* 7, 439-445.
7. Kief, D. R. & Warner, J.R. Coordinate control of syntheses of ribosomal ribonucleic acid and ribosomal proteins during nutritional shift-up in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 1, 1007-1015 (1981).
8. Klein, J. & Grummt, I. Cell cycle-dependent regulation of ARN polymerase I transcription: the nucleolar transcription factor UBF is inactive in mitosis and early G1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 6096-6101 (1999).

9. Orfao A, González M, Ciudad J, López-Berges MC, López A, San Miguel JF, et al. Aplicaciones de la citometría de flujo en el diagnóstico hematológico. *Biol Clin Hematol* 1992; 13: 456-523.
10. Cavanaugh, A.H. et al. Activity of ARN polymerase I transcription factor UBF blocked by gene product. *Nature* 9, 177-180 (1995).
11. Beckmann, H., Chen, J.L., O'Brien, T. & Tjian, R. Coactivator and promoter-selective properties of ARN polymerase I TAFs. *Science* 270, 1506-1509 (1995).
12. Brandenburguer, Y., Jenkins, A., Autelitano, D. J. & Hannan, R. D. Increased expression of UBF is a critical determinant for rARN synthesis and hypertrophic growth of cardiac myocytes *Faseb J.* 15, 2051-2053 (2001).
13. Voit, R., Hoffmann, M. & Grummt, I. Phosphorylation by G1-specific cdk-cyclin complexes activates the nucleolar transcription factor UBF. *Embo J.* 18, 1891-1899 (1999).
14. Voit, R. & Grummt, I. Phosphorylation of UBF at serine 388 is required for interaction with ARN polymerase I and activation of rADN transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 13631-13636 (2001).
15. Baxter, G. C. & Stanners, C.P. The effect of protein degradation on cellular growth characteristic. *J. Cell. Physiol.* 96, 139-145 (1978).
16. Voit, R. et al. The nucleolar transcription factor mUBF is phosphorylated by casein kinase II in the C-terminal hyperacidic tail which is essential for transactivation. *Embo J.* 11, 2211-2218 (1992).
17. Johnson, L. F. Williams, J. G., Aberlson, H. T., Green, H. & Penman, S. Changes in ARN in relation to growth of the fibroblast. III. Posttranscriptional regulation of mARN formation in resting and growing cells. *Cell* 4, 69-75 (1975).
18. Jefferies, H. B. et al. Rapamycin suppresses 5'TOP mARN translation through inhibition of p70s6k. *Embo J.* 16, 3693-3704 (1997).
19. Kawasome, H. et al. Targeted disruption of p70 (s6k) defines its role in protein synthesis and rapamycin sensitivity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95, 5033-5038 (1998).
20. Orfao A, Ciudad J, López A, López-Berges MC, Vídriales B, Macedo A, et al.. La citometria de flujo en el diagnóstico clínico. Servicio General de Citometria. Universidad de Salamanca, 1993.

X - CONCLUSIONES

01 - - Existe evidencia bien establecida (y reciente) que sostiene acentuadamente la idea de que el contenido de ARN está elevado en las células cancerosas y que los eventos genéticos que llevan al cáncer están frecuentemente ligados, directa e indirectamente, a la biogénesis de los ribosomas;

02 - Así, el aumento significativo del número de ribosomas libres acumulados en el citoplasma de una comunidad de células de cualquier tejido (mediante el conteo con un citómetro de flujo, después de aislados y marcados con partículas fluorescentes — fluorocromos) puede constituir uno de los aspectos fenotípicos de la expresión de malignización de la estructura fina de las células transformadas;

03 - En las células en proceso de malignización, el aumento del número de ribosomas libres arriba de un cierto nivel de concentración (por unidad de volumen) que sea establecido como límite del padrón de normalidad, constituye un signo cuantificable de la tendencia de la expresión de malignidad. La verificación de ese aumento se observa antes que la estructura morfológica fina global de una célula transformada, o del tejido al cual pertenece, asuma un carácter instalado de malignidad;

04 - La expresión fenotípica representada por el aumento significativo de ribosomas libres es una característica del crecimiento neoplásico y podrá representar un aspecto predictivo de la tasa de proliferación celular y de pronóstico de los pacientes;

05 - En los mamíferos, hay evidencia de que existen cuatro tipos principales de células diferenciadas en el epitelio del intestino delgado: columnar veloso, mucoso, entero-endocrino y células de Paneth, que se originan del mismo precursor, que es un componente de la familia denominada por células cripto-base. Estas células precursoras tienen carácter proliferativo, que en la mucosa del colon descendiente están localizadas en la base de la cripta, mientras en el colon ascendiente se encuentran en medio de la cripta;

06 - Estas células epiteliales precursoras del tubo digestivo pasan a través de varios estadios, empezando como "stem cells", que se dividen y producen nuevas "stem cells" y células como las células precursoras "no-comprometidas" y/o "comprometidas", y son las responsables de la auto-renovación continua del epitelio gastrointestinal a lo largo de la vida;

07 - Las "stem cells", que son células epiteliales especializadas por su capacidad de auto-manutención, proporcionan la base de replazamiento celular en desarrollo. Estas células se dividen asimétricamente y producen

una "stem cell" que se mantiene multipotente e indiferenciada y una célula hija, que está comprometida con la diferenciación;

08 - Las células hijas comprometidas sufren varios ciclos de división celular adicionales, mientras migran de un compartimento proliferativo hacia un compartimento diferenciado. Por eso, en el sistema gastrointestinal maduro hay, en todos los momentos, ya sea "stem cells" pluripotentes, que son células indiferenciadas, o células diferenciadas, que son células epiteliales funcionales. Más del 85% de todo el tejido epitelial en el colon comprende los coloncitos;

09 - Estudios morfológicos y bioquímicos sugieren que los ribosomas de las células de los mamíferos están libres en la matriz citoplasmática (ribosomas libres) o ligados a las membranas citoplasmáticas que forman parte del reticulum endoplasmático rugoso (ribosomas ligados a membranas);

10- Hay evidencia morfológica y fisicoquímica de que los tejidos bien diferenciados difieren de los pobremente diferenciados en que los últimos tienen una proporción más elevada de ribosomas libres;

11 - La producción de los ribosomas es una actividad metabólica importante ligada al crecimiento celular y recientes datos sugieren que el nucléolo también juega un importante papel en la regulación del ciclo celular, en la senescencia y en las respuestas al stress;

12 - La biogénesis de los ribosomas envuelve la síntesis de rARN, la maduración y el "assembly" del ARN y de las proteínas ribosómicas en las sub-unidades ribosómicas, pequeñas y grandes;

13 - La biogénesis de los ribosomas es regulada a través del ciclo celular, primariamente al nivel de la síntesis de rARN;

14 - Están desarrolladas investigaciones por oncobiólogos que han demostrado que la expresión de las alteraciones del rADN y de los genes de las proteínas ribosómicas están asociadas con el desarrollo de tumores, así como varios estudios citológicos evidencian que los nucléolos (los sitios en donde el rARN es sintetizado y los ribosomas son "assembled") de las células cancerosas están aumentados porque tienen una actividad transcripcional aumentada, representando aspectos predictivos de la tasa de proliferación celular y del pronóstico de los pacientes, motivo por el cual, las células cancerosas tienen una elevada expresión de las proteínas ribosómicas, revelando contenidos más elevados de ribosomas, lo que explica que la biogénesis de los ribosomas y la oncogénesis están íntimamente conectadas;

15 - Por su dimensión (25 nanómetros) los ribosomas sólo pueden ser estudiados con los recursos de la nanotecnología;

16 - Con el presente estudio se demuestra que es posible definir algunos principios orientadores sobre el valor y significado del aumento del número de ribosomas libres arriba de un cierto nivel de concentración, establecido como el límite de la normalidad;

17 - Este aumento significativo progresivo del número de ribosomas libres representa la traducción clínica de la dinámica del proceso bioquímico hacia la malignización de las células en una comunidad celular específica de tejido, u órgano;

18 - La verificación en el ámbito de observaciones de microscopía electrónica muestra la existencia de grandes cantidades de ribosomas libres en tejidos neoplásicos o pre-malignos. Con la citometría de flujo también se comprobará lo mismo, pero de modo cuantificable, después del aislamiento, marcación con colorantes fluorescentes y cuantificación de los ribosomas libres, lo que permite comparaciones;

19 - La comprobación de esas grandes cantidades de ribosomas libres puede ser traducida en una curva gráfica que representa y define, a lo largo del tiempo, la predisposición para la malignización del crecimiento de un tejido, o comunidad celular, bajo ciertas condiciones;

20 - Esa curva gráfica pasará a tener la designación de **RIBOGRAMA**. Tiene una base matemática (pudiendo ser reproducible en circunstancias equivalentes) que corresponde a un lenguaje no subjetivo;

21 - 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;

22 - 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 heredo-familiar y del perfil alimentario, dietético y de hábitos de vida;

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

A - 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;

B - 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 test 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;

C - El test de mutaciones de ADN en las heces tiene falsos positivos y falsos negativos, que varían con gran amplitud, según los autores;

D - La positividad del test de sangre oculta en las heces tiene un porcentaje elevado de falsos positivos, así como los falsos negativos no son despreciables;

E - 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;

F - Las mutaciones en los testes de ADN en las heces pueden ser de otros órganos (árbol respiratorio, aparato digestivo, a montante del colon recto, etc.), no permitiendo la garantía de la localización de un eventual tumor;

G - 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;

H - El test 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;

XI - Potencialidades en la utilización clínica del RIBOGRAMA en rastreo y diagnóstico y “follow up” del cáncer colorectal

La hipótesis en un escenario de utilización del **RIBOGRAMA**, como expresión del comportamiento genotípico de los colonocitos (densidad de ribosomas libres expresos en unidades por volumen, a lo largo del tiempo), abriría las puertas a muchos campos de investigación clínica y laboratorial. Permitiría el rastreo y el diagnóstico precoz del cáncer colorectal en condiciones propicias para poder convencer los familiares a someterse también a un test no invasivo, que no obliga a nadie a manipular sus heces, y a convencerlos, en caso de curvas elevadas de **RIBOGRAMA**, a someterse, muy justificadamente, a una colonoscopia diagnostico-terapéutica, una vez que no hay señales clínicas;

A través del **RIBOGRAMA** de las células descamadas de la mucosa colorectal, vehiculadas en las heces y recogidas en un contenedor apropiado y específico, sin necesidad del paciente manipular sus heces, mediante un diseño creado y adecuado para tal finalidad, las personas tendrían un medio sencillo para adhesión a este medio de diagnóstico rastreo generalizado, y podrían ser orientadas hacia un examen endoscópico, o ser encaminadas hacia un grupo de riesgo, y ser observados y estudiados los perfiles gráficos posteriores de los valores numéricos de ribosomas libres (**RIBOGRAMA**) comparativamente a una curva-mediana-padrón trazada con el estudio de grandes grupos poblacionales.

MADRID, 27.07.2014

A.Ferreira-Alemao MD PhD

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

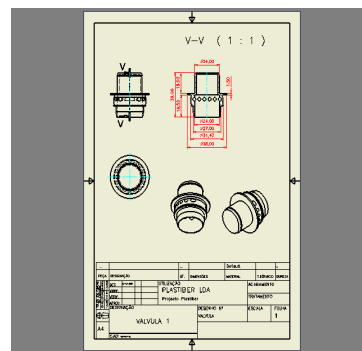
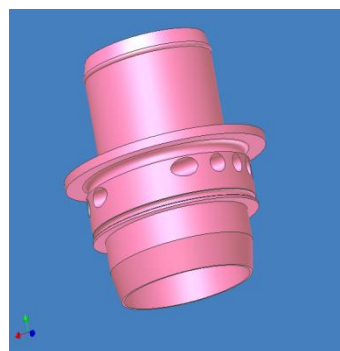
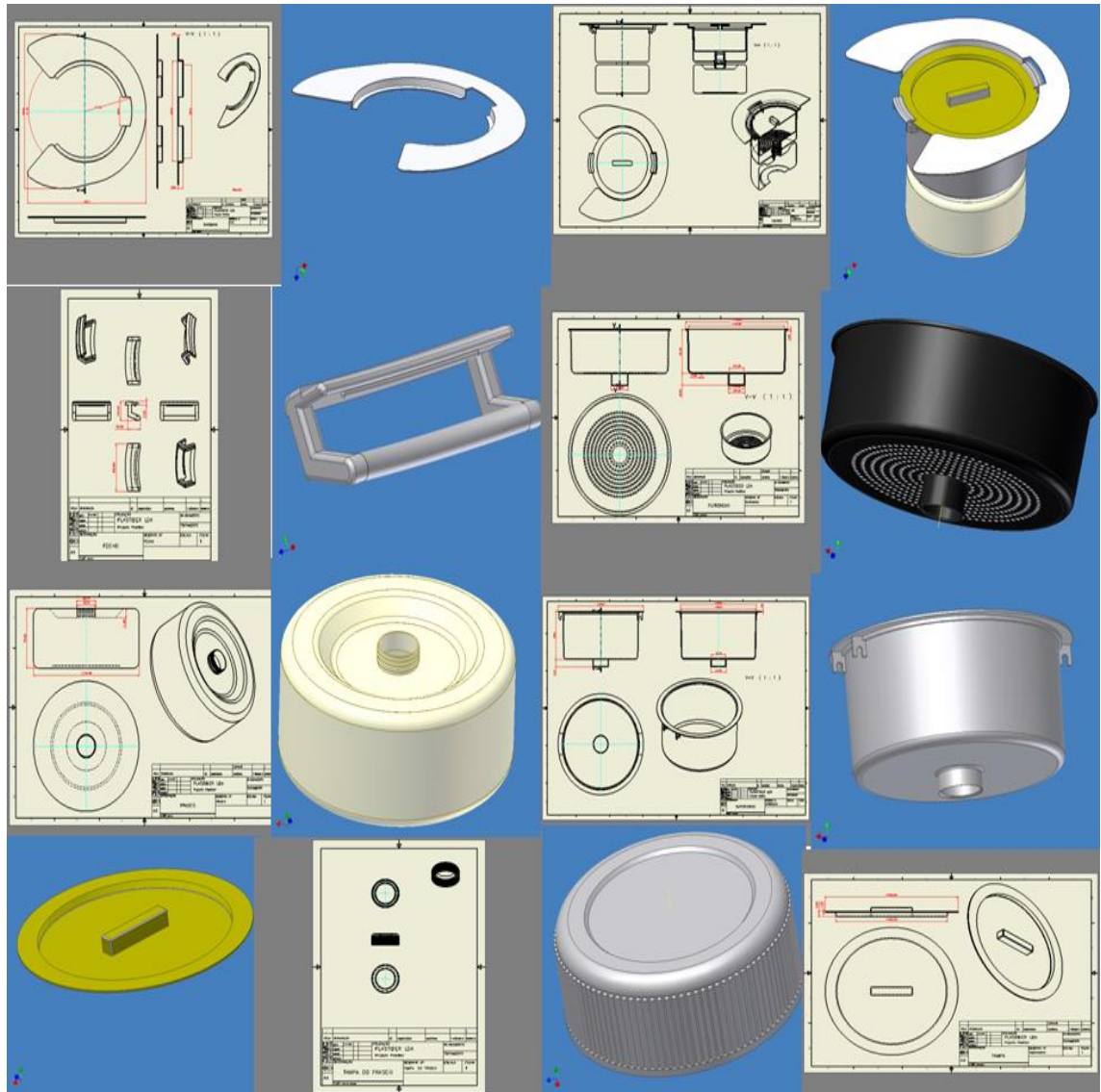
ribograma@gmail.com

www.ribograma.com

Tím : +351 936715488

SUPPORT PROTOTYPE OF FAECES COLLECTION (COLLECTOR)

SUMMARY OF COLECTOR PARTS



COLLECTOR PARTS BREAKDOWN

Figure. 1

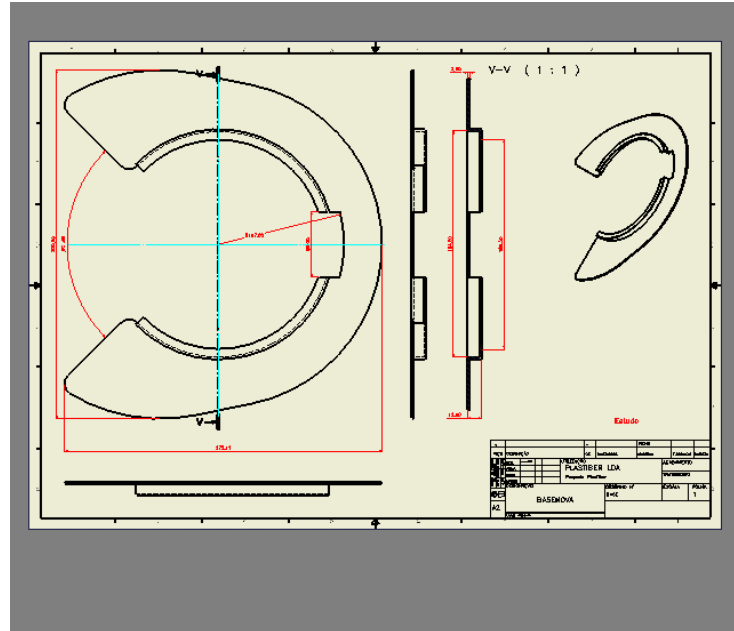
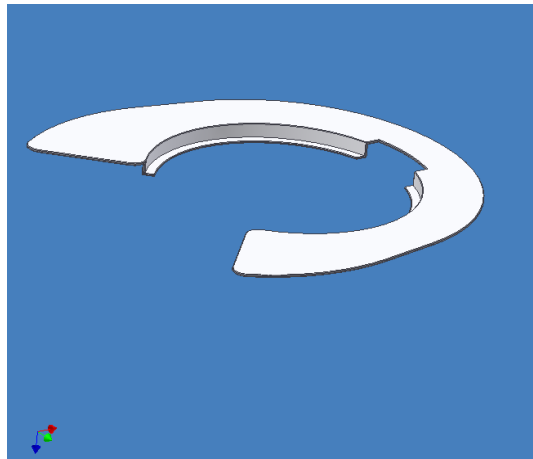


Figure. 2



Figures 1-2 Description:

Support standard collector/container-top-exterior, which will apply in the toilet bowl in the toilet seat being compressed (fixed and immobile) when the patient-user feel for their needs. This support has a socket where the upper rim of the container is immobile, as seen in Figures 1-2.

Figure. 3

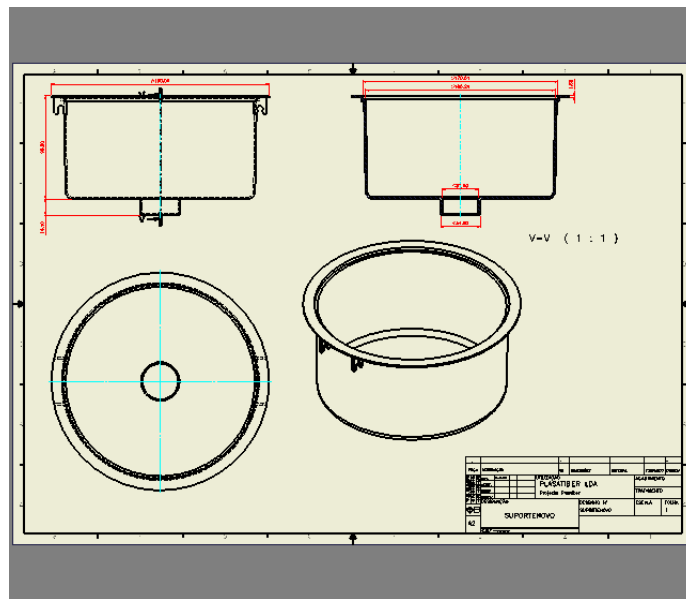
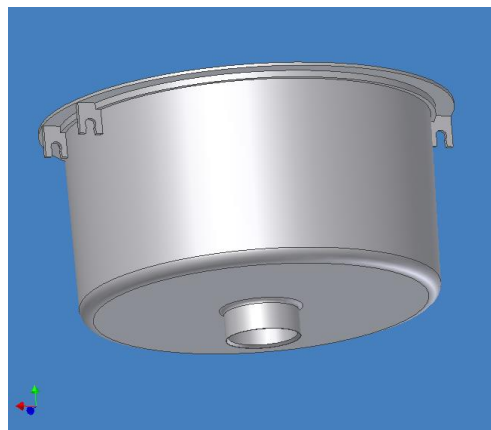


Figure. 4

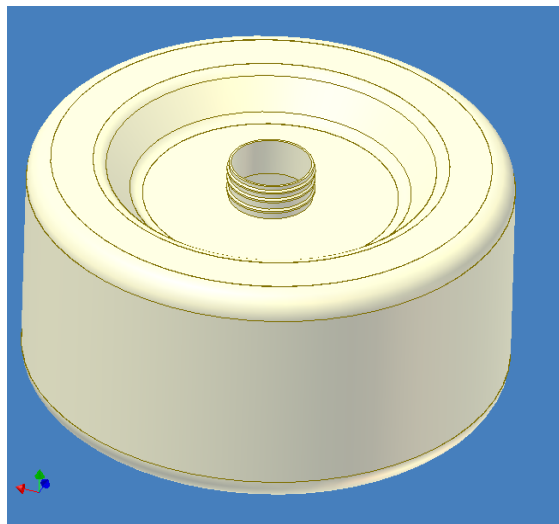
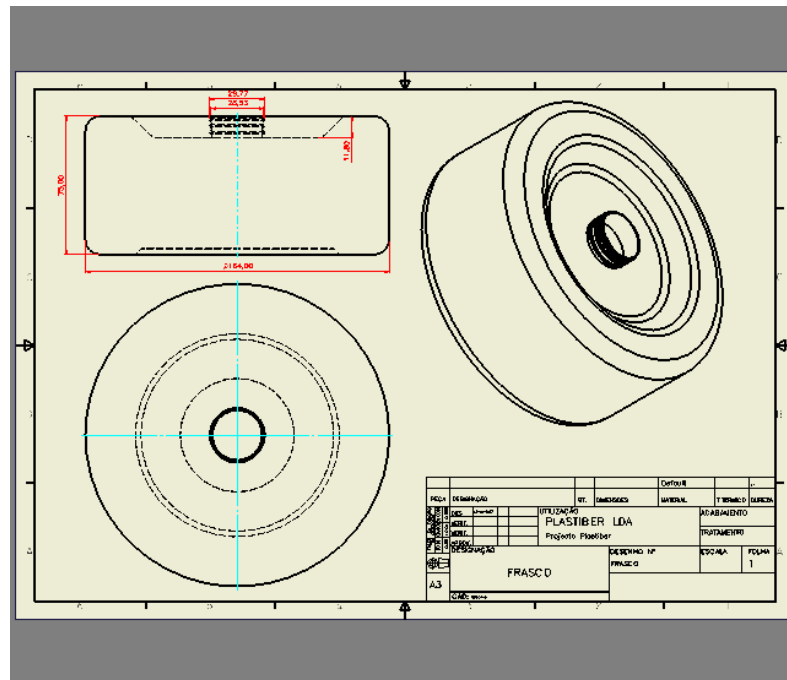


Container/higher external collector

Figures 3-4 Description:

Container/collector-interior of faeces, which is embedded in the part of Figures 1-2, in which side is the container/collector-filtering indoor grill like a piston as if it were a syringe, as shown in Figures 5-6. The container/collector-interior of Figures 3-4 has a central hole in the bottom, like a cylindrical funnel that will fit in a container/collector below (Figures 5-6), where he will collect a washing (serum appropriate for maintaining viability of cells in the mucosa colorectal/colonic). This stool is washing the immersion of the stool in the serum (whose chemical composition is explained in elsewhere), which will flow to the container/collector-bottom as shown in Figures 7-8, after the valve depicted in Figures 9-10, re-opened by a valve mechanism itself, driven by pressure container/collective-external, coaxial with the container/collector-to-bottom. Also verify the existence of a reserve for closing airtight device, described in Figures 9-10.

Figure 5

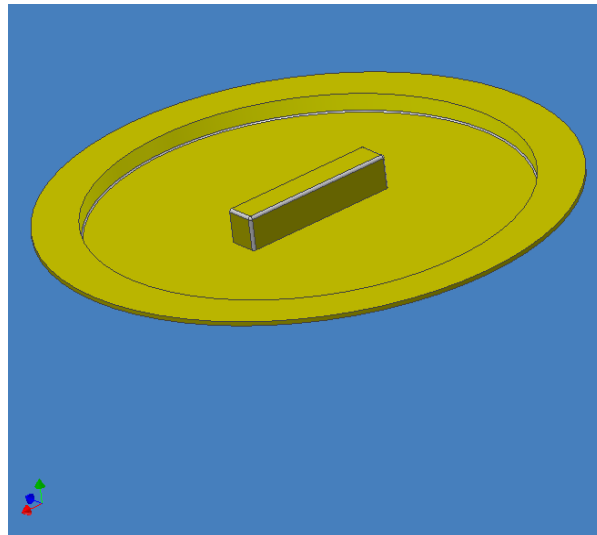
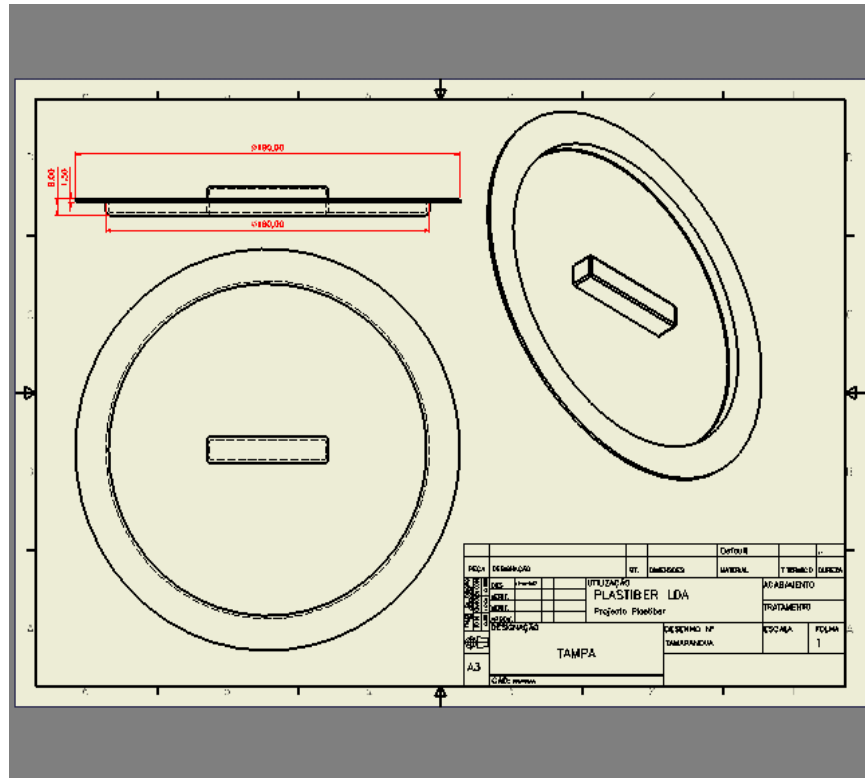


Container/low

Figures 5-6 Description:

Container/collector-less, looking cylindrical with an opening in the upper face, with the cylindrical funnel through which to fit, like a syringe in the other funnel, inside, so coaxial with the funnel at the top, described in Figures 3-4. The CSE, as the cylinder is adjusted lower stage on the upper stage of the container/collector-less

Figure 7



Figures 7-8 Description:

Cover for sealing of the container/catcher-upper-outer.

Figure 9

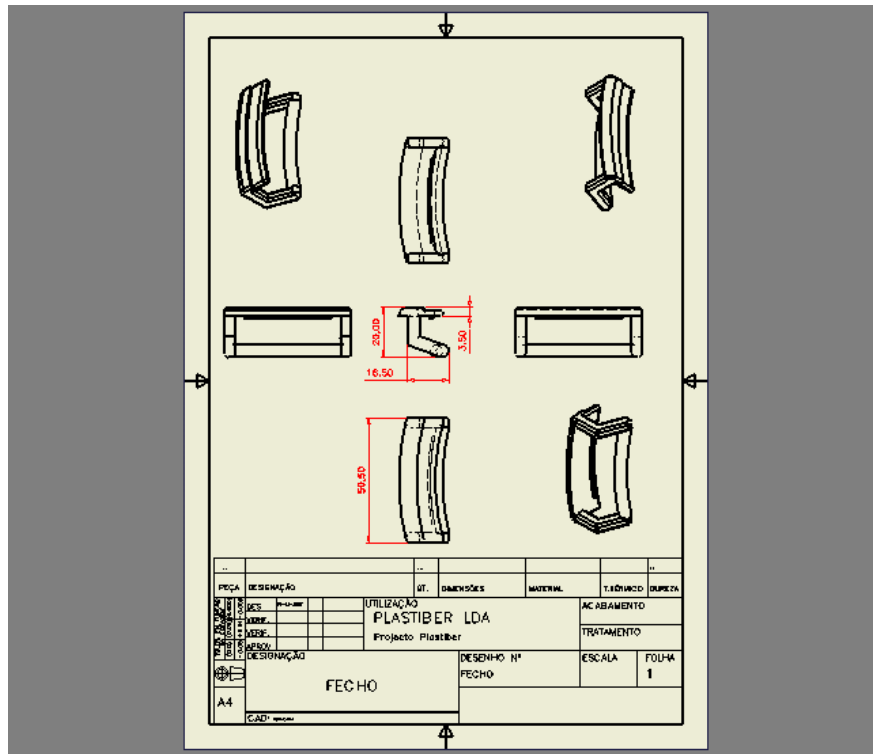
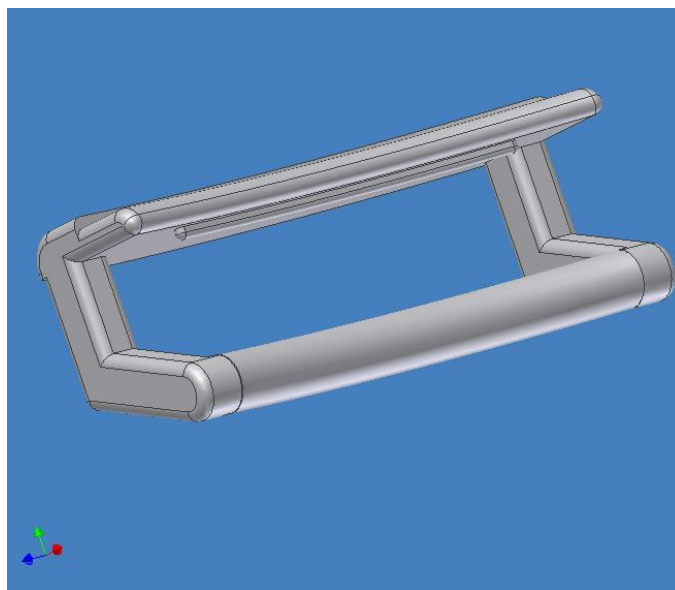


Figure 10



Figures 9-10 Description:

Hermitical closure device from the top of the container/catcher-upper-outer (that which contains a socket for functional closure device as can be seen in Figure 9-10).

Figure 11

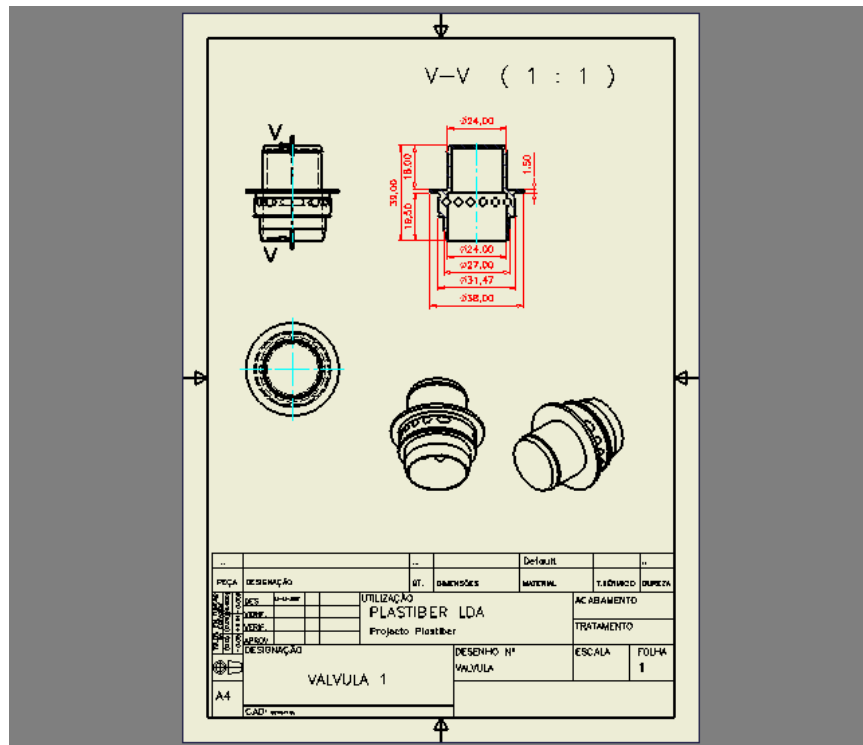
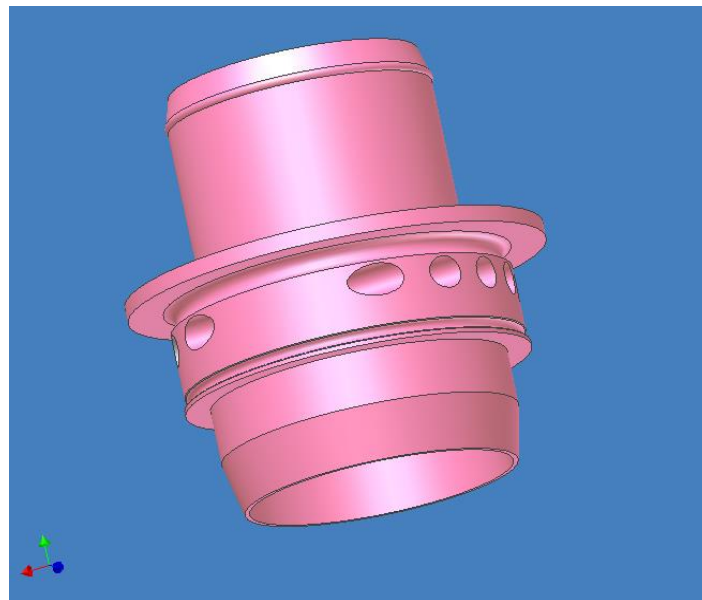


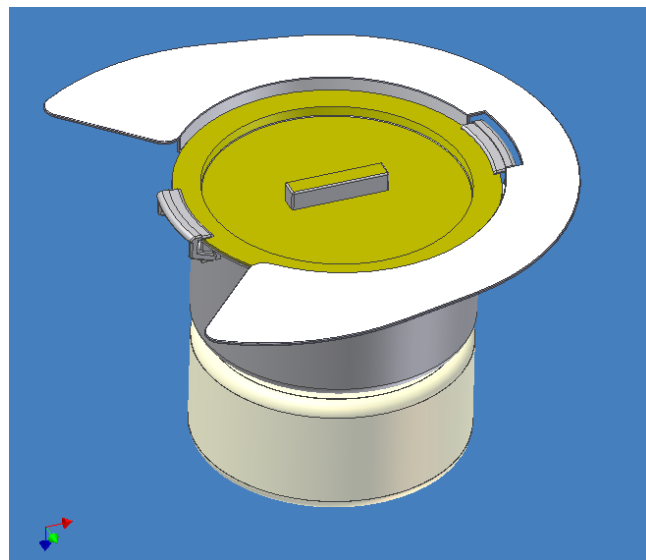
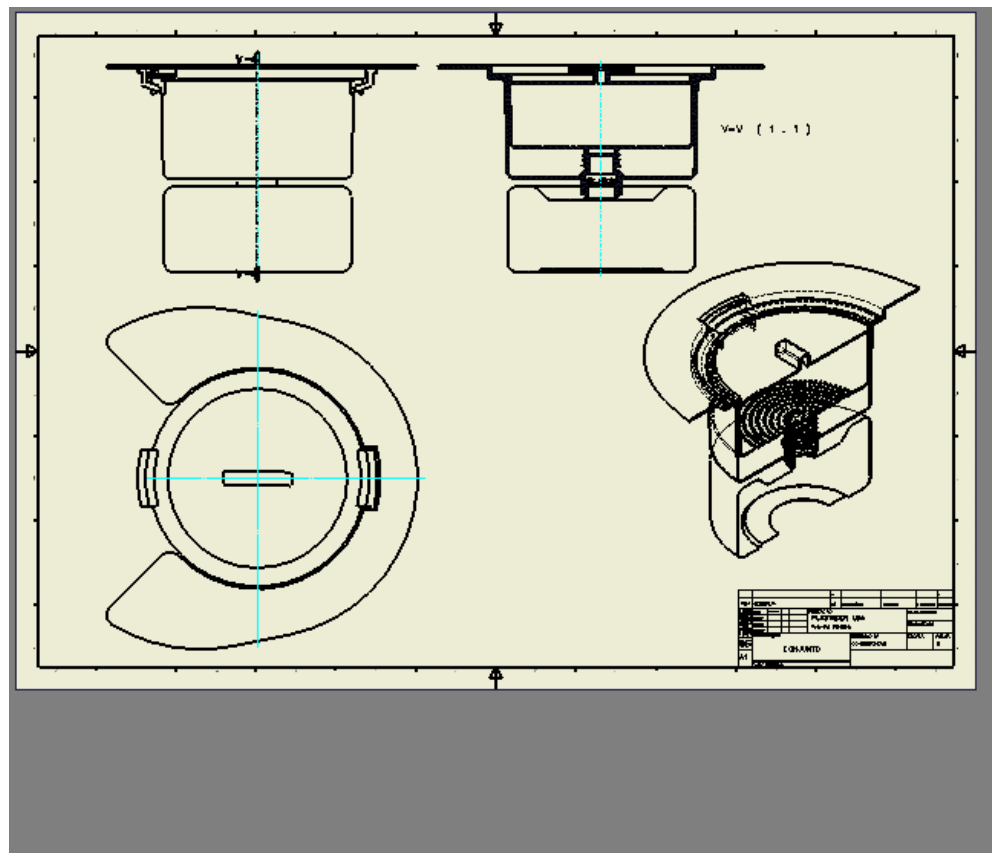
Figure 12



Figures 11-12 Description:

Valve that allows the transit unidirectional container/catcher-upper-exterior to the container/collector-less.

Figure 13



Figures 13-14 Description:
Tri-dimensional Vision (3D) of all stool collector.

ECONOMIC AND FINANCIAL ANALYSIS OF ENGLISH PRESS FOR THE CRC

A. Ferreira-Alemao, MD PhD
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Cost of bowel cancer £1.6 billion

A recent study by Oxford University researchers has revealed that the health and economic cost of bowel cancer in the UK is more than prostate cancer and breast cancer. In terms of economic losses, healthcare costs and the burden of unpaid care provided by friends and family, cancer costs the UK £15 billion a year. Bowel cancer totals £1.6bn compared to £2.4bn for lung cancer, £1.5bn for breast cancer and £800m for prostate cancer. More than half of this figure relates to people being unable to work and careers taking time off work to care for their friends and family.

Bowel Cancer Screening cuts deaths

A bowel cancer screening programme in England is on course to cut deaths by a sixth, say researchers studying results from the first million people tested. However, the work, published in the journal *Gut*, has raised concerns that the programme, launched in 2006, misses tumours in certain parts of the colon. Testers checked a faeces sample for signs of abnormal bleeding. The researcher who analysed the results said money should be spent on bringing in more sensitive tests. The screening programme aims to catch the tumours earlier, meaning more patients can be cured. Several million people aged 69 and over have now been screened, with approximately half of those invited taking part. When results from the first 1.08 million taking part were collated, it was found that 2.5% of men and 1.5% of women had received an abnormal result, and

were sent for further tests, usually colonoscopy, in which a tube with a camera on the end is passed into the colon. Among the men with abnormal results, 43% turned out to have either cancer or pre-cancerous growths in their colon. The figure for women was 11.6%. Most of these were early-stage cancers, which are generally easier to treat. Professor Julietta Patnick, director of the NHS Cancer Screening Programmes, said she was "delighted" by the results. "We are pleased to be on track to cut bowel cancer deaths by our target of 16% - early detection is crucial to lowering the number deaths from bowel cancer." However, the test appeared to be less effective at spotting cancers in the upper section, or "right side" of the colon. Cancer statistics from millions of people diagnosed with the disease suggest that for every three cancers in the left side of the colon, there will be one in the right side. However, of the thousands of cancers found by the screening test, only 14% were on the right side. Prof Richard Logan, of Nottingham University, who led the study, said it was not yet fully understood why cancers on the right-hand side were not showing up during screening.

Among the possibilities, he said, were that they grew faster, and were more likely to be diagnosed conventionally, or that they were less likely to bleed and trigger a positive test result. However, he said that the current blood test was "old fashioned", and should be replaced by a more modern alternative which might be more sensitive. He said: "There is a much better test available, but it will cost money to introduce it, and that money is not currently there." A spokesman for the screening programme said that the move to the new test was being "actively considered", although no date had been set for a change. Deborah Alsina, the chief executive of Bowel Cancer UK, welcomed the results, adding that separate moves to widen access to a form of colonoscopy called flexible sigmoidoscopy would also improve screening. "As a higher proportion of cancers are being found in the left side of the bowel than predicted, the rollout of flexible sigmoidoscopy screening in the new year will help to save even more lives. "However, this does need to be rolled out quickly with a sustained focus on areas with low uptake of screening."

People over 60 urged to have regular screening

Bowel Cancer UK's statement in relation to the West Midlands Cancer Intelligence Unit press release that people aged over 60 have been urged to have regular bowel cancer screenings after scientists found those who did had a better chance of survival. Deborah Alsina, CEO, Bowel Cancer UK said: "This research highlights the importance of screening. It does work and it's the most effective tool for detecting cancer early especially among those most at risk i.e. people over 60. The problem is that only around 50% of people return their kits, and more worrying still is that in some areas that number is significantly lower. It is vitally important that we identify a better way of encouraging people to take part in screening. I can't stress enough how important it is for people to take part, it might save your life."

West Midlands Cancer Intelligence Unit:

People aged over 60 have been urged to have regular bowel cancer screenings after scientists found those who did had a better chance of survival. Experts said those who performed the test at home and went to subsequent appointments were more likely to be diagnosed at an earlier stage than those diagnosed from their symptoms.

Bowel cancer is the third most common cancer in both men and women, with around 40,000 people diagnosed with the disease each year. Researchers looked at people aged 60 to 69 who were diagnosed with the disease in the West Midlands between January 2006 and September 2011. They compared the stage at diagnosis in patients picked up at screening compared to those diagnosed from symptoms. They found that 18.5 per cent of bowel cancers detected through screening were at the earliest stages compared with 9.4 per cent of cancers diagnosed through symptomatic routes.

Sam Johnson, lead researcher based at the West Midlands Cancer Intelligence Unit, said: "When bowel cancer is diagnosed at an earlier stage, it's easier to treat, has a lower chance of coming back and better survival rates. "Our research shows that screening can play an important role in improving bowel cancer survival by picking up cancers at an earlier stage. The findings were presented at the **National Cancer Intelligence Network (NCIN)** conference in Birmingham".

NCIN head, Chris Carrigan said: "When bowel cancer is found at the earliest stage, there is an excellent chance of survival, with more than 90 per cent of people surviving the disease at least five years. "This study highlights the potential improvements we can make through encouraging more people to take up their screening invitation so the disease is diagnosed earlier." Cancer Research UK head of health information and evidence, Hazel Nunn added: "Bowel screening uptake is worryingly low, particularly amongst men. And this is a useful reminder for older people to complete their bowel screening kit when it arrives in the post."

The NHS Bowel Cancer Screening Programme offers screening every two years to all men and women aged 60 to 69. People in this age group are sent an invitation followed by a screening kit, so they can do the test at home. It involves wiping small stool samples onto the testing card, which is then sealed and sent in the post to a lab for testing. The test detects tiny amounts of blood, which you cannot normally see, as polyps and bowel cancers sometimes bleed. So the test does not diagnose the disease but will tell you if you need a further examination by a doctor. Around 98 per cent of samples are judged as 'normal' although this does not guarantee that a person does not have bowel cancer.

Bowel cancer patients diagnosed through screening more likely to survive

Bowel cancer patients whose disease was found through screening have a better chance of beating their disease than those diagnosed after developing symptoms, new research shows today (Wednesday). The study, published in the British Journal of Cancer, also adds to evidence that the test used in bowel screening - which looks for blood in stool samples - is better at finding bowel cancers in men, and in the lower part of the bowel. While the blood test - known as FOBt - has been shown to be effective, it is not flawless. The study found that in people who attended screening nearly a quarter of cancers were diagnosed in between tests - suggesting these tumours were either missed by FOBt or these cancers were particularly fast-growing and developed in the two years between screening tests. The study findings, based on north-east England, support Cancer Research UK's calls to ensure the bowel screening programmes are as effective as possible. This could be done by including a better stool blood test and implementing the Flexi-Scope bowel screening test swiftly. Using data from the Northern Colorectal Cancer Audit Group in north-east England, researchers looked at more than 1,300 bowel cancers diagnosed between April 2007 and March 2010. The results show that nearly 40 per cent of all screen-detected cancers are at an early stage with an improved survival rate compared to

cancers found in patients who did not attend screening. Cancer Research UK figures show that when bowel cancer is found at the earliest stage, more than 90 per cent of people survive their disease at least five years.

Dr Michael Gill, lead author of the study based at the Wansbeck General Hospital in Northumberland and Durham University, said: "Compared to the trials which led to the introduction of the national bowel screening programme, our research shows that the proportion of bowel cancers detected through screening has improved with the roll-out of national screening. But too many bowel cancers are slipping through the net. We need to understand why the present blood test is failing to pick up cancers in certain parts of the bowel, and in women."

The Scottish and English bowel screening programmes are considering a more effective blood test called Faecal Immunochemical Test (FIT) - which is more efficient at detecting hidden traces of blood in stool samples. And in 2012, the screening programme in England will also begin to include the new Flexi-Scope test. Sarah Woolnough, Cancer Research UK's director of policy, said: "There is persuasive evidence that the new blood test, FIT, is a more effective test for bowel screening. The test also requires patients to provide fewer stool samples and so is less complicated to complete and return - which we hope will improve take-up of bowel screening.

"Cancer Research UK is pleased that England will add the Flexi-Scope test to its bowel screening programme but the roll-out needs to be rapid. We need ongoing monitoring and resource to ensure the roll-out runs to time and plan. While we understand that Scotland, Wales and Northern Ireland will learn from the English pilots, we urge them to begin planning their own roll-out of the test to avoid undue delays and ultimately save more lives. Compared with breast and cervical screening, bowel screening uptake is worryingly low, particularly among men. This study is an important reminder for people to complete their bowel screening kit when it arrives in the post."

Bowel cancer is the third most common cancer in the UK with more than 41,000 people diagnosed with the disease each year - over 100 people each day. The bowel screening programme has only been fully up and running in England since 2010 but it is thought it will eventually save around 2,000 lives each year in the UK.