

**TESIS DOCTORAL**

**IMPLICACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO,  
ALIMENTACIÓN, ESTILO DE VIDA Y  
VARIANTES POLIMÓRFICAS DEL GEN DE  
APOLIPOPROTEÍNA D EN PACIENTES  
CON PÓLIPOS INTESTINALES Y CON  
ADENOCARCINOMA DE COLON**

**Jesús Crespo Sanjuán**



**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR Y FISIOLÓGIA**



*ESTILO DE VIDA Y VARIANTES POLIMÓRFICAS DEL GEN DE  
APOLIPOPROTEÍNA D EN PACIENTES CON PÓLIPOS  
INTESTINALES Y CON ADENOCARCINOMA DE COLON*



---

**Universidad de Valladolid**

*Facultad de Medicina*

*Dpto. de Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología*

Dña. ROSA BUSTAMANTE BUSTAMANTE,  
PROFESORA DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR Y FISIOLOGÍA Y

D. JOSÉ ANTONIO GARROTE ADRADOS, PROFESOR DE INMUNOLOGÍA,

**HACEN CONSTAR**

Que el trabajo presentado por D. JESÚS CRESPO SANJUÁN titulado “*Implicación del estrés oxidativo, alimentación, estilo de vida y variantes polimórficas del gen de Apolipoproteína D en pacientes con pólipos intestinales y con adenocarcinoma de colon*”, ha sido realizado bajo nuestra dirección considerando que reúne los requisitos necesarios para ser presentada como Tesis doctoral.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente documento en Valladolid, a 20 de Junio de dos mil doce.

Fdo.: Dña. R. Bustamante Bustamante

Fdo.: D. J. A. Garrote Adrados



---

**Universidad de Valladolid**

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y  
FISIOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

**IMPLICACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO,  
ALIMENTACIÓN, ESTILO DE VIDA Y VARIANTES  
POLIMÓRFICAS DEL GEN DE APOLIPOPROTEÍNA D EN  
PACIENTES CON PÓLIPOS INTESTINALES Y CON  
ADENOCARCINOMA DE COLON**

Presentada por Jesús Crespo Sanjuán para optar al grado de  
Doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por  
Dra. Rosa Bustamante Bustamante  
Dr. José Antonio Garrote Adrados

*Dedicado a mis padres y a Nuria*

Ὁ βίος βραχύς, ἡ δὲ τέχνη μακρὴ, ὁ δὲ καιρὸς ὀξύς, ἡ δὲ πείρα  
σφαλερὴ, ἡ δὲ κρίσις χαλεπὴ

*Vita brevis, ars longa, occasio praeceps, experimentum  
periculosum, iudicium difficile*

*"La vida es breve, el arte, largo; la ocasión, fugaz; la  
experiencia, confusa; el juicio, difícil."*

Hipócrates de Cos (460-370 a.C.). Aforismo I,1.

## **RESUMEN**

El cáncer colorectal (CRC) es una enfermedad muy prevalente en nuestro medio en la que intervienen diversos factores, pudiendo identificar tanto causas genéticas como ambientales. Salvo los cánceres de origen hereditario posiblemente sean causas multifactoriales las implicadas en el mecanismo fisiopatológico de la enfermedad, no pudiendo señalar a ninguna de ellas como causa primaria. Sean cuales sean las causas lo que parece claro es que el estrés oxidativo constituye un mecanismo fundamental en la génesis de esta enfermedad, dando lugar a las mutaciones que convierten las células en cancerosas y que posteriormente van a producir que esas células malignas escapen a los mecanismos defensivos frente al estrés oxidativo, como la apoptosis.

En este trabajo estudiamos los niveles de estrés oxidativo en pacientes con pólipos intestinales y con CRC, desde sus orígenes en la aparición de un pólipo intestinal hasta sus últimos estadios. En líneas generales hemos podido comprobar cómo los niveles de oxidación presentan un incremento conforme avanza el estadio de la enfermedad tanto en sangre como en tejido (este último solo en pacientes con CRC). Mención especial tienen los valores de Mieloperoxidasa (MPO), que se ven incrementados en los pacientes con CRC, ya que se trata del primer estudio que analiza esta proteína en el plasma de pacientes con CRC. Así mismo, hemos visto cómo los niveles de Apolipoproteína D (ApoD) en el tejido de los pacientes con CRC sufren una disminución conforme avanza el estadio, posiblemente resultado de los mecanismos de escape del tumor para evadir los efectos beneficiosos de esta proteína frente al estrés oxidativo. También hemos encontrado relación entre los niveles de oxidación y la alimentación y estilo de vida de los pacientes de tal forma que aquellos que consumen mayor cantidad de antioxidantes y realizan mayor ejercicio tienen menores niveles de oxidación. Otro aspecto que hemos tratado es el estudio de las enfermedades intercurrentes y los tratamientos farmacológicos de los pacientes y de qué manera afectan a las variables analizadas.

Dentro de los estudios de supervivencia comprobamos cómo aquellos pacientes con niveles más bajos de oxidación sobreviven más tiempo, al igual que aquellos pacientes con un estilo de vida saludable. Por el contrario, los pacientes con

enfermedades intercurrentes obtienen un menor grado de supervivencia en nuestro estudio.

Otro aspecto que hemos abordado es la creación de las variables “*Oxidative Balace Score Modificada 1*” (OBSM1) y “*Oxidative Balace Score Modificada 2*” (OBSM2) para valorar de forma objetiva la oxidación en los pacientes. Consiste en una modificación del OBS utilizada por otros autores y que utiliza variables obtenidas de cuestionarios de frecuencias por lo que está sujeta a matices de subjetividad. Estas variables propuestas utilizan datos provenientes del suero de los pacientes.

De forma general podemos decir que hemos contribuido a esclarecer las relaciones entre el estrés oxidativo y el CRC demostrando que la oxidación juega un papel importante desde el primer momento de la enfermedad. Este momento debe ser considerado la aparición de un pólipo adenomatoso en la mucosa intestinal que tiene altas posibilidades de degenerar hasta la aparición de CRC. Según nuestros estudios los daños producidos por el estrés oxidativo, ya sea por circunstancias favorables de tipo genético, ambiental o ambas, puede ser el que dé origen a ese pólipo. Si las condiciones siguen siendo favorables, por causas genéticas, por el estilo de vida o por un menor consumo de antioxidantes, los niveles de oxidación siguen aumentando dando lugar a una displasia en el pólipo. Si aumentan los niveles de estrés oxidativo, aún más, ese pólipo teminaría convirtiéndose en un CRC. Unido a los estudios de alimentación esta secuencia demuestra un papel fundamental de la dieta y del estilo de vida en el desarrollo de esta enfermedad.



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar queremos mostrar nuestro más sincero agradecimiento a la Dra. Rosa Bustamante Bustamante y al Dr. José Antonio Garrote Adrados por haber dirigido este trabajo con total entrega, dedicación y generosidad, su cercanía en todo momento y su ayuda gratuita y desinteresada. También queremos agradecer de forma afectuosa la confianza depositada en nuestra persona para la realización de esta obra, así como las enseñanzas que han sabido transmitir, gracias a las oportunidades que nos han brindado y al tiempo que han dedicado a nuestra formación durante estos años.

Queremos mostrar nuestro agradecimiento a todos los investigadores participantes en el grupo de estrés oxidativo y cáncer de colon formado en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid (HCU) sin cuya colaboración no hubiera sido posible realizar este trabajo, y de manera especial a la Dra. María Dolores Calvo Nieves, a la Dra. Beatriz Aguirre Gervás, al Dr. José Herreros Rodríguez, al Dr. Benito Velayos Jiménez y al Dr. Manuel García Tejeiro.

Agradecemos al Dr. Diego Sánchez Romero y a la Dra. María Dolores Ganfornina Álvarez su colaboración y los conocimientos que de ellos hemos recibido durante los años transcurridos en su laboratorio. Y así mismo, la ayuda desinteresada de todas las personas que han trabajado en el laboratorio C5 del Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM), a Judith Acebes Gonzalo, Mario Ruiz García, Manuela del Caño Espinel, Nadia García Mateo, Esperanza Martín Tejedor, Sara Ortego Cubero, Alberto Pérez Castellano, Cristina Pérez Carbajales, Cristina Ordóñez Cambor, Eva Martínez Pinilla y muy especialmente a Raquel Bajo Grañeras.

En este apartado también mencionar a todos los facultativos del Servicio de Análisis Clínicos del HCUV quienes siempre han estado dispuestos de forma desinteresada a colaborar en este trabajo. Por ello, nuestro agradecimiento al Dr. Arturo Belmonte de Paz, al Dr. Javier Valentín Cid, a la Dra. M<sup>a</sup> Teresa Alonso Nozal, a la Dra. María Dolores Calvo Arias, a la Dra. Hortensia Marcos Sánchez y a la Dra. Inmaculada Vidriales Vicente.

De igual manera, agradecemos la colaboración desinteresada de todo el personal de enfermería y técnicos de laboratorio del Servicio de Análisis Clínicos, en especial a M<sup>a</sup> Sofía Gerás Quintana, Luisa Rollán Villaverde y María Teresa Rodríguez Rojo, También agradecemos su colaboración al personal técnico del servicio de Anatomía Patológica y, sobre todo a Rosa María García Centeno, y al personal de administración.

Expresamos nuestro más profundo agradecimiento a M<sup>a</sup> Fe Muñoz Moreno por su total y desinteresada dedicación y ayuda en los análisis estadísticos de la presente tesis.

Queremos agradecer la importante colaboración prestada a esta tesis por la Dra. M<sup>a</sup> José Castro Alija quién de forma desinteresada nos proporcionó el cuestionario de frecuencias que se muestra en el Anexo I así como valiosos consejos para su análisis.

Vaya también nuestro agradecimiento a Alicia Ortega y Nuria de Diego, técnicos de la Unidad de Investigación del HCU, y al personal de los Servicios A y B de Cirugía General del HCUV por su total disposición desinteresada y en especial a sus jefes Dr. José Rabadán Jiménez y Dr. Juan Beltrán de Heredia Rentería.

Nuestro agradecimiento a la Dra. Encarna Largo Cabrerizo, jefe del Servicio de Análisis Clínicos del HCUV en el que se ha llevado a cabo la recolección y procesamiento de las muestras y gran parte de los experimentos de esta tesis. También agradecemos el trato dispensando durante nuestra estancia como Residente de Análisis Clínicos.

Igualmente, expresamos también nuestro agradecimiento al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología y a su director el Profesor Constancio González por habernos dado la oportunidad de realizar la presente tesis así como por el trato recibido durante los años que hemos permanecido como doctorando en dicho Departamento y anteriormente como Alumno Interno.

Por último agradecer la colaboración de tantas personas anónimas que con su actitud generosa me han infundido el ánimo necesario para que esta tesis viera finalmente la luz.

## ***ÍNDICE GENERAL***

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	13
<b>1.1 MOTIVACIÓN Y VISIÓN GENERAL DEL TEMA</b> .....	14
<b>1.2 RESUMEN DE OBJETIVOS</b> .....	16
<b>1.3 DISEÑO DE LA TESIS</b> .....	17
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
<b>2.1 CÁNCER COLORRECTAL</b> .....	19
<b>2.1.1 Tipos de genes afectados y epigenética del cáncer colorrectal</b> .....	22
<b>2.1.2 Rutas genéticas</b> .....	22
<b>2.1.2.1 Inestabilidad cromosómica</b> .....	23
<b>2.1.2.2 Inestabilidad de microsatélites</b> .....	23
<b>2.1.2.3 Vía serrada</b> .....	24
<b>2.1.3 CÁNCER COLORRECTAL DE ORIGEN HEREDITARIO</b> .....	24
<b>2.1.3.1 Poliposis adenomatosa familiar</b> .....	25
<b>2.1.3.2 Adenoma y carcinoma colorrectal múltiple (MAP)</b> .....	26
<b>2.1.3.4 Síndrome de Lynch</b> .....	27
<b>2.1.4 IMPLICACIONES EN EL TRATAMIENTO</b> .....	29
<b>2.2 ESTRÉS OXIDATIVO</b> .....	30
<b>2.2.1 Daños producidos por los ROS</b> .....	30
<b>2.2.2 Sistemas de reparación de daños</b> .....	31
<b>2.2.3 LDL oxidadas</b> .....	33
<b>2.2.4 Mieloperoxidasa (MPO)</b> .....	34
<b>2.2.5 Peroxidación Lipídica</b> .....	35
<b>2.2.6 Proteínas Nitrosiladas</b> .....	36
<b>2.3 SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES</b> .....	38
<b>2.3.1 Vitamina A</b> .....	38

2.3.2 <i>β</i> -Carotenos .....	39
2.3.3 <i>Licopeno</i> .....	40
2.3.4 <i>Vitamina E</i> .....	40
<b>2.4 MARCADORES TUMORALES</b> .....	42
2.4.1 <i>Antígeno Carcinoembrionario (CEA)</i> .....	42
2.4.2 <i>Antígeno Carbohidrato 19.9 (CA19.9)</i> .....	43
<b>2.5 MARCADORES DE RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA, NUTRICIONALES Y PROTECTORES</b> .....	45
2.5.1 <i>Proteína C Reactiva (PCR)</i> .....	45
2.5.2 <i>Proteínas Totales (PT)</i> .....	46
2.5.3 <i>Estradiol (E2)</i> .....	46
<b>2.6 COLESTEROL, HDL, LDL, TRIACILGLICEROLES</b> .....	48
<b>2.7 OBESIDAD Y DIETA</b> .....	51
<b>2.8 EJERCICIO FÍSICO Y CÁNCER DE COLON</b> .....	56
<b>2.9 APOLIPOPROTEÍNA D</b> .....	57
2.9.1 <i>Acciones Vasculares de ApoD</i> .....	60
2.9.2 <i>ApoD en el Sistema Nervioso</i> .....	61
2.9.3 <i>ApoD y patologías nerviosas</i> .....	62
2.9.4 <i>Polimorfismos del gen de ApoD estudiados en esta tesis</i> .....	63
2.9.5 <i>ApoD y estrés oxidativo</i> .....	64
<b>3.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	66
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	69

<b>4.1 SUJETOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO</b> .....	70
4.1.2 <i>Pacientes afectados de pólipos intestinales</i> .....	70
4.1.3 <i>Pacientes afectados de CRC</i> .....	71
4.1.4 <i>Sujetos Control</i> .....	71
4.1.5 <i>Agrupación de pacientes</i> .....	71
<b>4.2 MATERIALES</b> .....	73
4.2.1 <b>HISTORIA CLÍNICA</b> .....	73
4.2.2 <b>CUESTIONARIO DE FRECUENCIA ALIMENTARIA (Anexo I)</b> .....	74
4.2.3 <b>MEDIDA DE PARÁMETROS EN SUERO</b> .....	76
4.2.4 <b>MEDIDA DE PARÁMETROS EN PLASMA</b> .....	76
4.2.5 <b>DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS DE APO D</b> .....	77
4.2.6 <b>VARIABLES DE OXIDACIÓN</b> .....	78
4.2.7 <b>MEDIDA DE PARÁMETROS EN TEJIDO</b> .....	80
4.2.7.1 <i>Procedimiento de recogida y posterior homogeinización del tejido</i> .	80
4.2.7.2 <i>Medida de Lípidos peroxidados (TBARS)</i> .....	81
4.2.7.3 <i>Medida de Proteínas Totales</i> .....	82
4.2.7.4 <i>Medida de Proteínas Nitrosiladas</i> .....	82
4.2.7.5 <i>Soluciones para Western-Blot</i> .....	82
4.2.7.6 <i>Electroforesis de proteínas</i> .....	83
4.2.7.7 <i>Western-Blot</i> .....	83
<b>4.3 DISTRIBUCIÓN DE PACIENTES POR VARIABLE ESTUDIADA</b> .....	88
4.3.1 <b>PACIENTES ORGANIZADOS SEGÚN ESTADÍO</b> .....	88
4.3.2 <b>PACIENTES ORGANIZADOS SEGÚN GRUPO DE ESTADÍO</b> .....	91
4.3.3 <b>PACIENTES ORGANIZADOS POR DIFERENCIACIÓN</b> .....	93
<b>4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	96
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	97

<b>5.1 ESTUDIO SOBRE LA EDAD, SEXO, ENFERMEDADES INTERCURRENTES, TRATAMIENTOS, ANTECEDENTES PERSONALES Y EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD DE LOS INDIVIDUOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO</b> .....	98
<b>5.1.1 PACIENTES ORGANIZADOS SEGÚN ESTADÍO</b> .....	98
<b>5.1.2 PACIENTES ORGANIZADOS SEGÚN GRUPO DE ESTADÍO</b> .....	101
<b>5.1.3 PACIENTES ORGANIZADOS SEGÚN DIFERENCIACIÓN</b> .....	102
<b>5.2 RESULTADOS EN SUERO</b> .....	104
<b>5.2.1 PACIENTES ORGANIZADOS SEGÚN ESTADÍO</b> .....	104
<b>5.2.2 PACIENTES ORGANIZADOS SEGÚN GRUPO DE ESTADÍO</b> .....	114
<b>5.2.3 PACIENTES ORGANIZADOS SEGÚN DIFERENCIACIÓN</b> .....	115
<b>5.2.4 VALORACIÓN GLOBAL DE LOS RESULTADOS EN SUERO</b> .....	116
<b>5.2.5 ANÁLISIS MULTIVARIANTE</b> .....	119
<b>5.3 RESULTADOS EN TEJIDO</b> .....	121
<b>5.3.1 PACIENTES ORGANIZADOS SEGÚN ESTADÍO</b> .....	121
<b>5.3.2 PACIENTES ORGANIZADOS SEGÚN DIFERENCIACIÓN</b> .....	129
<b>5.3.3 VALORACIÓN GLOBAL DE LOS RESULTADOS EN TEJIDO</b> .....	130
<b>5.4 RESULTADOS DE ESTILO DE VIDA Y ALIMENTACIÓN</b> .....	132
<b>5.4.1 PACIENTES ORGANIZADOS SEGÚN ESTADÍO</b> .....	132
<b>5.4.2 PACIENTES ORGANIZADOS SEGÚN GRUPO DE ESTADÍO</b> .....	147
<b>5.4.3 PACIENTES ORGANIZADOS SEGÚN DIFERENCIACIÓN</b> .....	149
<b>5.4.4 VALORACIÓN GLOBAL DE LOS RESULTADOS REFERENTES A ESTILO DE VIDA Y ALIMENTACIÓN</b> .....	151
<b>5.5 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DEL GEN DE APOLIPOPROTEÍNA D</b> .....	154
<b>5.6 RESULTADOS DE SUPERVIVENCIA</b> .....	156
<b>5.6.1 VALORACIÓN GLOBAL DE LOS RESULTADOS REFERENTES A LOS ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA</b> .....	181

<b>5.7 PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>182</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>183</b>
<b>6.1 CONSECUCIÓN DE OBJETIVOS.....</b>	<b>184</b>
<b>6.1.1 OBJETIVO I.....</b>	<b>184</b>
<b>6.1.2 OBJETIVO II .....</b>	<b>185</b>
<b>6.1.3 OBJETIVO III.....</b>	<b>187</b>
<b>6.1.4 OBJETIVO IV .....</b>	<b>188</b>
<b>6.1.5 OBJETIVO V.....</b>	<b>188</b>
<b>6.2 CONSIDERACIONES RESPECTO A LOS OBJETIVOS .....</b>	<b>189</b>
<b>6.3 CONCLUSIONES FINALES .....</b>	<b>191</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>193</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>214</b>



## ***CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN***

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1.MOTIVACIÓN Y VISIÓN GENERAL DEL TEMA**

El estrés oxidativo se ha propuesto últimamente como una de las causas del Adenocarcinoma Colorrectal (CRC). En nuestro estudio vamos a analizar el estado oxidativo en cada fase del proceso tumoral. Para ello determinamos en suero marcadores de oxidación (LDL oxidadas y MPO) y de sustancias antioxidantes (beta carotenos, vitamina A, vitamina E y licopeno). También estudiamos en suero el estado lipídico y nutricional de los pacientes (LDL, HDL, colesterol total, triglicéridos y proteínas totales) ya que hay estudios que indican que estos parámetros pueden intervenir modificando el riesgo y la evolución de la enfermedad a través de la inducción o de la reducción del estrés oxidativo. En nuestro estudio no solo hemos determinado el estado oxidativo en suero, sino que también lo hemos analizado en tejido tumoral y tejido sano de cada paciente. Para ello hemos analizado lípidos peroxidados (TBARS) y proteínas nitrosiladas. Dado que tanto el estrés oxidativo como el origen del proceso canceroso están íntimamente relacionados con la inflamación también hemos estudiado la respuesta inflamatoria sistémica mediante la proteína C reactiva. Para valorar los parámetros estudiados como marcadores pronósticos los hemos comparado con los marcadores tumorales de referencia en esta enfermedad (CEA y CA 19.9). Hemos medido también el nivel del estradiol en nuestros pacientes ya que parece ser que actúa como un factor protector frente a la enfermedad.

El papel del estrés oxidativo como motivo de la enfermedad parece estar originado por una alimentación deficiente en sustancias antioxidantes que aumenta el estrés oxidativo. También hay estudios que relacionan el sedentarismo con un aumento del estrés oxidativo. De una manera o de otra ambos factores aumentan el riesgo de padecer cáncer de colon. Por este motivo a nuestros pacientes les realizamos un cuestionario de frecuencias alimentarias y una completa historia clínica en la que se detallan hábitos de vida y su índice de masa corporal ya que parece ser que la obesidad también está implicada en el origen de la enfermedad.

Nuestro grupo de investigación lleva años investigando los efectos de Apolipoproteína D en Sistema Nervioso y su papel protector frente al estrés oxidativo. Por eso mismo, en este trabajo se han analizado tres polimorfismos de APOD con el fin de estudiar si los individuos con cáncer de colon presentan alguna variación genética en el gen de esta proteína que pudiera hacerlos más susceptibles al estrés oxidativo y por tanto al cáncer.

Junto con los parámetros citados también se han recogido de cada paciente las enfermedades intercurrentes y los tratamientos de cada uno de ellos. De esta manera podemos estudiar de qué manera interfieren en la enfermedad estos datos.

Se sugiere que el desarrollo de la enfermedad se altera o acentúa por la acción conjunta de los factores mencionados anteriormente. Todos estos estudios se han llevado a cabo en pacientes con pólipos intestinales, pacientes con adenocarcinoma colorrectal y un pequeño grupo control.

El fin último de este estudio es realizar una evaluación inicial de las determinaciones mencionadas para poder utilizarlas como marcadores diagnósticos o pronósticos tempranos. Esto nos permitiría identificar a los sujetos susceptibles de padecer cáncer de colon (en el caso de los individuos con pólipos) y aconsejarles sobre cómo cambiar su estilo de vida. Para ello, sería esencial llevar a cabo una dieta saludable con incremento de los alimentos ricos en sustancias antioxidantes que traten de disminuir las posibilidades de desarrollar cáncer de colon. En el caso de los pacientes con CRC se trataría de prolongar la supervivencia.

A continuación vamos a realizar una pequeña revisión bibliográfica del tema y trataremos de justificar los análisis realizados.

## **1.2 RESUMEN DE OBJETIVOS**

Los objetivos básicos que se han pretendido conseguir en esta Tesis son los siguientes:

- I. Medir el nivel de estrés oxidativo en suero, en cada fase de un proceso tumoral, y estudiar su influencia en el proceso evolutivo del Cáncer Colorrectal (CRC). Relacionar el nivel de estrés con los posibles parámetros que influyen en la aparición del CRC y pudieran servir para llegar a esclarecer un diagnóstico precoz. Como estudio original de esta tesis se tratará de cuantificar la MPO en suero como marcador del estrés oxidativo en pacientes con CRC. Establecer el estado pro-oxidante que facilita las mutaciones en las células intestinales que dan origen a las células cancerosas y las sustancias que mejor definen este estado.
- II. Determinar y cuantificar el estrés oxidativo en tejido tumoral y tejido normal y estudiar su relación con la evolución del CRC. Este es el primer trabajo en el que se estudia la nitrosilación de proteínas y su comparación en tejido normal y tumoral en pacientes del Hospital Clínico Universitario de Valladolid.
- III. Analizar, en los pacientes objeto de este estudio, los polimorfismos del gen ApoD con el fin de estudiar la susceptibilidad a padecer estrés oxidativo en función de los genotipos de ApoD.
- IV. Estudiar la influencia de hábitos, estilo de vida, costumbres adquiridas y otras enfermedades intercurrentes, sobre el estrés oxidativo y otros parámetros que tengan influencia en el CRC.
- V. Analizar cómo influyen el estrés oxidativo y el resto de parámetros estudiados en la supervivencia.

### **1.3 DISEÑO DE LA TESIS**

El contenido de esta tesis se ha organizado de la siguiente manera:

- El Capítulo 2 se dedica a una breve revisión bibliográfica acerca de los temas tratados en esta tesis: el adenocarcinoma colorrectal, el estrés oxidativo, el resto de parámetros determinados en este estudio y la ApoD.

- El Capítulo 3 desarrolla la hipótesis general y los objetivos desarrollados en esta Tesis.

- El Capítulo 4 contiene el desarrollo de la parte experimental realizada para la consecución de los objetivos de esta Tesis.

- El Capítulo 5 es una recopilación de todos los datos experimentales y de historia clínica y de cuestionarios de frecuencia alimentaria recogidos en los sujetos estudiados. También se muestran en este capítulo la discusión de los resultados obtenidos en el estudio.

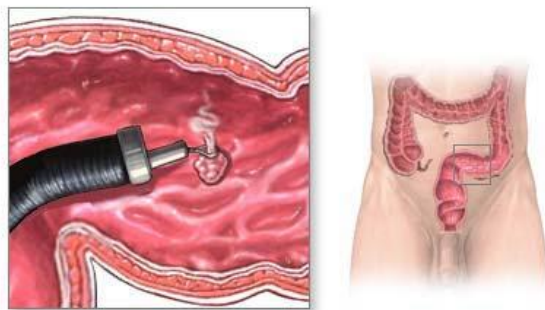
- El Capítulo 6 muestra las conclusiones más relevantes de los experimentos, la importancia de los logros obtenidos y su importancia de cara a futuros trabajos.

## ***CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA***

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 CÁNCER COLORRECTAL**

El adenocarcinoma de colon (AEC) es una enfermedad muy prevalente en nuestro medio y supone la segunda causa de muerte por tumores en Europa occidental y Norteamérica(1). Es el tercer cáncer más común en el mundo, siendo su incidencia mayor en el mundo desarrollado donde constituye el segundo cáncer más frecuente (2,3).



Tissue is removed from the colon for examination

**Fig 1.** Pólipo resecado mediante colonoscopia

El cáncer colorrectal es considerado un proceso que cursa en diferentes etapas. La mucosa intestinal comienza a proliferar escapando a los mecanismos de control y llegando finalmente a una transformación maligna. En primer lugar encontraríamos una etapa de displasia de la mucosa que formaría un pólipo. El pólipo es una lesión con potencial de malignización,

llegando a producirse anaplasia de la mucosa y evolucionando hacia cáncer colorrectal que a su vez seguiría su evolución en diferentes estadios. La mortalidad de esta patología está disminuyendo debido principalmente al diagnóstico precoz y a la mejora de los tratamientos, especialmente las terapias coadyuvantes con la cirugía.(4)

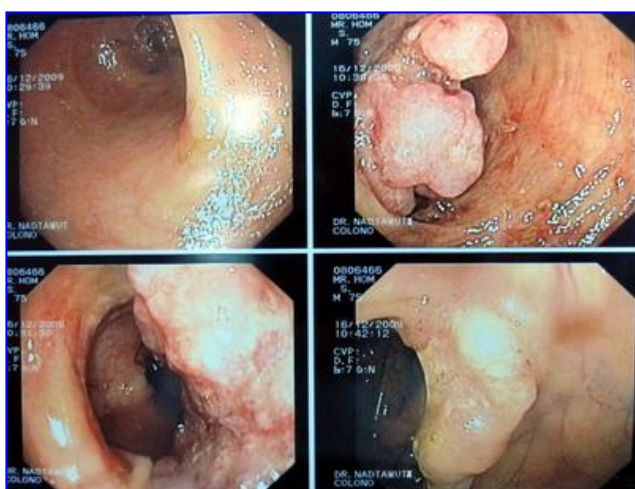
El cáncer constituye una enfermedad con una base genética que resulta de la acumulación de mutaciones en genes que regulan el ciclo celular. De todos los cánceres un 5 a 10% son de origen hereditario y hasta en un 25% se encuentran antecedentes en familiares de primer grado, aunque no se pueda determinar que sea de origen hereditario (5). La epigenética, consistente en la metilación de genes, también participa en los mecanismos del cáncer de colon de forma que mediante este sistema se silencian genes supresores de tumores o bien, si existe una hipometilación, se pueden expresar protooncogenes que llevarían al cáncer (6).

Entre los factores de riesgo hay que destacar dos grupos. Por un lado los antecedentes familiares, que nos hacen pensar en una predisposición a padecer esta enfermedad o en una forma heredada de la misma, y el estilo de vida (4).

Dentro de los factores que aumentan el riesgo a padecer cáncer de colon encontramos como más relevantes pertenecer al sexo masculino, la edad, la aparición de pólipos colónicos, obesidad, diabetes, alcohol, tabaquismo, ingesta de carne roja, de huevos, sedentarismo y enfermedad inflamatoria intestinal. Entre los factores protectores, que hemos podido recoger en la literatura como más relevantes, señalamos la toma de ácido fólico, de ácido acetil salicílico, la terapia hormonal sustitutiva en mujeres postmenopáusicas, el calcio y la vitamina D, y realizar ejercicio físico. También se ha comentado que reduce el riesgo de padecer esta enfermedad la ingesta de fibra y de frutas y verduras (4,5,7).

La primera manifestación suele ser la presencia de sangre en heces o bien la aparición de anemia en una analítica de rutina. Otras veces, aproximadamente el 30 % de los casos debutan como una obstrucción intestinal que supone una urgencia quirúrgica (4,5,7).

En cualquiera de los casos los enfermos afectados de esta patología sufren las consecuencias de la anemia, y en los casos de diagnóstico tardío la obstrucción como complicación. La obstrucción puede ser motivo de una ulceración intestinal e incluso de una perforación, por este motivo se interviene a los pacientes aunque sólo constituya



**Fig. 2** Imagen de Cáncer de colon en una colonoscopia

una medida paliativa. También pueden aparecer dolores cólicos, hipopotasemia, invaginación de la mucosa, hemorragia digestiva, tenesmo y hematoquecia (4,5,7).

El diagnóstico viene establecido por colonoscopia con toma de biopsia del tumor. También se puede utilizar para el diagnóstico la





**Fig. 3.** Imagen de radiología simple a doble contraste

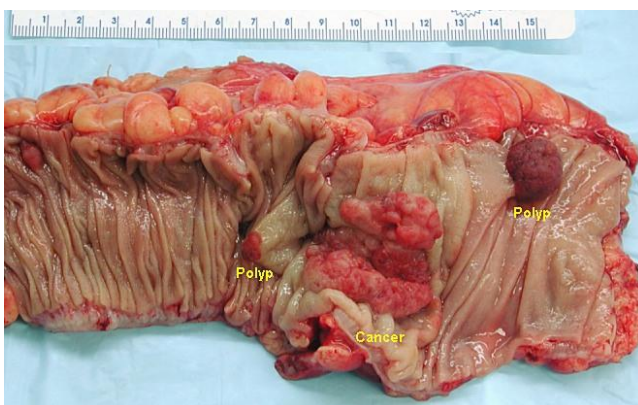
Resonancia Magnética de alta resolución, a modo de colonoscopia virtual, pero tiene el inconveniente de no poder realizar la toma de biopsia del tumor, por lo que hay que recurrir a la colonoscopia posteriormente (4,5,7).

Para localizar metástasis a distancia se utilizan tanto la Tomografía Computarizada como la Tomografía de Emisión de Positrones (4,5,7).

El tratamiento del cáncer de colon consiste básicamente en la cirugía. La cirugía puede ser terapéutica si tiene como objeto erradicar la enfermedad, o paliativa en caso de pacientes terminales con metástasis a distancia o tumores irresecables (4,5,7).

Se puede, además, añadir tratamientos coadyuvantes que han demostrado gran eficacia en los últimos años y que suponen una de las causas del aumento de la supervivencia como son la radioterapia y la quimioterapia. Se pueden aplicar antes de la cirugía para disminuir la masa tumoral, después para reducir eliminar las células cancerosas, ó antes y después (4,5,7).

El único marcador útil en el cáncer colorrectal utilizado actualmente es el



**Fig. 4.** Resección de colon afectado por carcinoma

antígeno carcinoembrionario (CEA). Este marcador es bastante inespecífico ya que puede elevarse en diferentes tipos de cánceres y en otras patologías por lo que no es útil para realizar un diagnóstico de la enfermedad. El CEA es útil a la hora de evaluar la respuesta al tratamiento y para detectar recidivas tumorales tras la

cirugía o el tratamiento coadyuvante (8,9).

### **2.1.1 Tipos de genes afectados y epigenética del cáncer colorrectal:**

- Cambios genéticos en los protooncogenes. Son genes que controlan la proliferación celular. Una mutación o un reordenamiento, en uno de estos genes que tenga como consecuencia una ganancia de función, va a provocar el crecimiento incontrolado de esa célula que dará origen al cáncer. Hay más de cien tipos de oncogenes identificados y la mayoría están implicados en cambios somáticos. Basta con que un alelo esté mutado para que se produzca la enfermedad, de manera que se comporta como dominante (4,5,7).

- Cambios en los genes supresores de tumores. Son genes que en su mayoría se encargan de funciones como la reparación de los daños del DNA. Para que funcionen basta con tener una copia activa, con lo que estos genes se comportan de forma recesiva. Son los responsables de la mayoría de los casos de cáncer hereditario ya que se hereda un alelo mutado. Por tanto, sólo hay que esperar que durante la vida del individuo ocurra una mutación en el otro alelo de una de sus células somáticas para que se desarrolle la enfermedad. Se pueden dividir en *Gatekeepers* como son TP53, RB1, VHL o APC, *caretakers* cuya participación en el cáncer es de carácter indirecto, como son MLH1 y MSH2, y *landscapers* (4,5,7).

- Modificaciones epigenéticas. Consiste en la metilación de islotes CpG en regiones promotoras que causan el bloqueo del gen y el cese de la expresión de la proteína. También hay ocasiones en las que un gen está metilado normalmente u ocurre una hipometilación de su promotor con lo que la proteína se sobreexpresa y si resulta ser una proteína que participa en la proliferación celular sobreviene el cáncer (4,5,7).

### **2.1.2 Rutas genéticas**

Dentro de las rutas genéticas que dan origen a un carcinoma colorrectal se han descrito básicamente tres, que además son mutuamente excluyentes:

### ***2.1.2.1 Inestabilidad cromosómica***

Presente en al menos el 85% de los cánceres colorrectales. Las células cancerosas presentan ganancias o pérdidas de material cromosómico como consecuencia de recombinaciones mitóticas aberrantes. Se piensa que esto es debido a la acción de la proteína APC mutada, encargada de mantener la conexión de los cromosomas con los microtúbulos en la división celular. Esta mutación necesita producirse en uno sólo de los dos alelos, o sea de forma dominante. Esta mutación es un hecho precoz en la aparición del cáncer colorrectal que aparece incluso en el estado de pólipo, luego son necesarias un mínimo de cuatro a siete mutaciones acumuladas en genes diferentes para que aparezca la transformación cancerígena. La mayoría de tumores en esta ruta presentan mutaciones en genes tales como K-ras, protooncogen cuya mutación aparece en pólipos con displasia moderada y que se encuentra en al menos el 40% de los tumores,  $\beta$ -catenina, mutación que aparece también en el estadio de pólipo precoz (50% de los tumores), el gen DCC y el gen TP53 con participación en la apoptosis y cuya mutación juega un papel fundamental en la aparición del cáncer. Esta ruta está presente en la mayoría de los cánceres colorrectales de origen esporádico (4,5,7,10).

### ***2.1.2.2 Inestabilidad de microsatélites***

Consiste en cambios en las secuencias de microsatélites de DNA del tejido comparado con los microsatélites de DNA constitucional. Estos cambios son debidos al fallo en la maquinaria reparadora del DNA de la célula (mismatch repair MMR). Muchos genes implicados en la tumorigénesis presentan microsatélites por lo que son diana de este mecanismo. Los principales genes que aparecen en esta ruta son TGF $\beta$ R2 que aparece en el 90% de los tumores con inestabilidad de microsatélites, IGF2R, PTEN, los factores de transcripción E2F4 y TCF4, el gen BAX y caspasa 5 relacionados con la apoptosis, MSH3, MSH6, MLH1 y MBD4 relacionados con la MMR, AXIN1 y WISP3 implicados en la vía WNT. Este tipo de tumores tienen localización proximal, suelen ser de tipo mucinoso, pobremente diferenciados y suelen presentar infiltrados linfocitarios. Además, tienen mejor pronóstico ya que no tienen tendencia a metastatizar. Las mutaciones de los genes anteriormente descritos aparecen en el 90%

de los pacientes que presentan un cáncer de colon hereditario no polipósico, pero también aparecen en un 15% de los tumores esporádicos. Aunque este último 15% es controvertido ya que estudios recientes afirman que no hay casos esporádicos en esta vía. Estos casos esporádicos corresponderían a tumores que no son consecuencia de mutaciones sino de silenciamiento de genes por mecanismos epigenéticos, sobretodo en el caso de MLH1. Sin embargo, otros estudios mantienen que la inestabilidad de microsatélites está presente en un 15 % de los cánceres colorrectales y que un 3% sería debido al síndrome de Lynch y el resto a formas esporádicas o a hipermetilación del promotor de MLH1 (4,5,7,10).

### ***2.1.2.3 Vía serrada***

No está totalmente clara y los tumores originados por esta ruta siguen un mecanismo diferente a los descritos anteriormente. Vendrían de pólipos hiperplásicos y de adenomas serrados (5).

### **2.1.3 Cáncer colorrectal de origen hereditario**

Se estima que un 20 a 30% de todos los casos de carcinoma colorrectal tienen un origen hereditario, aunque de todos ellos sólo un 5% está asociado a alguno de los síndromes de carcinoma colorrectal con mutaciones en genes definidos. En el resto, a pesar de existir una agregación familiar, no se conocen bien los mecanismos que conducen al cáncer. Se piensa que influyen polimorfismos en genes relacionados con el metabolismo y con factores medioambientales (11).

Como ya hemos mencionado anteriormente, la mayoría de los individuos incluidos en estos síndromes son portadores de una mutación en uno de los dos alelos de un gen supresor de tumores. Cuando aparece otra mutación en el otro alelo se produce el cáncer.

### 2.1.3.1 Poliposis adenomatosa familiar

Se trata de una enfermedad en la que los pacientes presentan más de 100 pólipos adenomatosos en colon y recto. Los pólipos comienzan a aparecer a una edad media de 16 años. Estos pólipos terminan degenerando en un adenocarcinoma en la cuarta o quinta década de la vida. La enfermedad se comporta como autosómica dominante con penetrancia prácticamente completa y expresividad variable. La poliposis se asocia con tumores en otras localizaciones como adenomas gástricos y hamartomas fúndicos, tumores desmoides, hipertrofia congénita del epitelio pigmentario de la retina, osteomas, quistes epidermoides y otras neoplasias menos frecuentes. También existe una forma con menos de 100 pólipos que se desarrolla en colon derecho y que su transformación cancerosa se retrasa unos 10 años (5,11).



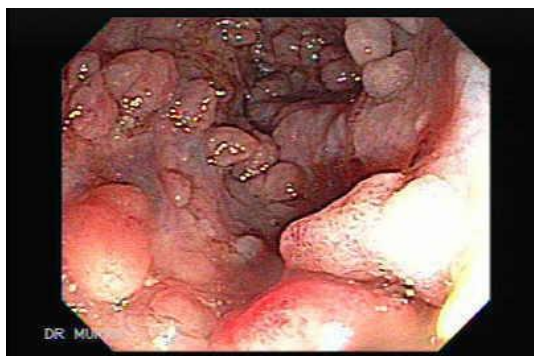
**Fig. 5.** Resección de colon afectado por poliposis familiar

Las mutaciones más conocidas en esta enfermedad recaen sobre el gen de la proteína APC. Esta proteína, de 2843 aminoácidos con un peso de 311.8 kDa contiene 3 repeticiones de 15 aminoácidos y otras 7 repeticiones de otros 20 aminoácidos que ligan la  $\beta$ -catenina. La función de esta proteína en condiciones normales es de supresora de

tumores ya que al unirse a la  $\beta$ -catenina impide que ésta se acumule en el citosol y forme complejos con el factor de transcripción LEF-1 que penetra en el núcleo y activa la expresión de oncogenes como c-myc. Además, el extremo terminal de APC se une a EB1 que participa en la unión de los microtúbulos con los cromosomas en la división celular por lo que también participa en la estabilidad cromosómica. Si muta aparece la inestabilidad cromosómica de la que hemos hablado con anterioridad (5,11).

Las mutaciones en esta proteína que dan origen a esta enfermedad originan una proteína truncada que no cumple ninguna de las funciones indicadas anteriormente. Ya hemos mencionado que en los genes supresores de tumores es necesaria la mutación de los dos alelos para que se produzca la malignización, lo que se conoce como la teoría del doble impacto de Knudson. Sin embargo, aquí parece existir una excepción ya que

el segunda impacto está determinado por el primero en la línea germinal. Es posible que con la simple mutación de un alelo heredado se produzca la enfermedad. Una sola copia activa no bastaría para ligar toda la  $\beta$ -catenina y empezaría a acumularse (5,11).



**Fig. 6.** Colonoscopia de colon afectado por poliposis

Así mismo, existe una relación entre la localización de la mutación en el gen y el fenotipo expresado. De esta manera mutaciones en determinados codones de la proteína llevarían a cánceres más agresivos que otros. En ocasiones la mutación no da lugar a una proteína truncada sino a una proteína que es menos funcional y aparecen las formas atenuadas ya descritas. También

existe relación entre la localización de la mutación y el tipo de manifestaciones extracolónicas que aparecen en los pacientes (5,7,11).

### ***2.1.3.2 Adenoma y carcinoma colorrectal múltiple (MAP)***

Se trata de una poliposis colónica que se hereda de forma autosómica recesiva. Se produce por mutación en el gen MYH. Este gen codifica una proteína supresora de tumores encargada de la reparación del DNA. Los individuos llevarían mutado un alelo y con el tiempo se produciría una segunda mutación en el otro alelo que daría lugar a la poliposis (5,7,11).

Se ha visto que la muchos de los afectos también terminan teniendo mutaciones en APC. Esto es debido a que los errores de replicación no se reparan por la mutación de MYH, con lo que surgen mutaciones en otros genes, entre ellos APC. Por lo tanto, muchos de estos individuos comparten mutaciones en las dos vías (5,7,11).

#### ***2.1.3.4 Síndrome de Lynch***

Nos referimos aquí al también llamado cáncer de colon hereditario no asociado a poliposis. Es un síndrome heredado de forma autosómica recesiva relativamente frecuente ya que supone del 1 al 5% de todos los carcinomas colorrectales. La edad de aparición se sitúa en torno a los 45 años. Además de al cáncer de colon está asociado a otros tumores, los más frecuentes son endometrio (60%), gástrico (13%), ovárico (12%), páncreas, tracto biliar, riñón, sistema nervioso central e intestino delgado. Los de este último órgano son 100 veces más frecuentes que en la población general pero tienen mejor pronóstico (5,11).

Los tumores colorrectales englobados en este síndrome son pobremente diferenciados, de tipo mucoso, con células en anillo de sello y con marcado infiltrado linfocitario (5).

El síndrome en cuestión está producido por mutaciones originadas en genes reparadores de los errores de emparejamiento producidos durante la replicación del DNA (mismatch repair o genes MMR) MLH1, MSH2, MSH6, MSH3, PMS2, PMS1 o MLH3. Todas estas proteínas actúan en conjunto formando uniones entre ellas y constituyendo así una maquinaria compleja de reparación. Se hereda una mutación en uno de estos genes por vía germinal que necesita de otra mutación para producir la enfermedad, o bien la metilación del promotor de MLH1. Si este sistema falla empiezan a producirse un número ingente de mutaciones que van a condicionar la inestabilidad de microsatélites (5,11).

Las mutaciones en MSH2 y MLH1 son las responsables del 90% de los casos. En el primero se suelen producir mutaciones sin sentido en sitios de corte y empalme del mRNA, mientras que en MLH1 se suelen producir mutaciones con sentido erróneo (5,11).

Para detectar la inestabilidad de microsatélites se han propuesto cinco marcadores de microsatélites (BAT 25, BAT 26, D5S346, D2S123 y D17S250) que la califican en alta (MSI-H), baja (MSI-L) o estable (MSS) (5,10,11).

Las mutaciones en MSH2 están asociadas a una mayor predisposición a desarrollar un cáncer de localización extracolónica. MLH1 se asocia mejor a cánceres de tipo colónico. La mutación en MSH6 está relacionada con cáncer endometrial (5,11).

También se pueden realizar tinciones inmunohistoquímicas de las proteínas codificadas por estos genes. En los casos en que los genes estén mutados se observará una disminución en la tinción, lo que nos conduciría a un diagnóstico de este síndrome (5,11).

Para diagnosticar esta enfermedad existen unos criterios diagnósticos que vamos a comentar (5,7):

- Criterios de Amsterdam:
  - Al menos tres familiares afectados de CCR u otro tumor HNPCC relacionado y:
    - Un caso menor de 50 años
    - Poliposis adenomatosa familiar excluida
  
- Criterios de Bethesda:
  - Edad menor de 50 años
  - Neoplasia HNPCC asociada sincrónica o metacrónica
  - Patología característica y edad menor de 60
  - CCR en uno o más familiares de primer grado con tumor HNPCC, uno menor de 50 años.
  - CCR en dos o más familiares de primer grado o segundo grado con tumor HNPCC.

Los pacientes que cumplan estos criterios deben ser incluidos en programas de estudio de cáncer hereditario a nivel genético.

Estudios, publicados recientemente, muestran que siguiendo estos criterios se pueden escapar al menos un 28% de pacientes con síndrome de Lynch. Estos autores recomiendan realizar la inmunohistoquímica para las proteínas de reparación o el



estudio de microsatélites a todos los enfermos de cáncer colorrectal, independientemente de su edad o de sus antecedentes familiares (7).

A todos los familiares en los que se hayan detectado mutaciones en los genes de esta enfermedad se recomienda realizar colonoscopias periódicas a partir de los 25 años. A partir de los 40 años deben realizar una colonoscopia cada 1 o 2 años. Las mujeres deben realizarse revisiones periódicas para prevenir un carcinoma endometrial a partir de los 30 o 35 años (5,7,10,11).

#### **2.1.4 Implicaciones en el tratamiento**

El desarrollo de la genética nos está ayudando en la prevención del cáncer de colon identificando a portadores de mutaciones que en un futuro van a desarrollar la enfermedad. Pero a la hora del tratamiento por el momento solo nos ayuda la identificación de la proteína KRAS mutada (5,7).

Los enfermos en cuyo tejido tumoral se encuentra una mutación en el gen de esta proteína responden mal a los quimioterápicos del grupo de anticuerpos monoclonales frente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (inhibidores EGFR) como cetuximab. La existencia o no de esta mutación debe de establecerse en todos los casos antes de iniciarse el tratamiento ya que los pacientes con KRAS salvaje pueden beneficiarse de los fármacos anteriormente mencionados (5,7).

## 2.2 ESTRÉS OXIDATIVO

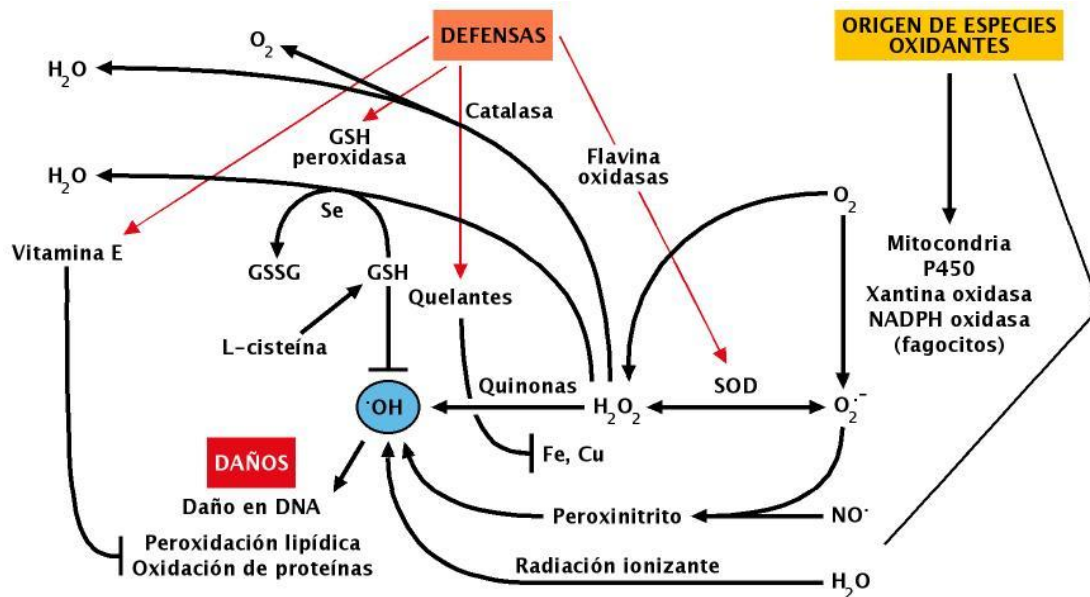


Fig. 7. Mecanismo de producción de radicales libres, daños producidos y defensas antioxidantes

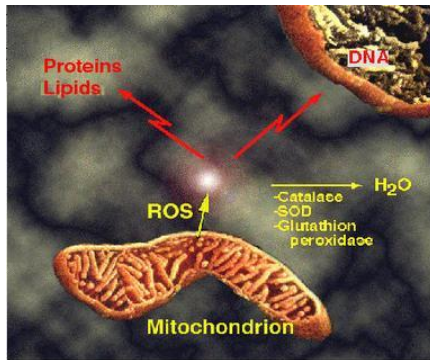
A menudo se ha mencionado como una de las causas de esta enfermedad maligna la inflamación de la mucosa colónica y la dieta basada en sustancias que aumentan el estrés oxidativo (1,12,13).

Se entiende por estrés oxidativo el daño celular causado por los radicales libres del oxígeno (ROS) resultantes de la oxidación de sustratos para obtener energía o en el marco de un proceso metabólico. Hay que tener en cuenta que el metabolismo normal en presencia de oxígeno produce ROS, por lo que siempre va a existir un mínimo de estrés oxidativo (14).

### 2.2.1 Daños producidos por los ROS

Los efectos más importantes de los ROS se citan a continuación (14):

- El  $O_2^{\cdot-}$  es tóxico para las enzimas mitocondriales tales como la aconitasa, pero tiene una vida media muy corta.
- El  $HO_2^{\cdot}$  difunde fácilmente y es altamente reactivo.



**Fig. 8.** Mecanismo de daños del estrés oxidativo

- El HO<sup>•</sup> también difunde fácilmente y es altamente reactivo. Ataca al DNA, macromoléculas, proteínas y lípidos.
- Los radicales hidroxilo también atacan indirectamente reaccionando con ácidos grasos insaturados o formando peróxidos orgánicos que se descomponen hasta aldehídos dando lugar a puentes aldehídos entre proteínas.
- AGEs (“*Advanced Glycation End products*”), formados por la reacción de azúcares con grupos amino de proteínas. Induce uniones proteína-proteína y mutaciones del DNA, así como el metabolito reactivo s-adenosil-metionina que altera los puentes de hidrógeno de las bases del DNA a través de la metilación de la guanina.
- Inestabilidad del DNA.
- Depurinación y deaminación de las bases del DNA.
- Isomerización y deaminación de aminoácidos.
- Defosforilación de fosfoproteínas.

Como podemos comprobar, los ROS producen importantes daños tanto estructurales como funcionales en la célula. Para evitar estos daños las células están dotadas de sistemas que eliminan los radicales libres o las moléculas dañadas por ellos. No obstante, estos sistemas no son perfectos por lo que el daño biológico se acumula (14).

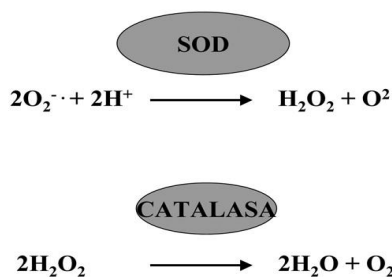
### 2.2.2 Sistemas de reparación de daños

Los principales sistemas de eliminación y reparación consisten en lo siguiente (14):

- Las estructuras dañadas son destruidas y reemplazadas.
- Los lisosomas tienen enzimas hidrolíticas que degradan no solo moléculas sino también organelas como mitocondrias. Ellos mismos pueden autofagocitarse por el acúmulo de alteraciones en su membrana. Las proteínas son degradadas por proteosomas que están en el citosol y en el núcleo.

- La mitocondria tiene su propio sistema proteolítico de eliminación de proteínas dañadas.

Es en el momento en el que estos sistemas de reparación se sobrepasan cuando se establece el daño biológico que es la base de muchas patologías. El estrés oxidativo, además de en numerosas enfermedades, está involucrado también en procesos como el envejecimiento, ya que el daño se va acumulando con el tiempo (14).



**Fig 9.** Mecanismo de enzimas antioxidantes

Las defensas naturales contra los radicales libres incluyen vitaminas A y E,  $\beta$ -carotenos y licopeno. Los daños producidos por el estrés oxidativo son producidos por un desequilibrio de estas moléculas, ya sea por un aumento en la producción de los radicales libres o por una disminución de las defensas antioxidantes. Por consiguiente unos niveles

bajos de antioxidantes pueden ocasionar un acúmulo de ROS que provoquen lesiones celulares que conduzcan a la aparición de cáncer (15–18).

Según diversos estudios, el daño producido por el estrés oxidativo está relacionado con la etiología de diversas enfermedades gastrointestinales, entre ellas el adenocarcinoma de colon y la enfermedad de Crohn (2,3,12,19–23). Además, está demostrado que la dieta juega un papel importante, de tal manera que, las proteínas antioxidantes, y por tanto protectoras frente a los ROS, previenen el adenocarcinoma de colon (2,3).

El propio estrés oxidativo induce la síntesis de proteínas que intentan reparar el daño producido por los ROS en el DNA o bien, si no es posible, llevar a la célula hacia la apoptosis (20). Sin embargo, al mismo tiempo diversos estudios muestran una resistencia de las células tumorales al propio estrés oxidativo (19,24). Por eso, uno de nuestros objetivos es investigar en qué momento el tumor se hace resistente a los daños producidos por el estrés oxidativo.

Como ya hemos comentado anteriormente en nuestro estudio tratamos de valorar el estado oxidativo en cada fase del proceso tumoral. Para ello hemos analizado tanto el

estado prooxidante como antioxidante de cada paciente mediante biomarcadores en suero. Como antioxidantes hemos elegido retinol (vitamina A), alfa tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno y licopeno. Como marcadores de oxidación determinamos mieloperoxidasa (MPO) y LDL oxidadas (LDL ox). Para valorar el balance entre marcadores pro oxidantes y antioxidantes proponemos la variable “oxidative balance score” modificada (OBSM), modificación del OBS propuesto por Hoydonck et al. (25) ya que utilizamos biomarcadores en suero en lugar de cuestionarios de frecuencia al igual que ha realizado Goodman et al (26). Hemos analizado el estado oxidativo en tejido tumoral y tejido normal adyacente al tumor analizando los lípidos peroxidados mediante TBARS y la nitrosilación de proteínas.

También hemos considerado de interés estudiar la relación entre el estado lipídico de cada paciente mediante biomarcadores en suero (LDL, HDL, CT, TG, PT para valorar el estado nutricional), la respuesta inflamatoria sistémica (PCR), el estilo de vida y la alimentación y el estado oxidativo. De esta manera pretendemos determinar la relación entre estos parámetros y el desarrollo del tumor.

### **2.2.3 LDL oxidadas**

Las LDL oxidadas son generadas por la acción de los ROS que, como ya hemos comentado, tienen un papel importante en la peroxidación de lípidos. Las LDL oxidadas juegan un importante papel en la progresión de la aterosclerosis y deben ser consideradas como un biomarcador que refleja el estado de estrés oxidativo en plasma.(27). Un estudio anterior encuentra un aumento del riesgo de padecer cáncer de colon con niveles elevados de LDL oxidadas de forma independiente con otros factores de riesgo y con el estilo de vida (27), pero no hay trabajos en los que se estudie la asociación de los niveles de LDL oxidadas con el estadio del tumor ni si la elevación de las LDL ox viene determinada por patología asociada o si tratamientos como las estatinas pueden modificar dichas asociaciones.

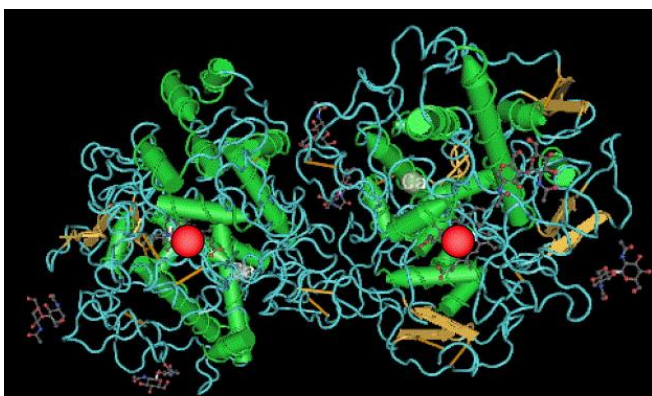
Las LDL ox surgen de la peroxidación lipídica llevada a cabo por los ROS, produciendo en su interior lípidos peroxidados y aldehídos. Estas lipoproteínas oxidadas reducen la acción de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasas y glutatión

peroxidasas, con lo que los ROS se elevan aún más. Además inducen la expresión de la COX-2 que produce prostanglandina E2 la cual estimula la proliferación y el crecimiento del tumor. Estudios previos indican que el consumo de ácido acetilsalicílico (AAS) y otros antiinflamatorios no esteroideos (AINE) reduce el riesgo de padecer cáncer de colon al inhibir la COX2 (27).

Un estudio previo encuentra una asociación positiva entre vitamina E y LDL ox, probablemente porque las LDL unen vitamina E. También asociación positiva con niveles de colesterol (27).

La asociación entre cáncer de colon y resistencia a la insulina es debida al exceso energético de la dieta que produce una resistencia a la insulina, lo que eleva los niveles circulantes de triglicéridos y otras grasas, favoreciendo su oxidación (27).

#### 2.2.4 Mieloperoxidasa (MPO)



**Fig. 10.** Estructura tridimensional de MPO formando un homodímero. En rojo los grupos Hemo. En verde las hélices alfa y en amarillo las hojas beta.

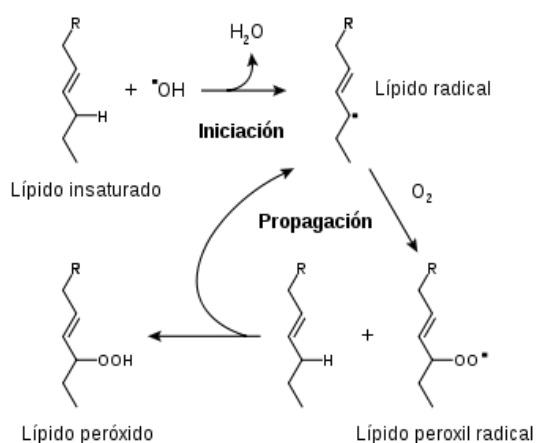
La mieloperoxidasa (MPO) es una glicoproteína con un peso molecular de 150 kDa que contiene hierro. Forma un complejo tetramérico de uniones covalentes y está compuesta por dos cadenas alfa glucosiladas de MW 59-64 kDa y dos cadenas beta desglucosiladas de MW 14 kDa.

La MPO se encuentra de forma abundante en los gránulos azurofílicos primarios de neutrófilos y está presente en los monocitos. Como respuesta a una invasión microbiana, los gránulos citoplásmicos de neutrófilos liberan la MPO en el espacio fagosómico y extracelular, catalizando la conversión de peróxido de hidrógeno e iones de cloruro (Cl<sup>-</sup>) a ácido hipocloroso, un potente agente oxidante (28–30).

La mieloperoxidasa se emplea tradicionalmente como marcador de inflamaciones de las vías respiratorias causadas por asma o irritantes medioambientales. Así mismo, se cree que la MPO participa en las distintas fases de la aterogénesis y que puede influir en la propagación de la aterosclerosis. La relación entre los niveles elevados de MPO en suero y las enfermedades cardiovasculares (CAD) representa un importante papel de la MPO como marcador de inflamaciones en las CAD, permitiendo la identificación de pacientes con riesgo de padecer accidentes cardíacos a falta de necrosis miocárdica (30–32).

No existen estudios previos acerca de los niveles de MPO en suero en pacientes con cáncer de colon, aunque sí hemos encontrado bibliografía acerca de MPO en tejido tumoral y normal de estos pacientes. Estos estudios revelan un aumento de MPO en el tejido tumoral con respecto al tejido normal (33–35).

### 2.2.5 Peroxidación Lipídica



**Fig. 11.** Mecanismo de peroxidación de lípidos

La peroxidación lipídica en el tejido fue estimada mediante el ensayo de sustancias reactivas-ácido barbitúrico (TBARS) y se encontraron mayores niveles de peroxidación lipídica en el tejido tumoral que en el tejido normal adyacente de cada paciente. En otros estudios se ha encontrado una mayor actividad enzimática antioxidante que ofrece protección del efecto dañino de estas especies activas en el tejido tumoral.

Se ha sugerido que la producción de especies de oxígeno reactivo puede jugar un papel en la carcinogénesis y que el riesgo de cáncer colorrectal se incrementa por acción mutagénica de los radicales libres que son producidos mediante reacciones de oxidación. El tracto gastrointestinal está constantemente expuesto a ROS originados de fuentes endógenas y exógenas. La exposición de la mucosa a las especies reactivas lumbinales es un proceso progresivo. Esta exposición se debe a desechos de comida oxidados, altos niveles de iones de

hierro, oxidantes de la saliva, toxinas, bacterias y ácidos biliares. Se ha estimado que el 70 a 90% de las muertes de cáncer de colon pueden estar ligadas a la dieta. Las diferencias en los factores ambientales, como el ejercicio físico y la dieta, particularmente en la ingesta de antioxidantes y prooxidante pueden contribuir al cáncer de colon. El consumo de frutas y vegetales que son ricos en nutrientes antioxidantes pueden ayudar a prevenir el cáncer de colon minimizando los efectos genotóxicos de los radicales libres y la peroxidación lipídica. Hay un interés considerable, por tanto, en utilizar la prevención dietética y la quimioprevención para el cáncer de colon (35).

En un estudio anterior la mayor concentración de TBARS fue encontrada en CRC de grado G1. En grados subsiguientes de diferenciación celular (G2 y G3) sus concentraciones fueron menores. El mayor nivel de peroxidación lipídica expresado como concentración de TBARS fue encontrado en el estadio I de CRC. La concentración significativamente más baja fue mostrada en el estadio II (36). Sin embargo, en otros estudios se encontraron mayores niveles de lípidos peroxidados en los estadios más altos, en especial en II y en IV (37–39)

En otros estudios se han encontrado menores niveles de peroxidación lipídica en el tejido tumoral que en el tejido normal periadyacente. Varios estudios experimentales señalan la existencia de una reducción en el metabolismo de especies reactivas de oxígeno en células cancerosas, lo que provee de una ventaja a estas células. Una correlación inversa ha sido demostrada entre la peroxidación de lípidos de membrana y la proliferación celular (19).

Como podemos comprobar existe una importante controversia sobre los niveles de lípidos peroxidados en CRC en la literatura científica. Nuestro estudio intentará aclarar, en parte, a qué pueden ser debidas estas contradicciones.

### **2.2.6 Proteínas Nitrosiladas**

En el marco del proceso del estrés oxidativo se produce un potente oxidante peroxinitrito, producto de radicales aniones superóxido con óxido nítrico. El peroxinitrito causa numerosos efectos citotóxicos como son la nitrosilación de

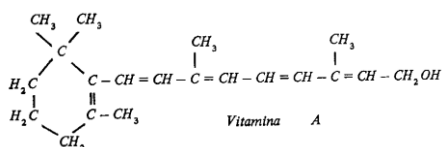
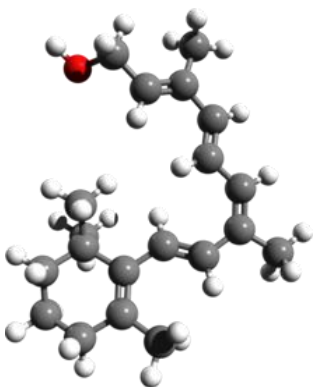


proteínas, la rotura de DNA, la activación de poli(ADP-ribosa) polimerasa produciendo cambios en la expresión génica, cambios en la señalización celular, disfunción mitocondrial y, en casos extremos, inducción de apoptosis y necrosis.

Se ha comprobado que el nivel de proteínas nitrosiladas se correlaciona bien con el estrés oxidativo, la respuesta inflamatoria sistémica (en concreto con los niveles de PCR), el aumento de masa corporal y los niveles de glucemia (40).

## 2.3 SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES

### 2.3.1 Vitamina A



**Fig. 12.** Estructura de la vitamina A (Retinol)

La vitamina A es esencial para el crecimiento de los vertebrados y juega un papel importante en la visión y en la diferenciación celular (a través de receptores nucleares, interaccionando con otros factores de transcripción como los activados por la vitamina D) (41).

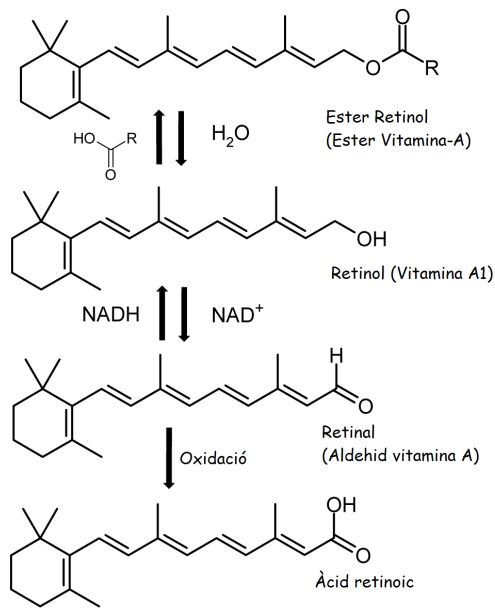
La vitamina A administrada en altas dosis es tóxica y resulta especialmente dañina para el feto causando defectos congénitos. Una dosis diaria segura de vitamina A total para adultos son de 2.4 a 3.0 mg, aunque la FAO (Food and

Agriculture Organization of the United Nations) recomienda 0.6 mg en la dieta de los varones y 0.5mg en la dieta de los hombres (41).

Durante la absorción intestinal es transportada en los quilomicrones en forma de ésteres de retinol y en plasma está unida a la proteína ligadora de retinol. En las células se une a una proteína similar ligadora de retinol y es almacenada en el hígado y otros tejidos (41).

Aunque la vitamina A puede ser donante y aceptor de electrones la ingesta de vitamina A es un potente antioxidante *in vivo*. Hay que diferenciar entre las propiedades químicas y la actividad fisiológica *in vivo*, ya que su acción está modulada por otros factores de la actividad biológica (41).

Valores bajos de retinol se han asociado con una pobre supervivencia en enfermos con AEC (1). Según diversos autores, los efectos del ácido retinoico sobre los receptores RAR y RXR consisten en la regulación del ciclo celular y de la apoptosis. Además, se ha encontrado una disminución de estos receptores en células cancerosas.



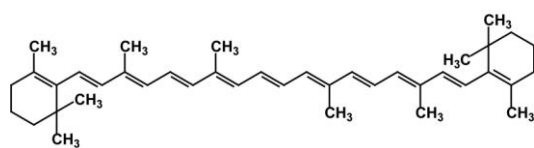
**Fig. 13.** Metabolismo de la vitamina A (Retinol)

Por otra parte, el retinol puede suprimir el cáncer colorrectal a través de mecanismos independientes de estos receptores reduciendo los niveles de proteína beta-catenina, que es capaz de incrementar la transcripción de genes involucrados en la progresión del tumor. Además, el retinol puede también reducir la matriz de metaloproteinasas, RNAm, proteínas y niveles de actividad (42–46).

La vitamina A (retinol) disminuye en pacientes con cáncer, al igual que la vitamina E y ambas se correlacionan con parámetros

de respuesta inflamatoria sistémica como la PCR. Niveles bajos de vitaminas A y E se asociaron con mal pronóstico. Esta disminución se atribuye a un descenso de la proteína ligadora de retinol y de la transtiretina como respuesta de fase aguda (47).

### 2.3.2 β-Carotenos



**Fig. 14.** Estructura de beta caroteno

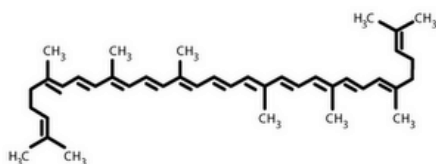
Existen más de 600 tipos de carotenoides cuyas funciones incluyen el aprovechamiento de la luz y la fotoprotección en plantas y microorganismos, la formación de la

vitamina A en animales y la coloración en varias especies (48).

El β-caroteno tiene efectos antioxidantes y se ha demostrado que previene la aparición de CRC (49). Además se ha encontrado una relación inversa entre carotenos y riesgo de cáncer de colon (27).

Los  $\beta$ -carotenos en fumadores actúan como prooxidantes que aumentan los niveles de F2 isoprostanos, IL-6 y TnF-alfa aumentando también el riesgo de padecer cáncer de pulmón (50).

### 2.3.3 Licopeno



**Fig. 15.** Estructura del licopeno

También denominado  $\psi,\psi$ -caroteno es el carotenoide, junto con el beta-caroteno, más abundante en los tejidos humanos, donde está presente en relativamente altas concentraciones en testículos comparado con otros tejidos como

hígado y glándulas adrenales (51).

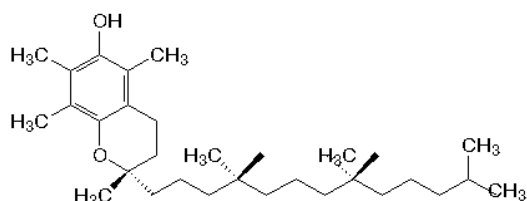
El licopeno tiene una estructura fundamental de cuarenta carbonos. Los carotenos (fitoeno, fitoflueno,  $\xi$ -caroteno) son intermediarios a partir de los cuales, por sucesivas deshidrogenaciones se biosintetiza el licopeno. En los tomates rojos es el principal pigmento y en los amarillos es un precursor del mismo (48).

El licopeno es un antioxidante que se encuentra de forma mayoritaria en el tomate. Además de sus efectos antioxidantes, se le atribuyen efectos anticancerígenos ya que inhibe la proliferación y progresión del tumor in vitro (52). No obstante, existe controversia, ya que algunos autores han encontrado una asociación entre altas concentraciones de licopeno y un aumento del riesgo de padecer cáncer de colon (53), mientras que otros mantienen que es el mayor antioxidante en este tipo de cáncer (54).

### 2.3.4 Vitamina E

Es el nombre colectivo de un grupo de lípidos estrechamente relacionados denominados tocoferoles que contienen un anillo aromático sustituido y una cadena lateral isoprenoide larga. Dado que son hidrofóbicos, los tocoferoles se asocian con las membranas celulares, los depósitos lipídicos y las lipoproteínas de la sangre. Los tocoferoles son antioxidantes biológicos. El anillo aromático reacciona con las formas

más reactivas de radicales del oxígeno y otros radicales libres destruyéndolas. De este modo se protege de la oxidación a los ácidos grasos insaturados y se previenen las lesiones oxidativas de los lípidos de las membranas, lo cual puede causar fragilidad celular. Los tocoferoles se encuentran en los huevos y aceites vegetales, siendo especialmente abundantes en el germen de trigo (55).



**Fig. 16.** Estructura de la vitamina E (alfa tocoferol)

Los tocoferoles se diferencian en el número y posición de los grupos metilo en el anillo bencénico y de los cuales el alfa-tocoferol tiene la máxima actividad biológica. Ésta se debería principalmente a sus propiedades antioxidantes, que dificultan o impiden la peroxidación lipídica contribuyendo así a la estabilización frente a la oxidación de estructuras de membrana y de otras sustancias activas (por ejemplo vitamina A, ubiquinona, y también hormonas y enzimas). La vitamina E está implicada en la transformación del ácido araquidónico en prostaglandinas y hace disminuir la velocidad de agregación plaquetaria. Las necesidades son del orden de 15 mg de alfa-tocoferol al día, pero aumentan si la alimentación es muy rica en ácidos grasos insaturados. Con un aporte normal, las concentraciones plasmáticas se sitúan entre 0,7 – 1,6 mg/100mL. Se considera que existe deficiencia para valores inferiores a 0,4 mg/100mL (48). En animales de laboratorio sometidos a dietas carentes de vitamina E aparece piel escamosa, debilidad muscular, pérdida de peso y esterilidad. La deficiencia de vitamina E en seres humanos es muy rara; el principal síntoma es la fragilidad de los eritrocitos (55).

La vitamina E disminuye en pacientes con cáncer, al igual que la vitamina A y ambas se correlacionan con parámetros de respuesta inflamatoria sistémica como la PCR. Niveles bajos de vitaminas A y E se asociaron con mal pronóstico. Esta disminución se atribuye a un descenso de las proteínas ligadoras como respuesta de fase aguda (47).

## **2.4 MARCADORES TUMORALES**

### **2.4.1 Antígeno Carcinoembrionario (CEA)**

El CEA es una glicoproteína de 180 Kd constituida en su mayor parte por carbohidratos. Se une a la membrana citoplasmática mediante mediante 28 aminoácidos hidrofóbicos que se encuentran en su extremo C-terminal. Se desconoce su función pero debido a su semejanza con las inmunoglobulinas se piensa que podría estar implicada en los mecanismos de reconocimiento y adhesión celular. La familia del CEA la constituyen otras glicoproteínas con gran similitud al CEA codificadas por genes localizados en el cromosoma 19. Las concentraciones séricas normales de CEA son menores de 5ng/mL, si bien incrementos hasta 15ng/mL pueden ser detectados en sujetos fumadores. Puede incrementarse en enfermedades benignas como la cirrosis hepática, la insuficiencia renal, patología pulmonar (EPOC, neumonía, tuberculosis), enfermedades digestivas (colitis ulcerosa, diverticulitis, enfermedad de Crohn, pancreatitis), quistes ováricos o hipertiroidismo, siendo de todas ellas la insuficiencia renal y la hepática las que causan una mayor elevación aunque inferior a 25ng/mL. Aunque en un primer momento podemos pensar en una marcador inespecífico realmente goza de una elevada especificidad de cáncer debido a que estas patologías diferentes de la tumoral causan discretas elevaciones del mismo. En general el CEA se encuentra elevado en tumores epiteliales de pulmón, mama, neoplasias de cabeza y cuello, digestivas,... (8,9).

En lo que al CRC se refiere la sensibilidad del CEA varía dependiendo del estadio en que se encuentre el paciente. Puede ser de 4 a 10% en el estadio A (de Dukes), 25-45% en el B, 40-65% en el C y de 65-90% en el D. Hay que decir que el CEA se asocia a carcinomas bien diferenciados. (9)

El CEA se puede utilizar como marcador pronóstico ya que la mayoría de los pacientes con niveles preoperatorios inferiores a 5ng/mL siguen libres de enfermedad, mientras que si esos valores son superiores alrededor de un 66% vuelven a desarrollar la enfermedad para el estadio B. Lo mismo sucede para el C pero las cifras son de 15% libres de enfermedad para los que tienen niveles patológicos y 41% para los que tienen

valores preoperatorios normales. Además hay que tener en cuenta que el CEA es el primer signo de recidiva antes de que sea positiva cualquier otra prueba diagnóstica ya sea clínica o de imagen. Si la velocidad de ascenso es elevada es más probable la recidiva hepática mientras que si se produce lentamente es más frecuente que se trate de una recidiva loco-regional. Se deben realizar determinaciones de CEA para el seguimiento cada 3 meses y se debe considerar positivo si el valor asciende un 30% debiendo repetirse la determinación dentro del mes siguiente. No obstante pueden existir recidivas con CEA negativo. Al parecer la reseabilidad de la recidiva está en relación con la concentración del CEA siendo del 63% en los casos menores de 11ng/ml y del 30% cuando se supera ese valor. (9)

El CEA debe utilizarse como monitorización del tratamiento con determinaciones cada 2-3 meses mientras dure el tratamiento. Si persisten niveles elevados indica progresión de la enfermedad, aún en ausencia de otras pruebas. No obstante al inicio del tratamiento se pueden observar incrementos que no indican progresión y son debidos al efecto citotóxico de la droga. (9)

#### **2.4.2 Antígeno Carbohidrato 19.9 (CA19.9)**

Es una proteína constituida principalmente por carbohidratos (85%), especialmente ácido siálico, fucosa y sialil lacto N fucopentosa. Se consideran normales las concentraciones inferiores a 37 U/mL y pueden incrementar su valor enfermedades benignas como hepatopatías, pancreatitis e insuficiencia renal con valores superiores a las 1000 U/mL en el caso de hepatopatías, aunque rara vez pasa de las 500 U/mL. Por esto mismo algunos autores cuestionan su utilidad en el cáncer de páncreas, aunque utilizando valores superiores a 1000 U/mL como límite de detección la especificidad es del 98%. Cuando cesa la enfermedad ya sea de tipo neoplásico o no los valores descienden llamativamente (8,9).

Es de utilidad en el seguimiento de carcinomas gastrointestinales, cáncer pancreático, neoplasias ováricas y en tumores broncopulmonares, especialmente en el carcinoma indiferenciado de células grandes (9).

En realidad el CA19.9 aporta escasa información al seguimiento de esta enfermedad, aunque podría tener algún valor pronóstico. Para la detección de una recidiva su sensibilidad oscila entre el 30 y 50% y su uso combinado con el CEA sólo permite aumentar su sensibilidad en un 5%. El CA19.9 tiene una sensibilidad del 60 – 70% por lo que se podría utilizar en la monitorización del tratamiento en estos pacientes aunque hay pocos pacientes con CA19.9 positivo y CEA negativo.



## 2.5 MARCADORES DE RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA, NUTRICIONALES Y PROTECTORES

### 2.5.1 Proteína C Reactiva (PCR)

Es una proteína cuyo peso molecular está entre 118000 y 144000 Da con un contenido sustancial de hidratos de carbono. El gen de la PCR está localizado en el cromosoma 1 humano. Su concentración sérica normal suele ser de 100 ng/mL en el momento del nacimiento, de 170 ng/mL durante la infancia y de 470 ng/mL a 1340 ng/mL en sujetos adultos. A pesar de estas concentraciones la PCR tiene gran importancia como reactante de fase aguda altamente sensible. Generalmente se determina por su capacidad de precipitar la sustancia C o por métodos inmunológicos que incluyen nefelometría, precipitación, RIA y enzimoimmunoanálisis. En nuestro caso lo hemos determinado por inmunoturbidimetría. La PCR es una proteína con migración gamma en la electroforesis y puede formar una banda distinta de aspecto monoclonal en pacientes que presentan una respuesta inflamatoria intensa. La PCR reconoce específicamente a la fosfocolina, parte hidrofóbica de la fosfatidilcolina en la membrana celular. Esta unión activa la vía clásica del complemento y estimula a los macrófagos. En los casos en que sus niveles se elevan por encima de 10mg/L suele indicar la existencia de un proceso en fase aguda como infarto agudo de miocardio, traumatismo, infección, cirugía, estrés o tumores. En cambio cuando sus niveles son inferiores a 10mg/L actúa como un indicador de procesos crónicos tales como el daño endotelial, aterosclerosis, infección periodontal, infección por *C. pneumoniae*, *H. pylori*, Citomegalovirus o inflamación bronquial. Es una proteína scavenger (*limpiadora*) que ayuda a recoger y transportar los restos celulares y los productos de degradación de los fagocitos (sistema retículo endotelial) para procesarlos y conservar sustancias vitales, por ejemplo el hierro (56).

Como ya hemos comentado su aumento en pacientes con CRC se relaciona con un mal pronóstico (57–61).

### **2.5.2 Proteínas Totales (PT)**

El examen de las proteínas del plasma puede proporcionar información que refleje diferentes estados patológicos. La medición de las PT proporciona al médico información acerca del estado general del paciente con relación a su nutrición o con alguna enfermedad orgánica grave (como en los estados con pérdida de proteínas). El esqueleto de las moléculas proteicas es una cadena continua de átomos de carbono y nitrógeno que forman aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos. En un extremo hay un grupo amino libre y en el otro un grupo carboxilo libre. Mientras que el esqueleto del péptido es cualitativamente invariable entre las diferentes proteínas, las proteínas tienen una identidad estructural en virtud de los grupos laterales o restos de los aminoácidos constituyentes. El peso molecular medio de un aminoácido es de 120 Da. Las proteínas séricas tienen un tamaño que varía aproximadamente entre 66 y más de 700 KDa (56).

### **2.5.3 Estradiol (E2)**

Es una hormona esteroidea con un anillo A de tres dobles enlaces insaturados derivada del colesterol que influye en el desarrollo de las características sexuales secundarias en hombres y mujeres y regulan el ciclo reproductor femenino (55). Los ovarios, los testículos y las glándulas suprarrenales tienen capacidad para sintetizar estrógenos a partir de los andrógenos androstendiona y testosterona. El ovario sintetiza casi todo el estradiol. Un gran número de órganos, como la piel, la grasa, los hematíes, el útero y el hígado tienen enzimas que metabolizan estrógenos, pero el hígado desempeña el papel principal. El estradiol y la estrona son conjugados en el hígado y se excretan como sulfatos y glucuronatos. El sulfato de estrona y otros conjugados de estrógenos se excretan en la bilis y son hidrolizados en el intestino y reabsorbidos a la circulación periférica. En sangre va unida a la globulina ligadora de hormonas sexuales (SHBG), la misma proteína transportadora que se une a la testosterona y otros estrógenos. En el suero el estradiol se encuentra principalmente en forma conjugada, 60% unido a albúmina, 38% a SHBG y 2 a 3% en forma libre. El estradiol es el más potente de los estrógenos y está presente en concentraciones inferiores a 50pg/mL en el período preovulatorio. Las concentraciones aumentan durante la segunda mitad de la fase folicular y alcanzan un pico de 150 a 500 pg/mL. Tras el pico de la hormona

luteinizante (LH) sufre un marcado descenso casi hasta alcanzar los niveles ovulatorios y a continuación aumenta ligeramente hasta 100 o 200 pg/mL durante la fase luteínica. Durante la menopausia las concentraciones caen uniformemente hasta aproximadamente el 15% de los niveles premenopáusicos (56).

El hecho de que el cáncer de colon sea más frecuente en varones y en mujeres post menopáusicas lleva a pensar en un papel protector de los estrógenos en este tipo de tumor. Parece ser que actúan tanto a nivel genético induciendo apoptosis (mediante la fragmentación de DNA, aumentando la señal de p53 e induciendo la cascada de las caspasas), como a nivel de los receptores clásicos de estradiol induciendo señales rápidas que aumentan el receptor de vitamina D (62).

## 2.6 COLESTEROL, HDL, LDL, TRIACILGLICEROLES

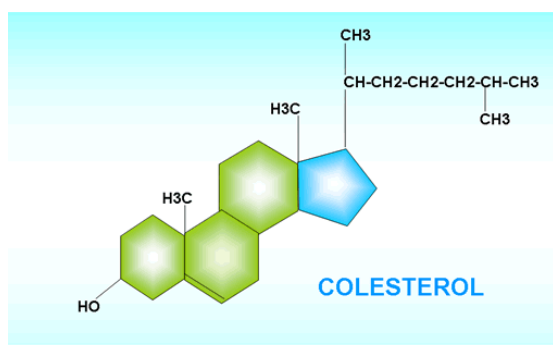


Fig. 17. Estructura del colesterol

El colesterol es anfipático, con un grupo de cabeza polar (el grupo hidroxilo en C-3) y un grupo hidrocarbonado apolar (el núcleo esteroide y la cadena lateral hidrocarbonada en C17) que es casi tan largo como un ácido graso de 16 carbonos en su forma extendida.

Debido a su función estructural en las membranas es esencial para la vida pero no es necesario su consumo en la dieta ya que las células son capaces de sintetizarlo a partir de precursores sencillos. El colesterol se sintetiza a partir de acetato y las moléculas de isopreno intermediarias pueden ser a su vez precursores de otros lípidos naturales. La síntesis tiene lugar en cuatro fases: primero tres unidades de acetato se condensan para formar un intermediario de seis átomos de carbono (mevalonato), después se convierte el mevalonato en unidades de isopreno activado; seis unidades de isopreno de cinco carbonos se polimerizan para dar lugar a la estructura lineal de treinta carbonos (escualeno) y el escualeno se cicla para formar los cuatro anillos del núcleo esteroide además de una serie de cambios adicionales (oxidaciones, eliminación o migración de grupos metilo) para producir el colesterol (55).

La mayor parte de la síntesis del colesterol tiene lugar en el hígado. Desde allí el colesterol se exporta en una de las tres formas siguientes: colesterol biliar, ácidos biliares o ésteres de colesterol a otros puntos del organismo. El colesterol y sus ésteres son prácticamente insolubles en agua, por lo que se combinan con proteínas transportadoras específicas denominadas apolipoproteínas con diversas proporciones de fosfolípidos, colesterol, ésteres de colesterol y triacilgliceroles (TG). Estos complejos se denominan lipoproteínas, cuya densidad varía desde los quilomicrones (<1,006 g/ml),

VLDL (de 0,95 a 1,006 g/ml), IDL (de 1,006 a 1,063 g/ml) hasta las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (de 1,063 a 1,210 g/ml). Los quilomicrones transportan los ácidos grasos de la dieta hasta los tejidos, donde serán almacenados o consumidos como combustible. Los quilomicrones desprovistos de la mayor parte de los triacilgliceroles pero que todavía contienen colesterol, apoE y apoB-48 se unen a receptores hepáticos mediante la apoE siendo endocitados y dejando el colesterol en el hígado. Cuando en la dieta hay un exceso de ácidos grasos y glúcidos éstos se transforman en triacilgliceroles en el hígado y son exportados mediante lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) junto con una pequeña parte de colesterol hasta tejido adiposo y músculo. Las VLDL una vez que han perdido una pequeña parte de los TG se convierten en lipoproteínas de densidad intermedia (IDL). De estas IDL una parte es recaptada por el hígado y otra parte pierden más TG convirtiéndose en lipoproteínas de baja densidad (LDL) muy ricas en colesterol y ésteres de colesterol, con apoB-100 como principal apolipoproteína, la cual es reconocida por receptores de las células de los tejidos extrahepáticos y éstos recogen el colesterol de las LDL. En el hígado se sintetizan precursores de las HDL que contienen relativamente poco colesterol y nada de sus ésteres. Las HDL contienen apoA-1, apoC-1, apoC-2, apoD y el enzima lecitina-colesterol acil transferasa (LCAT) que cataliza la formación de ésteres de colesterol a partir de lecitina y colesterol. Este encima convierte el colesterol y la fosfatidilcolina (lecitina) de los quilomicrones y de las VLDL residuales en ésteres de colesterol los cuales empiezan a formar un núcleo, transformando la HDL naciente en HDL madura que retorna al hígado cargada de colesterol (55).

Los estudios previos acerca de la influencia del colesterol, HDL, LDL y triglicéridos sobre el cáncer de colon no está muy clara aunque parece existir una relación entre cifras altas de colesterol y triglicéridos y cáncer de colon (63), aunque no se sabe si son una causa de la enfermedad o una consecuencia del estilo de vida y que sea este último el responsable de la enfermedad (64). Hay varios posibles mecanismos por los que lípidos de suero y lipoproteínas pueden influir en AEC. Lípidos y lipoproteínas han sido asociados con procesos neoplásicos tales como inflamación(65), resistencia a la insulina (66) y el estrés oxidativo (67,68). Sin embargo, se desconoce si lípidos y lipoproteínas causan estos procesos o si son intermedios o son los factores de correlación los que actúan dentro de estos mecanismos (64). En el caso del HDL y triglicéridos se ha demostrado que niveles bajos estaban inversamente asociados con el

riesgo de padecer AEC e incluso se ha visto alta asociación entre los niveles de TG y de LDL. Existen varios posibles mecanismos por los que las concentraciones de HDL-colesterol en sangre pueden estar, directa o indirectamente, relacionadas en la carcinogénesis colorrectal. Las concentraciones bajas de HDL han sido relacionadas con el incremento de las concentraciones de citoquinas proinflamatorias tales como la interleukina 6 (IL-6) en la circulación sanguínea así como los receptores factor-alfa de la necrosis tumoral, mientras que el incremento de las concentraciones de citoquinas antiinflamatorias tales como la IL-10 están asociadas con el aumento de las concentraciones de HDL-colesterol (65). Estas citoquinas proinflamatorias parecen estimular el crecimiento celular y la proliferación celular y la inhibición de la apoptosis (69)<sup>(69)</sup>, mientras que las citoquinas inflamatorias inhiben la producción de estas citoquinas proinhibidoras (70). Estas observaciones sugieren que el HDL puede modular la carcinogénesis de colon a través de procesos inflamatorios. Otro mecanismo sugerido es a través de la modulación del estrés oxidativo debido a que el HDL muestra actividad antioxidante y se cree que confiere protección frente a la oxidación de LDL-colesterol (67,68). Una baja concentración de HDL conduce a un LDL-colesterol más oxidado, el cual ha sido descrito como una de las causas del incremento del estrés oxidativo intracelular (71), un proceso que está ligado a la patogénesis del cáncer (72). Es interesante que no haya estudios que analicen el uso cada vez mayor de drogas reductoras de lípidos (por ejemplo, estatinas) y bajas dosis de AAS en pacientes con desviaciones de sus concentraciones de lípidos. Ambas drogas han sido asociadas con un efecto quimiopreventivo en la carcinogénesis colorectal (73,74) y puede así, interferir con las asociaciones investigadas en este estudio (64). Nosotros hemos realizado una historia clínica exhaustiva en la que estudiamos cómo las estatinas, el AAS, otros AINEs y otras patologías influyen sobre los parámetros del estudio.

## 2.7 OBESIDAD Y DIETA



**Fig. 18.** Alimentos ricos en antioxidantes

La obesidad es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de diversos cánceres, incluyendo CRC. Cada 5 unidades incrementadas en el índice de masa corporal, incrementa el riesgo de CRC en un 30% en hombres y un 13% en mujeres (75).

El consumo de dieta estilo occidental en ratones causó obesidad acompañado de un incremento de estrés oxidativo, inflamación en el colon y desarrollo de tumores de colon sin manipulación genética ni química. Son consistentes los hallazgos de que la restricción calórica protegió a los ratones de desarrollo de focos de criptas aberrantes y neoplasia de colon (75).

En los últimos años han aparecido algunas hipótesis para explicar esta relación. La noción de la resistencia a la insulina o del mecanismo dañado para normalizar los niveles de glucosa en sangre han formado el cuerpo de estas hipótesis, pero también se ha avanzado en otros mecanismos relacionados (factores de crecimiento, resistencia a la insulina, inflamación crónica y hormonas esteroideas). También se han identificado genes relacionados con la susceptibilidad de padecer obesidad. Entre ellos están genes relacionados con la vía de la insulina (*INS*, *INSR*, *IRS1*, *IRS2*, *P13K*), con el sistema de las IGF (*IGF1*, *IGF2*), con adipoquinas y reguladores del metabolismo adipocítico y diferenciación (*ACDC*, *LEP*, *TNF*, *PPARG*) y con la regulación periférica del gasto energético y homeostasis (*UCP1*, *UCP2*, *UCP3*, *ADRB2*, *ADRB3*) (75).

En 10 investigaciones de cohortes de carácter prospectivo todas reportaron una asociación positiva entre el IMC y el cáncer colorrectal con un riesgo relativo en un rango de 1,2 a 3,4. El tamaño corporal también parece que influye en los estados precoces de la carcinogénesis colorrectal: el IMC se ha asociado con adenoma colorrectal, y particularmente grandes adenomas del colon distal en siete estudios epidemiológicos (75).

Hay evidencias que sugieren que la adiposidad abdominal o visceral es un factor de riesgo para el CRC independiente del IMC. De hecho el WHR (ratio cintura-cadera) o la circunferencia abdominal parecen ser indicadores de obesidad superiores al IMC, particularmente en individuos mayores (76).

Algunos investigadores han sugerido que el hierro, particularmente la forma hemo, puede jugar un papel en el desarrollo del cáncer. La carne roja es una fuente primaria de hierro hemo que se encuentra de forma natural en la carne como parte de la hemoglobina y mioglobina, aunque relativamente pocos estudios han evaluado el potencial papel que este factor juega en el riesgo de cáncer (76).

La WCRF (World Cancer Research Fund)/AICR (American Institute for Cancer Research) apoyan el consumo de carne roja como causa de cáncer colorrectal aunque la evidencia de asociación es relativamente débil (RR <1.5). La WCRF/AICR no sugiere que la gente excluya la carne roja de su dieta, pero sugiere que el consumo debe ser inferior a 500 g por semana, basándose en datos americanos provenientes de encuestas (77).

Diversos factores han sido propuestos para explicar la relación entre obesidad e incremento de riesgo de CRC. La obesidad está asociada con elevadas concentraciones de IGF-1, que es un conocido estimulador de crecimiento epitelial. La insulina es mitogénica solo a concentraciones suprafisiológicas a través de la activación de la vía IGF1. Las concentraciones fisiológicas de IGF1 son promotores del crecimiento y mitogénicas, y las concentraciones incrementadas de IGF1, cuando se ajustan para concentraciones de sus proteínas de unión, se asocian con un modesto incremento del riesgo de CRC. Las concentraciones de leptina también incrementan en la obesidad y la leptina tiene propiedades como promotor de crecimiento, mitogénico y antiapoptótico en líneas celulares de cáncer de colon pero no en epitelio normal. En el pólipo adenomatoso de colon de ratón, la leptina no promovió CRC o crecimiento de xenoinjerto en ratones. El incremento de las concentraciones en plasma de citoquinas inflamatorias incluyendo TNF alfa y IL6 ocurre en la obesidad y están elevados en sujetos con adenoma colorrectal. Además, fármacos antiinflamatorios, como aspirina reducen la incidencia de adenoma colorrectal. La pérdida de peso reduce significativamente las concentraciones circulantes de TNF alfa, IL8 y MCP-1.



Concentraciones incrementadas de obesidad se acompañan por concentraciones progresivamente mayores de citoquinas en suero y riesgo incrementado de neoplasia colorrectal. Esta relación se soporta por la evidencia de que las citoquinas tienen un efecto procarcinogénico en tejidos colorrectales. Reduciendo la actividad sistémica de TNF alfa y eliminando NF-kB en células mieloides descendieron los tumores de colon en los modelos de colitis de ratón. Por tanto, esta reducción de citoquinas sistémicas inducida por régimen de dieta podría contribuir a descender la neoplasia de colon en individuos obesos. La pérdida de peso inducida por la dieta reduce las concentraciones en mucosa rectosigmoide de mediadores inflamatorios TNF alfa, IL6 IL8, IL-1beta y MCP-1. En la confirmación, la expresión de vías genéticas reguladas por TNF alfa y IL6 y 1beta también disminuyeron. En modelos de ratón con CRC inducida con colitis, la inhibición de vías genéticas activadas de TNF alfa y IL6 descendieron el CRC. También observamos un descenso en la expresión de factores de transcripción implicados en inflamación colorrectal, CRC y otros tipos de cáncer (75).

El análisis de subgrupos en un estudio reveló que la aspirina tenía un efecto protector mayor en sujetos obesos que en delgados (75).

La obesidad está asociada con la inflamación crónica de bajo grado en tejido adiposo, hígado y endotelio coronario y se acompaña de incremento de estrés oxidativo, que a través de moléculas intermediarias, incrementa la expresión de protooncogenes FOS y JUN que llevan al incremento de la transcripción de genes proinflamatorios y reguladores de ciclo celular que promueven la carcinogénesis. La inflamación crónica puede mejorar el inicio y la progresión de CRC (75).

La inflamación crónica está presente en la mucosa colorrectal de individuos obesos y la pérdida de peso inducida por la dieta descende la inflamación e inhibe las vías inflamatorias y de genes del cáncer (75).

La reducción de peso inducida por la dieta regula a la baja los factores de transcripción que son cruciales en la inflamación y carcinogénesis y por tanto pueden reducir el riesgo de CRC. La expresión de vías genéticas involucradas en la síntesis de PGs fue también más baja. En modelos de obesidad humana y de ratón, la expresión incrementada de COX2 es un regulador mayor para la síntesis de PG en colon. La

restricción calórica ha mostrado reducir la expresión de COX2 en obesidad de ratón acompañada por un descenso del número de focos de criptas aberrantes (75).



**Fig. 19.** Alimentos ricos en grasas

La formación de radicales libres de oxígeno y el estrés oxidativo incrementado une la inflamación colónica y la formación de cáncer. La obesidad promueve el estrés oxidativo, que a través de vías intermediarias, potencia la expresión de genes proinflamatorios y de ciclo celular, que pueden llevar a inflamación y a daño del DNA y resultar en la pérdida de las funciones supresoras de tumor que son características de CRC. La restricción de calorías reduce la formación de radicales libres de oxígeno y el daño en el DNA en hígado y corazón de roedores. La obesidad crea un ambiente en colon que promueve el inicio y progresión de CRC y la restricción calórica tiene un efecto opuesto reduciendo la formación de radicales libres de oxígeno y descendiendo el estrés oxidativo (75).

La pérdida de peso inducida por dieta en mujeres obesas redujo la inflamación de la mucosa colorrectal al descender las citoquinas inflamatorias, células inflamatorias, reguló a la baja la inflamación y las vías genéticas del cáncer y la del gen del factor de transcripción que potencia la inflamación y el riesgo de CRC. Por tanto, la obesidad apareció acompañada de un bajo grado de estado inflamatorio en mucosa colorrectal, y la pérdida de peso por la dieta descendió esa inflamación. Debido a que la inflamación es un importante cofactor para la carcinogénesis colorrectal, ese estado inflamatorio puede contribuir a potenciar el riesgo de CRC en la obesidad; la pérdida de peso contrarresta este efecto y puede por tanto disminuir el riesgo de CRC (75).

Está demostrado que una dieta rica en sustancias antioxidantes como beta-carotenos, vitamina E y vitamina C disminuye el riesgo de padecer AEC reduciendo los niveles plasmáticos de TNF-alfa, IL-6 y F2 isoprostanos (a excepción de los individuos fumadores donde el beta carotenos actúa como pro-oxidante) (78).

También ha sido demostrado que el consumo de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga aumenta el estrés oxidativo mediante el aumento de la peroxidación lipídica (79,80). El consumo de hierro intensifica el estrés oxidativo catalizando la

producción de ROS por la vía de la reacción de Haber-Weiss (81,82). Se ha encontrado una asociación inversa entre una dieta saludable y cáncer de colon y adenoma de colon (83–88).

Existen evidencias de que los pacientes con pólipos adenomatosos de colon tienen un mayor índice de estrés oxidativo y siguen dietas menos saludables que los pacientes sin pólipos adenomatosos (89).

## **2.8 EJERCICIO FÍSICO Y CÁNCER DE COLON**

En tres estudios realizados en pacientes con CRC la supervivencia aumenta con el incremento de niveles de ejercicio físico. Dos estudios realizados en pacientes con CRC demostraron que las personas que realizaban ejercicio al menos una vez a la semana tenían una supervivencia incrementada en los estadios II y III, mientras que no se observó asociación en los estadios I y IV. El ejercicio post diagnóstico se vio que descendía la mortalidad mientras que en el ejercicio físico prediagnóstico no se observó un incremento de la mortalidad. En mujeres que disminuyeron su nivel de actividad se observó un modesto incremento en la mortalidad, aunque no fue significativo. Un posible mecanismo por el cual el ejercicio físico puede tener un efecto en la biología del tumor es incrementando la sensibilidad a la insulina, por tanto descendiendo la concentración de insulina en suero; se ha sugerido que la insulina promueve la carcinogénesis en varios órganos incluido el colon. Otro posible mecanismo por el cual la actividad física disminuye la mortalidad es reduciendo el tiempo de tránsito en el intestino grueso, alterando los niveles de prostaglandinas y la función del sistema inmune (90).

## **2.9 APOLIPOPROTEÍNA D**

La Apolipoproteína D (ApoD) es una glicoproteína extracelular de la familia de las lipocalinas, implicadas en diversas funciones como la respuesta inmunológica, regulación de la proliferación celular, quimiorrecepción, metabolismo de retinoides, crecimiento de axones y regulación de proteólisis (91,92).

Esta lipocalina se expresa de manera predominante en el Sistema Nervioso (SN), tanto en la etapa prenatal (pericitos vasculares) como postnatal (glia y neuronas) (93,94) así como durante la vida adulta (95). También se expresa en otros tejidos, y en el plasma va transportada por las HDL, por lo que pudiera intervenir en la regulación del colesterol y otros lípidos (95).

La cantidad de ApoD se incrementa de forma considerable en los tumores sistémicos originados por glándulas apocrinas y también en algunos tumores cerebrales primarios (96). Aunque el papel biológico concreto de la ApoD se desconoce, la presencia de ApoD en tumores parece ser un factor pronóstico en la evolución. En relación con el SN, el aumento de la expresión de ApoD observado en numerosas patologías neurodegenerativas podría servir para realizar un diagnóstico precoz de las mismas (96).

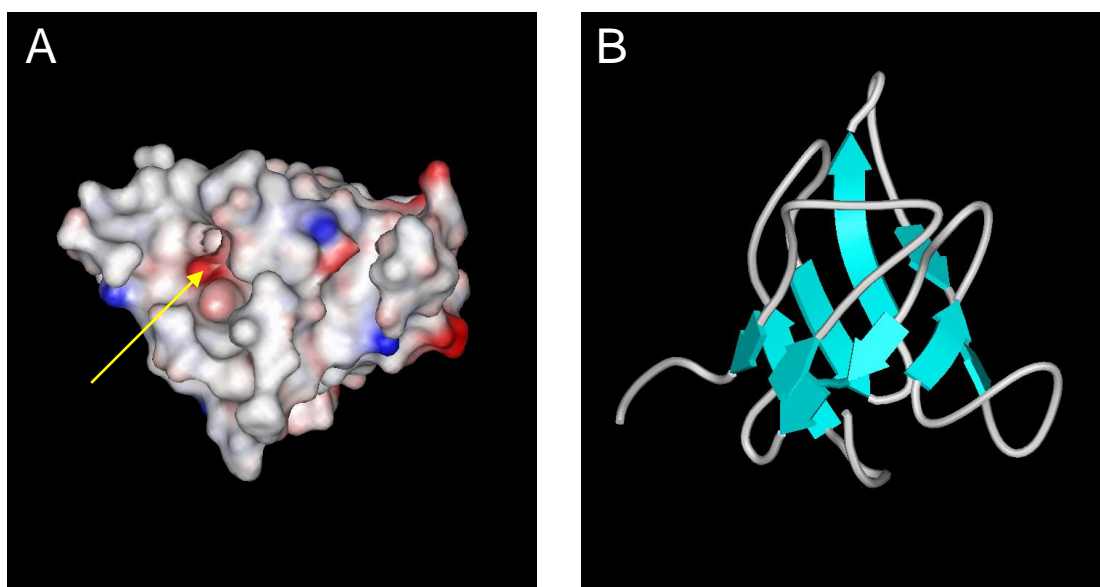
En caso de estrés celular se ha observado una sobre-expresión de ApoD que es además intracelular (97,98), lo que lleva a pensar que tiene un papel fundamental en la proliferación-supervivencia-muerte celular.

El gen de la ApoD está localizado en el cromosoma 3 de los seres humanos y en el cromosoma 16 de los roedores. Su secuencia de aminoácidos no guarda similitud con la del resto de las apolipoproteínas pero sí un alto grado de similitud con miembros de la familia de las lipocalinas (96,99).

El peso molecular de la ApoD humana madura es de 19 kDa. Se compone de 169 aminoácidos presentando puntos de glicosilación en los residuos 45 y 178, correspondientes a asparragina . Su peso molecular calculado mediante electroforesis en

SDS es de 32 kDa, de los cuales aproximadamente el 18% corresponden a carbohidratos. El patrón de glicosilación de la ApoD varía dependiendo del lugar en el que se encuentre, correspondiéndose lo anteriormente citado con la ApoD plasmática, donde los carbohidratos son menos complejos y extensos y la glicosilación es por tanto menor que en la ApoD de otras secreciones y tejidos del organismo (96).

Para la estructura secundaria se ha propuesto una pequeña estructura en barril  $\beta$  formada por ocho hojas  $\beta$  antiparalelas (Figura 1B). Dentro de esta estructura los residuos hidrofóbicos se encontrarían en la superficie interna de un bolsillo central (flecha en la Figura 1A), siendo éste el supuesto sitio de unión para el ligando de la ApoD. Otros residuos hidrofóbicos también podrían participar en la asociación de ésta con las HDL (96).



**Figura 1.-** Estructura terciaria de la Apolipoproteína D en una visión tridimensional. **A.-** Modelo de superficie de la proteína. Se señala con una flecha el bolsillo donde se unen ligandos hidrofóbicos. **B.-** Modelo del esqueleto de carbonos  $\alpha$  de la proteína mostrando además las ocho cadenas  $\beta$  que forman el barril de esta lipocalina.

Los estudios poblacionales ponen de manifiesto variaciones en el gen de ApoD en forma de polimorfismos que podrían afectar a la función de ApoD, al metabolismo de las lipoproteínas y a las concentraciones plasmáticas de las mismas. De hecho ciertos alelos del gen ApoD muestran una correlación significativa con la predisposición a padecer ciertas enfermedades neurodegenerativas (100).

La ApoD se ha detectado en gran variedad de órganos, tejidos y fluidos, lo que refleja su importancia y sugiere que puede desempeñar diferentes funciones dependiendo del órgano en el que se encuentre. Se ha detectado en plasma, en el fluido lacrimal, en el cuerpo ciliado ocular, en el líquido cefalorraquídeo sin que sus concentraciones tengan relación con la plasmática, en la perilinfa con concentraciones comparables a las del plasma, en los fluidos del oído medio, de forma libre en la orina donde es la lipoproteína mayoritaria, y también se ha encontrado en el sudor (96).

En contraste con el resto de las lipoproteínas no es el intestino y el hígado donde encontramos una mayor síntesis de ApoD sino en las glándulas adrenales, en los riñones y en el sistema nervioso central (SNC) (96). Las células que expresan mayor cantidad de mRNA de ApoD son los fibroblastos perivasculares, las células gliales, piales y perivasculares del SNC y en algunas neuronas (93,94).

La ApoD se encuentra principalmente (en un 83%) formando parte de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), de las que supone un 1 a 2% (101), aunque también puede encontrarse en pequeña cantidad en las de muy baja densidad (VLDL) y en las de baja densidad (LDL) (96). Como componente de las HDL se observó que se asociaba con la proteína colesterol-éster-transferasa (CETP), con la Apo A-I o con Apo A-II (más del 50% de la ApoD presente en las HDL está formando estos complejos con la Apo A-II) (101). También en las HDL está formando parte de los complejos responsables del transporte del colesterol desde los tejidos periféricos al hígado para su metabolismo, especialmente con el enzima lecitin-colesterol-acil-transferasa (L-CAT). Se cree que la ApoD podría estabilizar la actividad enzimática de la L-CAT o actuar como transportador de sustratos o productos de la reacción, como el colesterol o los ésteres de colesterol, ya que se ha observado un aumento en la actividad de esterificación del colesterol por la L-CAT en presencia de ApoD. Todo esto sugiere interacciones entre el metabolismo del colesterol y la ApoD, pero existen evidencias de que no es el colesterol el principal ligando de la ApoD tal y como se creía en un principio. Esto viene avalado por la baja afinidad existente entre ambos y por el hecho de que en el fluido quístico del cáncer de mama la concentración de ApoD aumenta hasta 1000 veces, mientras que la del colesterol solo aumenta el doble (96).

La ApoD puede encontrarse también de forma libre o unida a otras moléculas de pequeño tamaño ya que interacciona con muchos ligandos como la progesterona y otras progestinas, pregnenolona, bilirrubina, ácido araquidónico, estrógenos, andrógenos y el E-3-metil-2-hexanoico (componente mayoritario del olor axilar). De todas estas la ApoD presenta una mayor afinidad por el ácido araquidónico, lo que nos lleva a pensar que a través de la L-CAT la ApoD podría intervenir en la regulación de su metabolismo, retirándolo para prevenir así su transformación en ésteres de colesterol (96). Es también importante mencionar que otra de las moléculas que une es el ácido retinoico, molécula que juega un papel principal en el desarrollo del SN. De hecho ApoD es la lipocalina humana con mayor afinidad por el ácido retinoico (102).

La condición de lipocalina de la ApoD y la variedad de tejidos en los que se expresa hacen pensar en la hipótesis de que esta apolipoproteína sea multiligando y multifunción y que tanto la función como los ligandos varíen dependiendo del órgano en el que se exprese (96).

### **2.9.1 Acciones Vasculares de ApoD**

Como ya hemos comentado anteriormente el 1 al 2% del HDL está formado por ApoD. Así mismo podemos decir que el 83% del ApoD sanguíneo se encuentra en las HDL. De esta manera se ha visto que si disminuye ApoD en las HDL antes que en suero aumenta el riesgo de infarto. El hecho de que sean las HDL las responsables de transportar el colesterol desde los tejidos periféricos al hígado y que la mayor parte de ApoD se encuentre en estas lipoproteínas nos hace pensar en sus efectos beneficiosos desde el punto de vista cardiovascular (101).

Se ha detectado la presencia de ApoD en la placa de ateroma, pero no en las coronarias normales (101). Un hecho importante es el hallazgo de gran cantidad de ApoD en células quiescentes (103), pero sin embargo la expresión está muy disminuida en las células que proliferan. Los estudios *in vitro* demuestran que ApoD inhibe la proliferación celular, obteniéndose un efecto muy parecido al que producen los antagonistas del calcio, lo que demuestra sus efectos beneficiosos en el terreno



cardiovascular. Así mismo en su faceta de inhibidora de la proliferación podría jugar un papel importante en el campo del cáncer (101).

### 2.9.2 ApoD en el Sistema Nervioso

Podemos encontrar ApoD tanto en el Sistema Nervioso Central (SNC) como en el nervio periférico (SNP) y forma parte del escaso grupo de apolipoproteínas que se sintetizan en el SN junto a la Apo E, J y C-I (96).

El papel de ApoD como transportadora de moléculas lipídicas sugiere que podría desempeñar una importante función en el transporte de lípidos durante la regeneración neuronal (96).

La ApoD se acumula en el nervio periférico tras la lesión del mismo. Su concentración allí es mucho mayor que el resto de las apolipoproteínas y además se ha demostrado que se sintetiza localmente y que no proviene del torrente sanguíneo, como es el caso de la Apo A-I y la Apo A-IV. En la lesión del nervio ciático de rata su concentración está aumentada 500 veces en relación a la basal y su mRNA está elevado hasta 40 veces. Su misión podría ser la del transporte de colesterol para la remielinización y la formación de nueva membrana. Además podría transportar bilirrubina, la cual se encuentra en los nervios dañados, previniendo así la acumulación tóxica de la misma (96).

En los animales adultos la expresión de ApoD se localiza principalmente en las células piales y perivasculares, astrocitos y oligodendrocitos y de forma inconstante en las neuronas (96).

En el Sistema Nervioso ApoD podría participar en los procesos de regeneración y remielinización. También se ha propuesto la función de transportadora de lípidos y otras sustancias a través de la barrera hematoencefálica. También podría desempeñar una función relevante en el mantenimiento de los niveles apropiados de colesterol en compartimentos no expuestos directamente a la sangre. Por último también se ha

propuesto como función de esta lipocalina el transporte local de hormonas esteroideas, las cuales modulan la formación de las conexiones sinápticas (96).

### 2.9.3 ApoD y patologías nerviosas

Patología / Alteración del Sistema Nervioso	Lugar de sobre-expresión	Aumento detectado		Ref.
		mRNA	Proteína	
Ataxia cerebelosa (dos modelos en ratón)	- Cerebelo	+		1
Enfermedad de Unverricht-Lundborg (modelo en ratón: ataxia progresiva)	- Cerebro	+		2
Enfermedad de Niemann-Pick - tipo C (modelo en ratón: neurodegeneración progresiva, ataxia)	- Cerebelo, fracción mielínica		+	3
	- Globus pallidus, tálamo, sustancia negra. Sustancia blanca en la cápsula interna y cerebelo. Precusores oligodendrocíticos	+	+	4
	- Cerebro			5
Enfermedad de Alzheimer	- Fluido cerebro-espinal		+	6
	- Neuronas piramidales con degeneración granulovacuolar		+	7
	- Córtex con alteraciones neurofibrilares	+	+	8
	- Hipocampo		+	6, 9
	- Depósitos $\beta$ -amiloides		+	10
Esquizofrenia y/o Trastorno Bipolar	- Suero sanguíneo		+	11,12
	- Caudado y área 9 de Brodmann		+	11
Enfermedades desmielinizantes en el SNC (Esclerosis múltiple)	- Fluido cerebro-espinal y suero (producción intratecal)		+	13
Astrocitomas (pilocítico y otros no infiltrantes)	- Astrocitoma	+	+	14
Encefalopatías espongiiformes transmisibles (en ratón)	- Cerebro	+		15
Encefalitis letal por virus Sindbis (en ratón)	- Sistema nervioso central	+		16
Respuesta a fármacos neurolépticos (en ratón)	- Estriado, globus pallidus, tálamo y sustancia blanca	+	+	11,12 17
Dolor neuropático tras ligadura de los nervios espinales L5 y L6 (en rata)	- Ganglio de la raíz dorsal	+		16
Daño en SNP (en rata): -sección del nervio ciático	- Sitio de la lesión		+	18
	- Fibroblastos en el espacio perineural	+		19
Daño en SNC (en rata): - lesión en córtex entorrinal - ácido kaínico en capa CA del hipocampo	- Hipocampo ipsilateral	+	+	20
	- Neuronas piramidales en la lesión		+	21
Envejecimiento en condiciones normales	- Astrocitos reactivos en córtex cerebral	+	+	7,22, 23

**Tabla 1.-** Situaciones patológicas o de daño celular en las que se sobre-expresa el gen ApoD y/o se acumula la proteína en el SN. Referencias: **1.-** Díaz *et al.*, 2002(104); **2.-** Lieuallen *et al.*, 2001 (105); **3.-** Suresh *et al.*, 1998(106); **4.-** Ong *et al.*, 2002(107) ; **5.-** Yoshida *et al.*, 1996 (108) ; **6.-** Terrisse + *et al.*, 1998(109); **7.-** Kalman *et al.*.,2000(110) ; **8.-** Belloir *et al.*., 2001(111) ; **9.-** Glockner y Ohm , 2003(112) ; **10 .- Navarro et al ., 2003(113) ; 11 .- Thomas et al., 2003 (114)12 .- Mahadik et al., 2002 (115); 13.- Reindl et al., 2001(116); 14.- Hunter et al., 2002(117); 15.- Dandoy-Dron et al.,2000 (118) ; 16.- Labrada et al., 2002(119) ; 17.- Thomas et al., 2001(120) ; 18.- Boyles et al., 1990(121) ; 19.- Spreyer et al., 1990 (122); 20.- Terrisse et al., 1999 (123); 21.- Ong et al.,1997(124) ; 22.- Del Valle et al., 2003(125); 23.- Eddleston y Mucke,1993(126).**

Se conocen un buen número de patologías nerviosas en las que ApoD se encuentra elevada con respecto a los individuos sanos y normales (ver Tabla 1).

#### 2.9.4 Polimorfismos del gen de ApoD estudiados en esta tesis

Como ya se ha comentado anteriormente hemos determinado 4 polimorfismos del gen de la ApoD en los pacientes de nuestro estudio.

El polimorfismo rs1467282, c.334+718T>C, en el intrón 4 del gen se determinó como variación genética de la apoD en enfermedad de Alzheimer en población finlandesa (100). Se tienen los siguientes datos de frecuencias teóricas en población europea según la base de datos NCBI-Single Nucleotide Polymorphism (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>):

Genotipo/alelo	CC	CT	TT	C	T
frecuencia	0,860	0,116	0,023	0,919	0,081

**Tabla 2.** Datos de frecuencias teóricas de rs1467282 en población europea

El polimorfismo rs 5952 c.44T>C cuyo alelo incrementó el riesgo de enfermedad de Alzheimer esporádico en población china. El haplotipo rs 5952 T- rs 1568566 C mostró menor riesgo y podría interpretarse como un factor protector frente a la enfermedad de Alzheimer (127). No se tienen datos de frecuencia en población europea.

El polimorfismo rs1568565 c.124-352A>G, en el intrón 2. El alelo -352G se asoció con un incremento 3 veces mayor de riesgo de enfermedad de Alzheimer de instauración temprana (menor o igual a 65 años) en población finlandesa(100). Se tienen los siguientes datos de frecuencias teóricas en población europea según la base de datos NCBI-Single Nucleotide Polymorphism (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>):

Genotipo/alelo	CC	CT	TT	C	T
frecuencia	0,833	0,125	0,042	0,896	0,104

**Tabla 3.** Datos de frecuencias teóricas de rs1568565 en población europea

Dado que como veremos la ApoD podría conferir protección frente a los daños producidos en el organismo por el estrés oxidativo, cabría pensar que determinados polimorfismos de la ApoD podrían actuar en estas enfermedades protegiendo a los individuos portadores de mencionado daño. Es por eso que pensamos que determinadas

variaciones de este gen pueden conferir susceptibilidad ante los daños producidos por el estrés oxidativo.

### ***2.9.5 ApoD y estrés oxidativo***

Para finalizar este apartado debemos señalar que en estudios llevados a cabo en modelos animales (en concreto en la mosca *Drosophila melanogaster* y en el ratón), en los que se ha modificado genéticamente la expresión de ApoD, el déficit de ApoD conlleva defectos comportamentales y muerte neuronal por apoptosis. Así mismo, hay una menor resistencia del SN ante estímulos que inducen estrés oxidativo. Por otra parte la sobreexpresión de la lipocalina conduce a una mayor resistencia a factores que inducen un aumento del estrés oxidativo (128–130).

En resumen podemos afirmar que la ApoD es una proteína con múltiples funciones dependiendo de la localización en la que se exprese. El hecho de que sea además multiligando no nos permite reseñar una función específica para esta proteína, por lo que aún son necesarios múltiples estudios para desentrañar el papel funcional de ApoD en los diferentes niveles en los que actúa. Lo que sí podemos afirmar es que tiene un papel importante en las patologías del SNC y si aún no podemos afirmar que actúa como neuroprotector o como neurotóxico, si podemos reseñar que se comporta como una proteína de fase aguda, elevándose ante el daño neuronal.

También hemos podido comprobar en el laboratorio que el estrés oxidativo induce la expresión de ApoD en el sistema nervioso (128). Esto unido al hecho de que muchas de las patologías citadas anteriormente cursan con un aumento del estrés oxidativo, nos hizo pensar que esta lipocalina juega un papel relevante en el control de dicho estrés cuando aparece en condiciones patológicas.

Las evidencias obtenidas en modelos animales apoyan esta hipótesis. Se trata concretamente de experimentos llevados a cabo en la mosca *Drosophila* y en ratones. En la mosca la proteína Glial Lazarillo (GLaz) es la homóloga de ApoD. En moscas mutantes para GLaz que inactivan su expresión se encuentra una mayor muerte y degeneración neuronal ante un estímulo que induzca estrés oxidativo. Por el contrario

en moscas con exceso de ApoD podemos ver como hay una mayor resistencia al estrés oxidativo (130). En experimentos llevados a cabo en ratones Knock-out de ApoD (en los que el gen está inactivado) hemos comprobado que estos poseen igualmente una menor resistencia al estrés oxidativo así como alteraciones comportamentales (128).

## ***CAPÍTULO 3.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***

### **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Para plantear la hipótesis general de esta tesis partimos de la idea básica, ya demostrada por otros autores, que sostiene que una dieta deficiente en sustancias antioxidantes, un estilo de vida sedentario o que implique un aumento de la producción de ROS o bien una susceptibilidad genética hacia los daños producidos por los ROS son capaces de desencadenar por sí solos o acompañados de otros factores ambientales mutaciones en las células intestinales que desemboquen en la aparición de adenocarcinoma de colon.

Nuestra hipótesis sería que las sustancias antioxidantes y los marcadores de oxidación propuestos varían en las diferentes fases de la enfermedad desde su estado de pólipo hasta el estadio IV, pudiendo ser utilizados como elementos diagnósticos o pronósticos tempranos de esta enfermedad. También trataremos de demostrar que un estilo de vida sedentario, un IMC aumentado y una dieta deficiente en sustancias antioxidantes conducen a un estado oxidativo aumentado que conlleva susceptibilidad a padecer estadios más avanzados de cáncer.

Para poder afirmar esto último trataremos de demostrar que dichos marcadores de oxidación y antioxidación influyen en la supervivencia de los pacientes con esta enfermedad.

A continuación se detallan los objetivos que nos proponemos conseguir en este trabajo.

I – Estudiar los niveles de estrés oxidativo en suero en cada fase del proceso tumoral y su relación con la evolución del CRC y con otros parámetros que se han demostrado que influyen en la aparición y el pronóstico del CRC.

- Determinar en qué momento comienza el desequilibrio entre anti-oxidación y oxidación, dando lugar a un estado pro-oxidante que facilita mutaciones en las células intestinales dando origen a células cancerosas.

- Determinar que sustancias antioxidantes y prooxidantes definen mejor este estado.

- Estudiar la relación de los parámetros medidos entre sí con el fin de esclarecer las relaciones entre ellos, especialmente entre grasas, estrés oxidativo y tratamientos y enfermedades intercurrentes.

- Valorar MPO en suero como marcador de estrés oxidativo en CRC, ya que se trata del primer estudio en el que se determina MPO en suero en pacientes con CRC.

II – Determinar los valores de Estrés Oxidativo en tejido y su relación con la evolución de CRC y con los parámetros de estrés oxidativo en tejido.

- Estudiar la peroxidación lipídica en tejido tumoral y normal para intentar esclarecer la controversia existente acerca de si es mayor en el tejido tumoral o en el tejido normal.
- Estudiar la nitrosilación de proteínas en tejido tumoral y en tejido normal ya que se trata del primer estudio en que se determina este parámetro en tejido en pacientes con CRC.

III – Estudiar cómo afecta la alimentación y el estilo de vida en la evolución del CRC y su relación con el estrés oxidativo.

IV – Analizar los polimorfismos del gen de la ApoD en los sujetos de nuestro estudio con el fin de estudiar la mayor susceptibilidad al estrés oxidativo dependiendo de que porten uno u otro genotipo de ApoD.

V- Analizar cómo influyen el estrés oxidativo y el resto de parámetros estudiados en la supervivencia.



## ***CAPÍTULO 4. MATERIAL Y MÉTODOS***

## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

Para nuestro estudio hemos realizado la medición de diferentes parámetros en pacientes remitidos desde los servicios de Cirugía General y de Digestivo. A estos pacientes se les realizó una Historia Clínica, se les planteó un cuestionario de frecuencias alimentarias (Anexo I) y se les realizó una extracción sanguínea. Así mismo tuvieron que expresar su consentimiento para la realización de todos los análisis de forma explícita dejando constancia escrita.

### **4.1 SUJETOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO**

#### **4.1.2 Pacientes afectados de pólipos intestinales**

Consistió en un total de 56 pacientes, 34 varones y 22 mujeres. La inclusión de estos pacientes se realizó mediante la intervención del servicio de Digestivo quienes semanalmente nos proporcionaban una lista con los sujetos diagnosticados de pólipos esa semana. A estos sujetos se les realizaba una llamada telefónica en la que se les pedía su consentimiento para el estudio.

A los pacientes que accedieron someterse al estudio se les realizó un Historia Clínica cuyas características se detallarán más adelante, un cuestionario de frecuencias alimentarias y se les realizó una extracción sanguínea consistente en 10mL en tubo de gel sin anticoagulante para medidas en suero y 20mL en tubo con EDTA para las medidas en plasma.

En un momento posterior se consultó con el servicio de Anatomía Patológica para especificar el tipo histológico del pólipo. También se siguió su evolución mediante posteriores colonoscopias.

#### 4.1.3 Pacientes afectados de CRC

Consistió en un total de 137 pacientes, 86 varones y 51 mujeres. La inclusión de estos pacientes se realizó mediante el servicio de Cirugía General quienes nos remitían los pacientes en un momento anterior a la cirugía.

A los pacientes que accedieron someterse al estudio se les realizó un Historia Clínica cuyas características se detallarán más adelante, un cuestionario de frecuencias alimentarias y se les realizó una extracción sanguínea consistente en 10mL en tubo de gel sin anticoagulante para medidas en suero y 20mL en tubo con EDTA para las medidas en plasma.

En un momento posterior se consultó con el servicio de Anatomía Patológica para especificar el tipo histológico del tumor, la diferenciación y el estadio del mismo según la clasificación de Agrupación por estadios del Comité Estadounidense Conjunto del Cáncer (AJCC). También se siguió su evolución.

#### 4.1.4 Sujetos Control

Se recogió un grupo de 14 controles, 3 varones y 11 mujeres en un rango de edad similar al de los grupos a estudio. Estos pacientes consistieron en personas voluntarias cercanas al Laboratorio del Hospital. Se les realizaron las mismas pruebas que al resto de sujetos, a excepción del cuestionario de frecuencias alimentarias.

Además de este grupo control indicado se establecieron 94 controles adicionales para los estudios de polimorfismos de ApoD. Esto es debido que se disponía de ADN ya recogido y almacenado en una colección de ADN constituido por individuos sanos.

#### 4.1.5 Agrupación de pacientes

Una vez obtenidos los resultados de Anatomía Patológica se volvieron a seleccionar los individuos desestimando aquellos que presentaban pólipos hiperplásicos

o lipomas al no tener que ver con el desarrollo del adenocarcinoma (131). También se desestimaron los individuos en los que no se encontró tumor en la operación quirúrgica debido a ciclos previos de quimioterapia o radioterapia ya que no se pudo estadiar el tumor. Dependiendo de estos resultados se organizó a los sujetos participantes en el estudio en función de tres parámetros diferentes:

1. Estadios: - Sujetos control (n=14)
  - Sujetos con pólipos intestinales sin displasia (n=28)
  - Sujetos con pólipos intestinales con displasia (n=11)
  - Sujetos con carcinoma in situ (n=14). Aquí se encuentran pacientes tanto del grupo de pólipos intestinales como del grupo de cáncer.
  - Sujetos en Estadío I (n=30)
  - Sujetos en Estadío II (n=34)
  - Sujetos en Estadío III (n=23)
  - Sujetos en Estadío IV (n=27)
  
2. Grupos de Estadíos: - Sujetos control (n=14)
  - Sujetos afectados con pólipos intestinales sin displasia y con displasia (n= 39)
  - Sujetos afectados de CRC, incluido carcinoma in situ (n= 128)
  
3. Diferenciación: - Sujetos control (n=14)
  - Sujetos con pólipos intestinales sin displasia (n=28)
  - Sujetos con pólipos intestinales con displasia (n=10)
  - Sujetos con tumor de grado G1 (n=99)
  - Sujetos con tumor de grado G2 (n=17)
  - Sujetos con tumor de grado G3 (n=8)

## **4.2 MATERIALES**

### **4.2.1 HISTORIA CLÍNICA**

La Historia clínica que se realizó a los grupos a estudio fue contrastada con los informes médicos de los propios pacientes, dando mayor validez a estos últimos.

Los datos recogidos en la misma fueron los siguientes: sexo, edad (años), peso (kg), talla (cm), , profesión, exposición al humo del tabaco, realización de ejercicio (sedentarismo, aislado ( caminar dos horas a la semana o menos), habitual (caminar de dos horas a la semana a dos horas diarias), intenso (caminar más de dos horas diarias o acudir a un gimnasio más de 3 horas a la semana)), antecedentes familiares de cáncer, estadio del tumor, tratamiento previo con radioterapia ó quimioterapia, evolución, enfermedades del sistema nervioso, enfermedades psiquiátricas, enfermedad coronaria, aterosclerosis, enfermedades renales, enfermedades reumatológicas, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, enfermedad asmática, diabetes mellitus, hipertensión arterial, neoplasias previas a la enfermedad actual, tratamientos con estrógenos, ácido acetilsalicílico y otros antiinflamatorios no esteroideos y tratamiento con estatinas.

A partir de estos datos recogidos se crearon las siguientes variables, además de las ya mencionadas:

- Índice de masa corporal
- Grado de obesidad según criterios de la OMS (normal, delgadez, sobrepeso, obesidad grado I, obesidad grado II y obesidad mórbida)
- Obesidad (sujetos con sobrepeso hasta obesidad mórbida)
- Sedentarismo (sujetos que no realizan ningún tipo de ejercicio)

La evolución de los pacientes se clasificó de la siguiente forma:

- Fallecimiento
- Poliposis o tumor del mismo grado o menor
- Poliposis o tumor de mayor grado (sin metástasis)

- Poliposis o tumor histológicamente diferente
- Recidiva con metástasis
- Sin cambios

A partir de la variable evolución se crearon otras dos variables para agrupar mejor a los pacientes

- Recidiva: todos aquellos pacientes que tuvieron algún tipo de recidiva.
- Muerte: Pacientes fallecidos.

#### ***4.2.2 CUESTIONARIO DE FRECUENCIA ALIMENTARIA (Anexo I)***

Se trata del cuestionario de frecuencia alimentaria normalizado de Martín Moreno que fue realizado por el investigador a los pacientes diagnosticados de pólipos mientras que fue rellenado por el mismo paciente en los casos de sujetos aquejados de adenocarcinoma. El motivo estriba en la dificultad de realizar el cuestionario a muchos de los pacientes ingresados que preferían realizarlo en otro momento y con un familiar.

El cuestionario se rellenó por medio de raciones de cada alimento al día, a la semana, al mes ó al año, estando las raciones definidas previamente en gramos. De esta manera a la conclusión del estudio se pudieron obtener los gramos al día ingeridos de cada alimento. Con esta información se pudieron extraer las cantidades de fruta (g/día), vegetales (g/día), alcohol (g/día), carne roja (g/día), carne roja más vísceras (g/día), vísceras (g/día), carne procesada (g/día), pescado (g/día), energía total (Kcal/día), energía procedente de las grasas (Kcal/día), energía procedente de alimentos no grasos (Kcal/día), grasa (g/día), ácidos grasos poliinsaturados (AGP) (g/día), proteínas, fibra (g/día), hierro (mg/día), vitamina C (mg/día), vitamina A (ug/día), beta carotenos (ug/día), vitamina D (ug/día), vitamina E (mg/día), alimentos ricos en luteína (g/día) y alimentos ricos en licopeno (g/día) que cada paciente ingería al día. Se utilizó para ello la Base de Datos Española de Composición de Alimentos dependiente del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.

Los alimentos que se tuvieron en cuenta en el estudio fueron los siguientes: vino blanco, tinto, rosado, vino dulce, cerveza, licores o anisetes, destilados (whisky, ginebra, coñac,...), bebidas carbonatadas bajas en calorías, bebidas carbonatadas con azúcar, zumo de naranja natural, zumos naturales de otras frutas, zumos de frutas envasados, horchata, café descafeinado, café, leche entera, leche desnatada, leche semidesnatada, leche condensada, nata o crema de leche, batidos de leche, yogur entero, yogur desnatado, petit-suisse, requesón o cuajada, queso en porciones o cremoso, queso semicurado o curado, queso fresco o blanco, natillas, flan, pudin, helado, pan blanco, pan integral, pan blanco de molde, pan integral de molde, cereales de desayuno, arroz blanco, pasta, pizza, maíz, lentejas, garbanzos, alubias (pintas, blancas o negras), guisantes, soja y derivados, acelgas, espinacas, col, coliflor, brócoli, endivias, lechuga, escarola, tomate crudo, zanahoria, calabaza, judías verdes, berenjenas, calabacines, pepinos, pimientos, cebolla, remolacha, nabos, espárragos, gazpacho andaluz, patatas fritas, patatas cocidas, asadas, setas, champiñones, naranja, mandarinas, kivi, plátano, manzana, pera, fresas o fresones, cerezas, picotas, melocotón, albaricoque, nectarina, piña, higos, brevas, sandía, melón, uvas, aceitunas, frutas en almíbar, frutas en su jugo, almendras, nueces, avellanas, cacahuetes, pistachos, pipas, fruta desecada, huevos, pollo o pavo con piel, pollo o pavo sin piel, carne de ternera magra, carne de ternera grasa, carne de cerdo magra, carne de cerdo grasa, carne de cordero, conejo o liebre, hígado, otras vísceras, jamón serrano o cocido, carnes procesadas (salchichón, chorizo, etc.), patés o foie-gras, hamburguesas, tocino, bacon, pescado blanco, pescado azul, pescados ahumados, pescados salados, ostras, almejas, mejillones, calamares y pulpo, crustáceos, langostinos, gambas, aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de maíz, aceite de soja, mezcla de los anteriores, margarina, mantequilla, manteca, croquetas, palitos de merluza, pescado empanado, buñuelos, san jacobos, sopas y cremas de sobre, empanadillas, otros, galletas maría, galletas chocolate, croissant, donnuts, magdalenas, pasteles, churros, porras, chocolate, bombones, chocolate en polvo, chokolatinas, bollos con chocolate, turrón, pastas, mazapán, mostaza, mayonesa, salsa de tomate, picante, sal, mermelada, azúcar, miel, especias, suplementos vitamínicos o minerales.

### **4.2.3 MEDIDA DE PARÁMETROS EN SUERO**

Las muestras de sangre obtenidas en tubo de gel sin anticoagulante se centrifugaron, se alicuotaron y se congelaron a -80°C para su posterior análisis.

Las mediciones en suero se realizaron en el autoanalizador Cobas C711 Hitachi de Roche Diagnostics<sup>R</sup> mediante los reactivos proporcionados por Roche Diagnostics<sup>R</sup>, a excepción del colesterol LDL (mg/dL) que se obtuvo de forma calculada mediante el la fórmula de Friedwald. El resto de los parámetros analizados fueron triglicéridos (método enzimático colorimétrico, mg/dL), colesterol total (método enzimático colorimétrico, mg/dL), colesterol HDL (método enzimático colorimétrico mg/dL), proteínas totales (método colorimétrico g/dL), y proteína C reactiva (PCR) (método inmunoturbidimérico, mg/L).

### **4.2.4 MEDIDA DE PARÁMETROS EN PLASMA**

Las muestras de sangre obtenidas en tubo con EDTA se centrifugaron, se alicuotaron con BHT (500mM en etanol 96%) en proporción 1:1000 y se congelaron a -80°C para su posterior análisis.

En plasma se realizó la determinación de los siguientes parámetros:

- Antígeno Carcinoembrionario (CEA) (ng/mL), CA19.9 (UI/mL), Mieloperoxidasa (MPO) (ng/mL) y estradiol (pg/mL). Estas determinaciones se realizaron en el autoanalizador Architect de Abbott<sup>R</sup> con los reactivos suministrados por Abbott<sup>R</sup> mediante método de inmunoensayo automatizado.
- LDL oxidadas mediante el kit de ELISA competitivo de Mercodia<sup>R</sup>.
- Beta carotenos (ug/L), retinol (vitamina A) (ug/mL), alfa tocoferol (vitamina E) (ug/mL) y licopeno (ug/L) mediante Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)
- Ácido oxálico mediante cinética enzimática (mg/L).
- Determinación de polimorfismos de ApoD (ver sección 4.2.5).



#### **4.2.5 DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS DE APO D**

Se han determinado 3 polimorfismos del gen de la ApoD a los que se han denominado ApoD1, ApoD2 y ApoD3.

- ApoD1: (RS1467282) +718C→T, NM\_001647.2:c.334+718T>C. Se utilizaron los primers 5'- ACTTCCTCTCCTCCCCgCT (FP) y 5'- CTTgAAAgCCCCTTCCCA (RP). Se utilizaron las sondas: 5'- FAM-TTCTCATCTCTgCCTCCTCC – BBQ (sonda para el alelo normal) y 5'- YAK-TTCTCACCTCTgCCTCCTC (sonda para el alelo mutado).
- ApoD2: (RS5952) 15T→C, NM\_001647.2:c.44T>C, NP\_001638.1:p.Phe15Ser. Se utilizaron los primers 5'- CAAAACAAACgggAggTTC (FP) y 5'- CAgCCCCAAgATggTgAT (RP). Se utilizaron las sondas: 5'- 640-CTgCCgCACCGAAgAgg-p (sonda para el alelo normal) y 5'- gCACTTCCCAAgATgAAATgCTTgTCCC-FL (sonda para el alelo mutado).
- ApoD3: (RS1568565) -352G→A, NM\_001647.2:c.124-352T>A. Se utilizaron los primers 5'- ggATgATgggAAATACCTTTCA (FP) y 5'- gAAAgCATgATACAgACCTTTCAA (RP). Se utilizaron las sondas: 5'- CAgATgCgTTCgTgg-FL (sonda para el alelo normal) y 5'- 640-gAgCTAggACTCCAgAgCgCACgg-P (sonda para el alelo mutado).

Para el tipaje de los polimorfismos se utilizó la técnica de sondas Hybprobe en un termociclador para q-PCR LightCycler 480 II (Roche, Mannheim, Germany), por análisis de las curvas de fusión de los híbridos formados entre los productos de PCR y los oligonucleóticos específicos marcados con fluorocromos. Los cebadores y las sondas fluorescentes se diseñaron con el programa LightCycler ProbeDesign 2.0 y fueron sintetizados por BioMol (Germany).

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 20 µl, y con una mezcla de PCR conteniendo de 50 a 100 ng de DNA genómico, 0,5 µM de cada

cebador, 0,1 µM de cada sonda, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, y 2 µl de DNA-Master Hybridation Probes (Roche). Las condiciones de PCR para rs5952 y rs1568566 fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 2 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 5 s, *annealing* a 62°C por 15s, and extensión a 72°C durante 20s. Tras la amplificación el análisis de las curvas de fusión se realizó por desnaturalización a 95°C por 30 s, renaturalización a 50°C por 45 s, y un incremento de la temperatura hasta los 90°C a una tasa de 0.1°C/s. Las condiciones de PCR para rs1467282 fueron las mismas que las anteriores salvo una temperatura de renaturalización (*annealing*) de 60 °C, mientras que rs1568565 requirió un *touchdown* entre 57°C y 62°C para el *annealing*.

#### 4.2.6 VARIABLES DE OXIDACIÓN

A partir de los datos obtenidos mediante la historia clínica, el cuestionario de frecuencia alimentaria y el suero y plasma de los pacientes se han calculado 3 variables que evalúan el estado oxidativo de los pacientes.

1. Oxidative Balance Score (OBS). No se evalúan los suplementos de selenio ya que ningún paciente había consumido, tal y como les sucede a otros autores (89). Se han asignado puntos a los pacientes de la siguiente manera:

- Consumo de: Ácidos Grasos Poliinsaturados (AGP) total y Hierro total. Se realizan terciles de estos parámetros y a los pacientes en el

1 <sup>er</sup> tercil (bajo) les asignamos	2 puntos
2 <sup>o</sup> tercil	1 punto
3 <sup>er</sup> tercil	0 puntos

- Consumo de Vitamina C total, carotenos totales, Vitamina E total, alimentos ricos en luteína, alimentos ricos en licopeno:

1 <sup>er</sup> tercil (bajo) le asignamos	0 puntos
2 <sup>o</sup>	1 punto
3 <sup>o</sup>	2 puntos

- Consumo de Alcohol: >11.5g/día – 0 puntos  
1.5 a 11.5 – 1 punto  
<1.5 – 2 puntos

- Fumador: Sí – 0 puntos  
No – 2 puntos

- Consumo habitual de AAS: Sí – 2 puntos  
No – 0 puntos

- Consumo habitual de otros AINE: Sí – 2 puntos  
No – 0 puntos

El problema de esta variable estriba en que utiliza datos provenientes de encuestas, en general poco fiables. Por eso la hemos modificado y hemos creado otras dos variables que utilizan biomarcadores en plasma, igual que hicieron Goodman et al (26). Las nuevas variables son dos, una que solo utiliza datos de plasma y otra que utiliza datos de plasma y datos del cuestionario que consideramos más fiables como son el tratamiento con AAS y otros AINEs y el consumo de tabaco.

## 2. OBS Modificada 1(OBSM1):

- MPO y LDL OX. A los pacientes en el  
1<sup>er</sup> tercil (bajo) asignarle 2 puntos  
2<sup>o</sup> 1 punto  
3<sup>o</sup> 0 puntos

- Vit A, E, licopeno,  $\beta$ -caroteno:  
1<sup>er</sup> tercil (bajo) asignarle 0 puntos  
2<sup>o</sup> 1 punto  
3<sup>o</sup> 2 puntos

## 3. OBSM2:

- MPO y LDL OX. A los pacientes en el  
1<sup>er</sup> tercil (bajo) asignarle 2 puntos  
2<sup>o</sup> 1 punto  
3<sup>o</sup> 0 puntos

- Vit A, E, licopeno,  $\beta$ -caroteno:  
1<sup>er</sup> tercil (bajo) asignarle 0 puntos  
2<sup>o</sup> 1 punto  
3<sup>o</sup> 2 puntos

- Fumador: Sí – 0 puntos  
No – 2 puntos

- AAS: Sí – 2 puntos  
No – 0 puntos

- AINE: Sí – 2 puntos  
No – 0 puntos

## 4.2.7 MEDIDA DE PARÁMETROS EN TEJIDO

### 4.2.7.1 Procedimiento de recogida y posterior homogeneización del tejido

#### *Soluciones*

0.1M de TRIS-HCL a pH de 7.4 y temperatura ambiente.

#### *Procedimiento*

Para recoger el tejido se siguió el procedimiento que a continuación vamos a comentar.



**Fig. 20.** Homoginizador OMNI<sup>R</sup>, utilizado para homogeneizar el tejido

Una vez resecadas las piezas se introducen en un recipiente que a su vez está contenido en hielo. Lo más rápido posible se envían al Servicio de Anatomía Patológica donde un patólogo selecciona la zona y corta una pequeña porción para el estudio. Estas muestras se van introduciendo en un contenedor con Nitrógeno líquido.

Para homogeneizar el tejido se siguieron los siguientes pasos:

- 1 - Añadir a la muestra previamente congelada TRIS-HCl al 10% (peso-volumen).
- 2 – Añadir BHT a 5mM.
- 3 – Homogeneizar con el homogeneizador OMNI con 3 pulsos de 10 segundos cada uno.
- 4 – Incubar a 37°C durante una hora en agitación.
- 5 – Centrifugar a 4°C, 10000g durante 15 minutos.
- 6 – Guardar el sobrenadante a -80°C. Se va a utilizar para la medida de proteínas nitrosiladas.
- 7 – Guardar el pellet (fracción lipídica soluble) a -80°C. Se va a utilizar para la medida de lípidos peroxidados.

#### 4.2.7.2 Medida de Lípidos peroxidados (TBARS)

##### *Soluciones*

0.5% de TBA y 0.5% de TBS.

BHT 500mM en acetonitrilo

Glicina-HCl 0.2M a pH 3.6

##### *Procedimiento*

Para valorar el grado de oxidación lipídica se ha seguido el siguiente procedimiento:

1 – Resuspender el pellet en PBS 1:1 (mg de tejido original:  $\mu$ L añadido). Añadir BHT a 5mM y mezclarlo mediante vórtex.

2 – Homoginizar la muestra mediante sonicación. De esta muestra se extraen 12 $\mu$ L (paso 4) para la medida de lípidos peroxidados y el resto se congela a -80°C para medir proteínas totales.

3 – Se realiza una curva patrón con MDA a diferentes concentraciones: 0, 1.5 $\mu$ M, 2.5 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M, 40 $\mu$ M, y 80 $\mu$ M. El MDA se diluye con TRIS-HCl a pH 8 para obtener esta curva patrón.

4 – En tubo se mezclan 12 $\mu$ L de extracto de tejido (o de MDA para la curva patrón), 390 $\mu$ L de buffer glicina-HCl y 250 $\mu$ L de TBA.

5 – Incubar a 90°C durante 15 minutos.

6 – Poner en hielo.

7 – Centrifugar a 10000g durante 5 minutos.

8 – Cargar la microplaca a razón de 3 pocillos por muestra y 200 $\mu$ L por pocillo.

9 - Realizar la lectura de la placa a 532nm de absorvancia.

La medida obtenida se relacionó con la medida de proteínas totales de cada muestra.

#### 4.2.7.3 Medida de Proteínas Totales

Se realizó la medida de proteína totales a partir del homogenizado obtenido del paso 2 del procedimiento anterior.

Una vez descongeladas las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 10000g y el sobrenadante se utilizó para determinar este parámetro.

Se utilizó el autoanálizador cobas 6000 Hitachi de Roche Diagnostics<sup>R</sup> con el reactivo para proteínas totales en Líquido Cefalorraquídeo de Roche Diagnostics<sup>R</sup>.

#### 4.2.7.4 Medida de Proteínas Nitrosiladas

La medida de esta determinación se realizó mediante el procedimiento de Western-Blot.

#### 4.2.7.5 Soluciones para Western-Blot

*Tampón de electroforesis (Running Buffer).*

MOPS de BIO-RAD<sup>R</sup> 20X.

Se enrasa hasta un volumen final de 1L para obtener 1X.

*Tampón de transferencia (Transfer Buffer)*

1X [25mM Tris, 0,1% SDS, 192mM Glycina, 20% Metanol]:

- 3g de Trizma base.
- 12,4g de Glycina.
- 200mL de metanol.
- 1g de SDS.

Se disuelven los componentes en agua destilada. Se ajusta el pH hasta un valor de 6,8 utilizando HCl. Se enrasa hasta un volumen final de 1L.

### *TBS 10X*

10X [0.5M Tris, 1.5M NaCl]:

- 60.56g de Tris.
- 87.59g de NaCl.

Se disuelven los componentes en agua destilada. Se ajusta el pH hasta un valor de 7.5 utilizando HCl puro. Se enrasa hasta un volumen final de 1L.

### *Solución de lavado (TBS-Tween)*

TBS + 0,1% Tween-20.

Para 1L:

- 100mL de TBS concentrado 10X.
- 1mL de Tween-20.

Se enrasa con dH<sub>2</sub>O hasta 1L.

### 4.2.7.6 Electroforesis de proteínas

Con el fin de estimar la cantidad de muestra que debemos cargar en cada pocillo a la hora de realizar el Western-Blot se realiza un gel en el que se carga una cantidad estimada de muestra. Se realiza electroforesis y se marcan las proteínas con Azul Coomassie, lo que nos permite ver el patrón de bandas.

### 4.2.7.7 Western-Blot

Se trata de un método que hemos utilizado para cuantificar proteínas nitrosiladas.

Los extractos de proteínas, después de procesarlos, se cargan en un gel de poliacrilamida que se somete a electroforesis para la separación de las distintas proteínas en función de su peso molecular. Posteriormente se transfieren las proteínas del gel a una membrana de PVDF.

Sobre la membrana se añade el anticuerpo específico para proteínas nitrosiladas (primario), seguido de un secundario que amplifica la señal al llevar conjugado el

enzima de la *peroxidasa del rábano* (HRP). Esta catalizará una reacción de quimioluminiscencia que emite luz. La luz emitida se recoge en una cámara digital y se observa la señal específica de la proteína. Dependiendo de la intensidad de la banda obtenida se estima la cantidad de proteína cargada en el gel. Para estimar la cantidad existente en el medio o extracto original, se realiza la inmunodetección de Actina en la misma membrana. Se cuantifica la banda de Actina y se calcula la cantidad relativa de proteínas nitrosiladas respecto a este control endógeno. Estos pasos se explican más detalladamente a continuación.

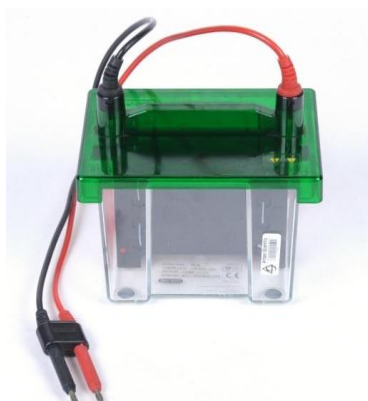
### *Preparación de las muestras*

Se preparan las muestras para cargar de tal forma que cada muestra a cargar debe de estar compuesta por:

- 1 parte de Sample Buffer (SB) (X4).
- 1 parte de Agente Reductor (RA) de 20 partes de volumen total
- Muestra con cantidad a determinar
- Rellenar con agua hasta 8 $\mu$ L.

Para realizar la electroforesis de proteínas se utilizaron los geles comerciales Criterion XT de BIO-RAD<sup>R</sup>.

### *Electroforesis*



**Fig. 21.** Cubeta utilizada para la electroforesis de proteínas. Bio-Rad<sup>R</sup>

1. Se hierven las muestras durante cinco minutos, al final de los cuales se introducen en hielo otros 5 minutos con el fin de desnaturalizar las proteínas. En las muestras siempre se incluyen una mezcla de proteínas conocidas que sirven como estándares para calcular el peso molecular.
2. Se coloca el gel en el soporte de electroforesis y se rellena con tampón de electroforesis



*(Running Buffer).*

3. Se carga de muestra cada pocillo.
4. Colocamos los electrodos y realizamos la electroforesis a 200V con amperaje constante hasta que las proteínas lleguen al final del gel.

### *Transferencia*



**Fig. 22.** Sistema de transferencia semihúmedo. Bio-Rad<sup>R</sup>

1. Una vez cortadas las membranas de PVDF se le da un baño de metanol e inmediatamente se dejan en H<sub>2</sub>O durante 5 minutos.
2. Se extrae el gel de la cubeta de electroforesis y se deja equilibrar durante 15 minutos en tampón de transferencia (*Transfer Buffer*).
3. En una cubeta se colocan unas esponjas y papel de filtro para que se bañen en el tampón de transferencia.
4. Procedemos ahora a montar la estructura para la transferencia en el siguiente orden de abajo hacia arriba: esponja, papel de filtro, gel, membrana, papel de filtro y esponja. Todo con cuidado de eliminar las burbujas existentes entre las distintas capas y sobretodo entre el gel y la membrana, ayudándonos de un rodillo.
5. Introducimos la estructura en la cubeta de transferencia con cuidado de que el gel esté hacia el polo negativo y que la membrana esté orientada en sentido positivo, ya que las proteínas están cargadas negativamente.
6. Se utiliza transferencia semihúmeda.
7. Las condiciones de transferencia son 25V constante.
8. Se deja transfiriendo 30 minutos.
9. Al finalizar se separan la membrana del gel y se coloca en *Solución de lavado*.
10. El gel se tiñe con azul Coomassie hasta que se vean las bandas, momento en que se cambia a una solución desteñidora.

### *Bloqueo*

1. Para evitar que los anticuerpos se adhieran a la membrana de PVDF de forma inespecífica, se baña en solución de bloqueo que consiste en PBS con 0,1% de Tween-20 y 5% de leche en polvo, durante al menos 2 horas.

### *Incubación con Anticuerpos*

#### - Incubación en primario:

1. Se utiliza un anticuerpo anti-NO-L-Cys generado en rata.
2. Se diluye 1:1000 en solución de bloqueo y se vierte en la membrana.
3. Se deja incubando toda la noche a 4°C en un agitador.
4. Se efectúan 3 lavados con PBS-Tween de 10 minutos cada lavado.

#### - Incubación en secundario:

1. Se utiliza un anticuerpo anti-IgG generado en conejo que lleva conjugado peroxidasa de rábano (HRP).
2. Se diluye 1:1000 en solución de bloqueo y se vierte en la membrana.
3. Se deja incubando 2 horas a temperatura ambiente en agitador.
4. Se efectúan 3 lavados con PBS-Tween de 10 minutos cada lavado.

### *Revelado de la señal*

Para el revelado se sigue el método *Inmun-Star<sup>TM</sup> HRP Chemiluminiscent Kit*, de *Bio-Rad*, resumido en los siguientes pasos.

1. Se hace una dilución 1:1 de la solución luminol/enhancer y peróxido de hidrógeno.
2. Se cubre con parafina una superficie lisa de cristal sobre la que se vierte la solución preparada.

3. Se pone en contacto la superficie de la membrana con la solución. Todo ello en la oscuridad y durante 4 minutos. Al poner en contacto la membrana con la solución, el enzima HRP conjugada al anticuerpo secundario cataliza la reacción de oxidación del luminol en presencia de  $H_2O_2$  y de un potenciador (“*enhancer*”), emitiéndose luz en el lugar donde se encuentra la proteína.
4. Se introduce la membrana entre dos láminas de acetato.
5. Se expone la membrana en un sistema con cámara digital (VersaDoc de Bio-Rad<sup>R</sup>), para obtener una imagen digital de la misma.

### **4.3 DISTRIBUCIÓN DE PACIENTES POR VARIABLE ESTUDIADA**

Como ya se ha comentado anteriormente se ha organizado a los pacientes de tres formas diferentes en función de variables anatomopatológicas y clínicas (estadío, grupo de estadío y diferenciación). Se han realizado grupos de pacientes en cada una de estas tres variedades. No tenemos todos los datos del estudio para todos los pacientes debido a la escasez en la cantidad de la muestra o debido a la negativa de los pacientes para rellenar el cuestionario de frecuencias alimentarias o la historia clínica.

Las siguientes tablas muestran los pacientes incluidos en cada grupo y los pacientes a los que se les ha realizado cada variable:

#### **4.3.1 PACIENTES ORGANIZADOS SEGÚN ESTADÍO**

<b>VARIABLE</b>	<b>n</b>	<b>n (control/sin displasia/displasia leve/carcinoma in situ/estadío I/estadío II/estadío III/ estadío IV)</b>
<b>EDAD</b>	181	14/28/11/14/30/34/23/27
<b>SEXO (VARONES)</b>	181	14/28/11/14/30/34/23/27
<b>EVOLUCIÓN</b> <i>Fallecimiento</i>		
<i>Pólipos con diferenciación del mismo grado ó menor</i>		
<i>P. de mayor grado</i>	181	14/28/11/14/30/34/23/27
<i>P. histológicamente diferente</i>		
<i>Recidiva con metástasis</i>		
<i>Sin cambios</i>		
<b>RECIDIVA</b>	181	14/28/11/14/30/34/23/27
<b>MUERTE</b>	181	14/28/11/14/30/34/23/27
<b>ENF. SIST. NERVIOSO</b>	181	14/28/11/14/30/34/23/27
<b>ENF. PSIQUIÁTRICA</b>	181	14/28/11/14/30/34/23/27
<b>ENF. CORONARIA</b>	181	14/28/11/14/30/34/23/27
<b>ATEROSCLEROSIS SIN E. COR.</b>	181	14/28/11/14/30/34/23/27
<b>ENF. RENAL</b>	181	14/28/11/14/30/34/23/27
<b>ENF. REUMÁTICA</b>	181	14/28/11/14/30/34/23/27
<b>HIPERTRIGLICE. FAMILIAR</b>	181	14/28/11/14/30/34/23/27
<b>HIPERCOLESTE. FAMILIAR</b>	181	14/28/11/14/30/34/23/27

<i>VARIABLE</i>	<i>n</i>	<i>n (control/sin displasia/displasia leve/carcinoma in situ/estadio I/estadio II/estadio III/estadio IV)</i>
<b>ENF. ASMÁTICA</b>	181	14/28/11/14/30/34/23/27
<b>DIABETES MELLITUS</b>	181	14/28/11/14/30/34/23/27
<b>HIPERTENSIÓN ARTERIAL (HTA)</b>	181	14/28/11/14/30/34/23/27
<b>TRATAMIENTO (TTO) CON AINE</b>	181	14/28/11/14/30/34/23/27
<b>TTO CON AAS</b>	181	14/28/11/14/30/34/23/27
<b>TTO CON ESTATINAS</b>	181	14/28/11/14/30/34/23/27
<b>RT y/ó QT PREVIO A LA CGÍA.</b>	181	14/28/11/14/30/34/23/27
<b>NEOPLASIA PREVIA</b> ..... <b>EXTRACOLÓNICA</b> ..... <b>COLON</b> ..... <b>AUSENCIA DE NEOPLASIA PREVIA</b>	180	14/28/11/14/30/34/23/26
<b>PESO</b>	93	02/28/10/11/07/14/08/13
<b>TALLA</b>	92	02/27/10/11/07/13/08/14
<b>ÍNDICE DE MASA CORPORAL (IMC)</b>	91	02/27/10/11/07/13/08/13
<b>GRADO DE OBESIDAD</b> ..... <b>NORMAL</b> ..... <b>DELGADO</b> ..... <b>SOBREPESO</b> ..... <b>O. GRADO I</b> ..... <b>O. GRADO II</b> ..... <b>O. MÓRBIDA</b>	93	03/27/10/12/07/13/08/13
<b>OBESIDAD</b>	93	03/27/10/12/07/13/08/13
<b>EJERCICIO</b> ..... <b>AISLADO</b> ..... <b>HABITUAL</b> ..... <b>INTENSO</b> ..... <b>SEDENTARISMO</b>	100	00/27/11/11/11/15/08/17
<b>SEDENTARISMO</b>	103	02/28/11/11/11/15/08/17
<b>FUMADOR</b>	116	06/28/10/12/12/15/12/21
<b>ANTECEDENTES FAMILIARES (AF)</b> ..... <b>C. COLON</b> ..... <b>OTROS CC. DIGESTIVOS</b> ..... <b>OTROS TIPOS DE CÁNCER</b> ..... <b>SIN AA. FAMILIARES</b>	102	00/28/11/11/11/15/09/17
<b>OBSM2</b>	106	04/27/09/12/11/13/10/20
<b>OBSM1</b>	167	09/27/10/14/29/31/21/26
<b>OBS</b>	86	00/27/10/10/08/11/06/14
<b>ESTRADIOL</b>	181	14/28/11/14/30/34/23/27
<b>TRIGLICÉRIDOS</b>	181	14/28/11/14/30/34/23/27
<b>COLESTEROL TOTAL</b>	181	14/28/11/14/30/34/23/27
<b>LDL</b>	181	14/28/11/14/30/34/23/27
<b>HDL</b>	181	14/28/11/14/30/34/23/27
<b>PT</b>	181	14/28/11/14/30/34/23/27

<i>VARIABLE</i>	<i>n</i>	<i>n (control/sin displasia/displasia leve/carcinoma in situ/estadio I/estadio II/estadio III/ estadio IV)</i>
<b>PCR</b>	181	14/28/11/14/30/34/23/27
<b>CEA</b>	181	14/28/11/14/30/34/23/27
<b>CA 19,9</b>	181	14/28/11/14/30/34/23/27
<b>MPO</b>	179	14/27/10/14/30/34/23/27
<b>LDL OX</b>	173	13/28/11/14/29/31/21/26
<b><math>\beta</math>-CAROTENO</b>	172	09/27/10/14/29/34/23/26
<b>VITAMINA A</b>	172	09/27/10/14/29/34/23/26
<b>VITAMINA E</b>	172	09/27/10/14/29/34/23/26
<b>LICOPENO</b>	172	09/27/10/14/29/34/23/26
<b>TBARS TUMOR</b>	56	00/00/00/00/17/14/10/15
<b>TBARS NORMAL</b>	51	00/00/00/00/15/15/08/13
<b>TBARS COCIENTE (TUMOR/SANO)</b>	41	00/00/00/00/13/10/06/12
<b>PN TOTALES TUMOR</b>	37	00/00/00/00/06/12/08/11
<b>PN TOTALES SANO</b>	19	00/00/00/00/03/07/01/08
<b>PN COCIENTE</b>	12	00/00/00/00/03/04/00/05
<b>IHQ APOD NORMAL</b>	48	00/00/00/00/14/13/07/14
<b>IHQ APOD TUMOR</b>	48	00/00/00/00/14/13/07/14
<b>IHQ APOD COCIENTE</b>	48	00/00/00/00/14/13/07/14
<b>FRUTAS</b>	102	00/28/11/10/13/19/10/17
<b>VEGETALES</b>	108	00/28/11/10/13/19/10/17
<b>ALCOHOL</b>	108	00/28/11/10/13/19/10/17
<b>CARNE ROJA</b>	108	00/28/11/10/13/19/10/17
<b>VÍSCERAS</b>	108	00/28/11/10/13/19/10/17
<b>CARNE ROJA + VÍSCERAS</b>	108	00/28/11/10/13/19/10/17
<b>CARNE PROCESADA</b>	108	00/28/11/10/13/19/10/17
<b>PESCADO</b>	108	00/28/11/10/13/19/10/17
<b>ENERGÍA GRASAS</b>	108	00/28/11/10/13/19/10/17
<b>E. TOTAL</b>	108	00/28/11/10/13/19/10/17
<b>E. NO GRASAS</b>	108	00/28/11/10/13/19/10/17
<b>FIBRA TOTAL</b>	108	00/28/11/10/13/19/10/17
<b>GRASA TOTAL</b>	108	00/28/11/10/13/19/10/17
<b>AGP TOTAL</b>	108	00/28/11/10/13/19/10/17
<b>HIERRO TOTAL</b>	108	00/28/11/10/13/19/10/17
<b>VC TOTAL</b>	108	00/28/11/10/13/19/10/17
<b><math>\beta</math>-CAROTENOS TOTAL</b>	108	00/28/11/10/13/19/10/17
<b>VE TOTAL</b>	108	00/28/11/10/13/19/10/17
<b>VD TOTAL</b>	108	00/28/11/10/13/19/10/17
<b>LUTEÍNA</b>	108	00/28/11/10/13/19/10/17
<b>LICOPENO</b>	108	00/28/11/10/13/19/10/17
<b>VA TOTAL</b>	108	00/28/11/10/13/19/10/17

Tabla 5.- Pacientes organizados según estadio.

#### 4.3.2 PACIENTES ORGANIZADOS SEGÚN GRUPO DE ESTADÍO

<b>VARIABLE</b>	<b>n</b>	<b>n (control/pópipo/tumor)</b>
<b>EDAD</b>	181	14/39/128
<b>SEXO (VARONES)</b>	181	14/39/128
<b>EVOLUCIÓN FALLECIMIENTO</b>		
<i>P. DE MISMO GRADO O MENOR</i>		
<i>P. DE MAYOR GRADO</i>		
<i>P. DIFERENTE</i>	181	14/39/128
<i>RECIDIVA CON METÁSTASIS</i>		
<i>SIN CAMBIOS</i>		
<b>RECIDIVA</b>	181	14/39/128
<b>MUERTE</b>	181	14/39/128
<b>ENF. SIST. NERVIOSO</b>	181	14/39/128
<b>ENF. PSIQUIÁTRICA</b>	181	14/39/128
<b>ENF. CORONARIA</b>	181	14/39/128
<b>ATEROSCLEROSIS SIN E. COR.</b>	181	14/39/128
<b>ENF. RENAL</b>	181	14/39/128
<b>ENF. REUMÁTICA</b>	181	14/39/128
<b>HIPERTRIGLICE. FAMILIAR</b>	181	14/39/128
<b>HIPERCOLESTE. FAMILIAR</b>	181	14/39/128
<b>ENF. ASMÁTICA</b>	181	14/39/128
<b>DIABETES MELLIRUS</b>	181	14/39/128
<b>HTA</b>	181	14/39/128
<b>AINE</b>	181	14/39/128
<b>AAS</b>	181	14/39/128
<b>ESTATINAS</b>	181	14/39/128
<b>RT y/ó QT PREVIO A CGÍA.</b>	181	14/39/128
<b>NEO.</b>		
<b>PREVIA EXTRACOLÓNICA</b>		
<i>COLON</i>	180	14/39/127
<i>AUSENCIA</i>		
<b>PESO</b>	93	02/38/53
<b>TALLA</b>	92	02/37/53
<b>IMC</b>	91	02/37/52
<b>G. DE</b>		
<b>OBESIDAD NORMAL</b>		
<i>DELGADEZ</i>		
<i>SOBREPESO</i>	93	03/37/53
<i>O. GRADO I</i>		
<i>O. GRADO II</i>		
<i>O. MÓRBIDA</i>		
<b>OBESIDAD</b>	93	03/37/53

<i>VARIABLE</i>	<i>n</i>	<i>n (control/pópipito/tumor)</i>
<b>EJERCICIO AISLADO</b>	100	00/38/62
<b>HABITUAL</b>		
<b>INTENSO</b>		
<b>SEDENTARISMO</b>		
<b>SEDENTARISMO</b>	103	02/39/62
<b>FUMADOR</b>	116	06/38/72
<b>A. F. C. COLON</b>	102	00/39/63
<b>OTROS CC. DIGESTIVOS</b>		
<b>OTROS TIPOS DE CÁNCER</b>		
<b>SIN AA. FAMILIARES</b>		
<b>OBS 2</b>	106	04/36/66
<b>OBS</b>	167	09/37/121
<b>ESTRADIOL</b>	181	14/39/128
<b>TRIGLICÉRIDOS</b>	181	14/39/128
<b>COLESTEROL TOTAL</b>	181	14/39/128
<b>LDL</b>	181	14/39/128
<b>HDL</b>	181	14/39/128
<b>PT</b>	181	14/39/128
<b>PCR</b>	181	14/39/128
<b>CEA</b>	181	14/39/128
<b>CA 19,9</b>	181	14/39/128
<b>MPO</b>	179	14/37/128
<b>LDL OX</b>	173	13/39/121
<b>β-CAROTENO</b>	172	09/37/126
<b>VITAMINA A</b>	172	09/37/126
<b>VITAMINA E</b>	172	09/37/126
<b>LICOPENO</b>	172	09/37/126
<b>FRUTAS</b>	102	00/39/69
<b>VEGETALES</b>	108	00/39/69
<b>ALCOHOL</b>	108	00/39/69
<b>CARNE ROJA</b>	108	00/39/69
<b>VÍSCERAS</b>	108	00/39/69
<b>CARNE ROJA + VÍSCERAS</b>	108	00/39/69
<b>CARNE PROCESADA</b>	108	00/39/69
<b>PESCADO</b>	108	00/39/69
<b>E. GRASAS</b>	108	00/39/69
<b>E. TOTAL</b>	108	00/39/69
<b>E. NO GRASAS</b>	108	00/39/69
<b>FIBRA TOTAL</b>	108	00/39/69
<b>GRASA TOTAL</b>	108	00/39/69
<b>AGP TOTAL</b>	108	00/39/69
<b>H. TOTAL</b>	108	00/39/69
<b>VC TOTAL</b>	108	00/39/69



<i>VARIABLE</i>	<i>n</i>	<i>n (control/pópipito/tumor)</i>
<b><i>β-CAROTENOS TOTAL</i></b>	108	00/39/69
<b><i>VE TOTAL</i></b>	108	00/39/69
<b><i>VD TOTAL</i></b>	108	00/39/69
<b><i>LUTEÍNA</i></b>	108	00/39/69
<b><i>LICOPENO</i></b>	108	00/39/69
<b><i>VA TOTAL</i></b>	108	00/39/69

**Tabla 6.-** Pacientes organizados según grupo de estadio.

#### **4.3.3 PACIENTES ORGANIZADOS POR DIFERENCIACIÓN**

<i>VARIABLE</i>	<i>n</i>	<i>n (control/sin displasia/displasia leve/G1/G2/G3)</i>
<b><i>EDAD</i></b>	169	14/28/10/92/17/8
<b><i>SEXO (VARONES)</i></b>	169	14/28/10/92/17/8
<b><i>EVOLUCIÓN FALLECIMIENTO</i></b>		
<i>P. DE MISMO GRADO O MENOR</i>		
<i>P. DE MAYOR GRADO</i>		
<i>P. DIFERENTE</i>	176	14/28/10/99/17/8
<i>RECIDIVA CON METÁSTASIS</i>		
<i>SIN CAMBIOS</i>		
<b><i>RECIDIVA</i></b>	176	14/28/10/99/17/8/
<b><i>MUERTE</i></b>	176	14/28/10/99/17/8/
<b><i>ENF. SIST. NERVIOSO</i></b>	169	14/28/10/92/17/8
<b><i>ENF. PSIQUIÁTRICA</i></b>	169	14/28/10/92/17/8
<b><i>ENF. CORONARIA</i></b>	169	14/28/10/92/17/8
<b><i>ATEROSCLEROSIS SIN E. COR.</i></b>	169	14/28/10/92/17/8
<b><i>ENF. RENAL</i></b>	169	14/28/10/92/17/8
<b><i>ENF. REUMÁTICA</i></b>	169	14/28/10/92/17/8
<b><i>HIPERTRIGLICE. FAMILIAR</i></b>	169	14/28/10/92/17/8
<b><i>HIPERCOLESTE. FAMILIAR</i></b>	169	14/28/10/92/17/8
<b><i>ENF. ASMÁTICA</i></b>	169	14/28/10/92/17/8
<b><i>DIABETES MELLIRUS</i></b>	169	14/28/10/92/17/8
<b><i>HTA</i></b>	169	14/28/10/92/17/8
<b><i>AINE</i></b>	169	14/28/10/92/17/8
<b><i>AAS</i></b>	169	14/28/10/92/17/8
<b><i>ESTATINAS</i></b>	169	14/28/10/92/17/8
<b><i>RT y/ó QT PREVIO A CGÍA.</i></b>	169	14/28/10/92/17/8

<i>VARIABLE</i>	<i>n</i>	<i>n (control/sin displasia/displasia leve/G1/G2/G3)</i>
<b>NEO. PREVIA EXTRACOLÓNICA COLON AUSENCIA</b>	168	14/28/10/91/17/8
<b>PESO</b>	86	02/28/9/42/4/1
<b>TALLA</b>	85	02/27/9/42/4/1
<b>IMC</b>	84	02/27/9/41/4/1
<b>G. DE OBESIDAD NORMAL DELGADEZ SOBREPESO O. GRADO I O. GRADO II O. MÓRBIDA</b>	86	3/27/9/42/4/1
<b>OBESIDAD</b>	88	03/27/9/44/4/1
<b>EJERCICIO AISLADO HABITUAL INTENSO SEDENTARISMO</b>	92	00/27/10/47/6/2
<b>SEDENTARISMO</b>	98	02/28/10/50/06/02
<b>FUMADOR</b>	108	06/28/09/56/7/2
<b>A. F. C. COLON OTROS CC. DIGESTIVOS OTROS TIPOS DE CÁNCER SIN AA. FAMILIARES</b>	94	00/28/10/48/06/02
<b>OBS 2</b>	98	2/27/08/50/07/2
<b>OBS</b>	155	09/27/09/85/17/08
<b>ESTRADIOL</b>	169	14/28/10/92/17/8
<b>TRIGLICÉRIDOS</b>	169	14/28/10/92/17/8
<b>COLESTEROL TOTAL</b>	169	14/28/10/92/17/8
<b>LDL</b>	169	14/28/10/92/17/8
<b>HDL</b>	169	14/28/10/92/17/8
<b>PT</b>	169	14/28/10/92/17/8
<b>PCR</b>	169	14/28/10/92/17/8
<b>CEA</b>	169	14/28/10/92/17/8
<b>CA 19,9</b>	169	14/28/10/92/17/8
<b>MPO</b>	167	14/27/09/92/17/8
<b>LDL OX</b>	161	13/28/10/85/17/8
<b>β-CAROTENO</b>	160	09/27/09/90/17/8
<b>VITAMINA A</b>	160	09/27/09/90/17/8
<b>VITAMINA E</b>	160	09/27/09/90/17/8
<b>TBARS TUMOR</b>	59	00/00/00/43/11/05
<b>TBARS NORMAL</b>	56	00/00/00/41/10/05

<i>VARIABLE</i>	<i>n</i>	<i>n (control/sin displasia/displasia leve/G1/G2/G3)</i>
<b>TBARS COCIENTE (TUMOR/SANO)</b>	51	00/00/00/32/08/05
<b>PN TOTALES TUMOR</b>	35	00/00/00/25/08/02
<b>PN TOTALES SANO</b>	22	00/00/00/18/3/1
<b>PN COCIENTE</b>	12	00/00/00/10/01/01
<b>IHQ APOD NORMAL</b>	47	00/00/00/32/10/05
<b>IHQ APOD TUMOR</b>	47	00/00/00/32/10/05
<b>IHQ APOD COCIENTE</b>	47	00/00/00/32/10/05
<b>FRUTAS</b>	102	00/28/10/54/08/02
<b>VEGETALES</b>	102	00/28/10/54/08/02
<b>ALCOHOL</b>	102	00/28/10/54/08/02
<b>CARNE ROJA</b>	102	00/28/10/54/08/02
<b>VÍSCERAS</b>	102	00/28/10/54/08/02
<b>CARNE ROJA + VÍSCERAS</b>	102	00/28/10/54/08/02
<b>CARNE PROCESADA</b>	102	00/28/10/54/08/02
<b>PESCADO</b>	102	00/28/10/54/08/02
<b>E. GRASAS</b>	102	00/28/10/54/08/02
<b>E. TOTAL</b>	102	00/28/10/54/08/02
<b>E. NO GRASAS</b>	102	00/28/10/54/08/02
<b>FIBRA TOTAL</b>	102	00/28/10/54/08/02
<b>GRASA TOTAL</b>	102	00/28/10/54/08/02
<b>AGP TOTAL</b>	102	00/28/10/54/08/02
<b>H. TOTAL</b>	102	00/28/10/54/08/02
<b>VC TOTAL</b>	102	00/28/10/54/08/02
<b><math>\beta</math>-CAROTENOS TOTAL</b>	102	00/28/10/54/08/02
<b>VE TOTAL</b>	102	00/28/10/54/08/02
<b>VD TOTAL</b>	102	00/28/10/54/08/02
<b>LUTEÍNA</b>	102	00/28/10/54/08/02
<b>LICOPENO</b>	102	00/28/10/54/08/02
<b>VA TOTAL</b>	102	00/28/10/54/08/02

*Tabla 7.- Pacientes organizados según diferenciación.*

#### **4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico de los datos fue realizado en la Unidad de Investigación del HCU de Valladolid mediante el programa SPSS<sup>R</sup>.

Se utilizaron los siguientes estadísticos:

- La comparación de las variables cuantitativas se ha realizado mediante la prueba T de Student para muestras independientes o la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para dos grupos y el test de Welch o la prueba de Kruskal Wallis en el caso de que el número de grupos fuese mayor.
- Para estudios de asociación entre variables cualitativas se utilizaron pruebas de Chi-cuadrado de Pearson En el caso de que el número de celdas con valores esperados menores de 5 sea mayor de un 20%, se ha utilizado el test exacto de Fisher o el test Razón de verosimilitud para variables con más de dos categorías.
- En los estudios de correlaciones se ha utilizado correlación de Pearson y se han realizado estudios de regresión lineal.

Para los análisis multivariantes Se ha realizado un análisis de regresión logística multinomial para las variables estadio, grupos de estadio y diferenciación con el fin de estimar las variables más influyentes en estos grupos.

- Los análisis de supervivencia han sido realizados mediante pruebas de Kaplan-Meier, las tablas de mortalidad y el modelo de regresión de Cox.

## ***CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN***

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.1 ESTUDIO SOBRE LA EDAD, SEXO, ENFERMEDADES INTERCURRENTES, TRATAMIENTOS, ANTECEDENTES PERSONALES Y EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD DE LOS INDIVIDUOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO**

#### ***5.1.1 PACIENTES ORGANIZADOS SEGÚN ESTADÍO***

En la tabla 8 se muestran los resultados obtenidos del análisis de la edad, sexo, enfermedades intercurrentes, tratamientos, antecedentes personales y evolución de la enfermedad. Se han considerado grupos de pacientes en función del estadio de CRC en el que se encontraban. En el capítulo anterior ya se ha detallado el número de pacientes que constan en cada grupo.

El objetivo de la tabla es mostrar cómo están distribuidos los pacientes en los diferentes grupos, o mejor dicho, cómo están distribuidas las variables descriptivas que hemos comentado. De esta manera, podremos analizar de qué forman afectan estos parámetros propios de cada paciente (edad, sexo, antecedentes personales, enfermedades intercurrentes y tratamientos) a las variables que analizamos en los apartados siguientes del estudio. Aunque estos resultados se analizarán con más detalle en los capítulos siguientes, señalando cuál o cuáles de ellos pueden influir en la variable a estudiar, destacamos, en este apartado, sólo aquellos casos que hemos considerado de especial interés. Hay que tener en cuenta que se trata de variables descriptivas propias del presente estudio y que a la hora de compararlas con otros estudios no tienen por qué coincidir en la forma en la que se distribuyen en los diferentes grupos que hemos considerado.

También hemos incluido en este apartado el estudio de la evolución de la enfermedad. No obstante, se hará un comentario más amplio en los capítulos siguientes ya que, como se ha comentado anteriormente, el objetivo de este apartado es dar una visión general de la distribución de estos parámetros para considerarlos posteriormente.

	CON-TROL	SD	DL	Ca in situ	I	II	III	IV	p valor
EDAD	56,14 (4,450)	61,29 (2,063)	57,64 (3,326)	67,64 (2,882)	72,60 (2,064)	72,79 (2,076)	72,00 (1,555)	68,19 (2,585)	<0,001
SEXO (VARONES)	21,4% (3)	53,6% (15)	72,7% (8)	57,1% (8)	60% (18)	50% (17)	56,5% (13)	70,4% (19)	0,136
EVOLUCIÓN FALLECIMIENTO	0	0,00%	9,1% (1)	0,00%	10,0% (3)	8,8% (3)	21,7% (5)	29,6% (8)	0,001
PÓLIPOS DE MISMO GRADO O MENOR P. DE MAYOR GRADO	0	7,1% (2)	18,2% (2)	35,7% (5)	6,7% (2)	11,8% (4)	13% (3)	0,00%	
P. DIFERENTE	0	0% (0)	9,1% (1)	7,1% (1)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
RECIDIVA CON METÁSTASIS	0	14,3% (4)	0	7,1% (1)	0	0	0	0	
SIN CAMBIOS	100% (14)	78,6% (22)	63,6% (7)	50% (7)	80% (24)	76,5% (26)	65,2% (15)	70,4% (19)	
RECIDIVA	0%	21,4% (6)	27,3% (7)	50% (7)	10% (3)	14,7% (5)	13% (3)	0	
MUERTE	0	0	9,1% (1)	0	10% (3)	8,8% (3)	21,7% (5)	29,6% (8)	
ENF. SIST. NERVIOSO	0	0	0	0	3,3% (1)	8,8% (3)	4,3% (1)	3,7% (1)	0,446
ENF. PSIQUIÁTRICA	0	3,6% (1)	0	7,1% (1)	10% (3)	2,9% (1)	4,3% (1)	11,1% (3)	0,548
ENF. CORONARIA	0	0	9,1% (1)	7,1% (1)	20% (6)	0%	13% (3)	3,7% (1)	0,012
ATEROSCLEROSIS SIN E. COR.	0	3,6% (1)	0	14,3% (2)	10% (3)	0%	8,7% (2)	0	0,09
ENF. RENAL	0	7,1% (2)	9,1% (1)	0	3,3% (1)	11,8% (4)	8,7% (2)	3,7% (1)	0,508
ENF. REUMÁTICA	7,1% (1)	17,9% (5)	9,1% (1)	14,3% (2)	6,7% (2)	2,9% (1)	13% (3)	0	0,176
HIPERTRIGLICERIDEMIA	0	0	0	7,1% (1)	0	0%	0	0	0,637
HIPERCOLESTEROLEMIA	0	0	18,2% (2)	7,1% (1)	0	5,9% (2)	8,7% (2)	0	0,077
ENF. ASMÁTICA	0	7,1% (2)	0	7,1% (1)	0	5,9% (2)	4,3% (1)	7,4% (2)	0,513
DIABETES MELLITUS	0	0	18,2% (2)	14,3% (2)	26,7% (8)	26,5% (9)	21,7% (5)	7,4% (2)	0,003
HTA	14,3% (2)	0	0	28,6% (4)	56,7% (17)	47,1% (16)	47,8% (11)	33,3% (9)	<0,001
AINE	0	3,6% (1)	9,1% (1)	0	6,7% (2)	5,9% (2)	4,3% (1)	7,4% (2)	0,798
AAS	0	0	0	7,1% (1)	10% (3)	2,9% (1)	13% (3)	0	0,101
ESTATINAS	7,1% (1)	10,7% (3)	18,2% (2)	14,3% (2)	33,3% (10)	20,6% (7)	47,8% (11)	11,1% (3)	0,017
RT y/o QT PREVIO A CGÍA.	0	0	0	0	13,3% (4)	5,9% (2)	8,7% (2)	11,1% (3)	0,11
NEO. PREVIA EXTRACOLÓNICA	0	3,6% (1)	0	14,3% (2)	23,3% (7)	17,6% (6)	21,7% (5)	30,8% (8)	0,034
COLON	0	0	0	7,1% (1)	3,3% (1)	5,69% (2)	0	3,8% (1)	
AUSENCIA	100% (14)	96,4% (27)	100% (11)	78,6% (11)	73,3% (22)	76,5% (26)	78,3% (18)	65,4% (17)	

**Tabla 8.-** Resultados de edad, sexo, enfermedades intercurrentes, tratamientos, antecedentes personales y evolución de la enfermedad. Se muestran porcentajes con el número de pacientes (entre paréntesis), excepto en la edad que se muestran medias con su desviación estándar (entre paréntesis).

SD: Pacientes con pólipos sin displasia; DL: pacientes con pólipos con displasia leve; Ca in situ: pacientes con CRC in situ; I: pacientes con CRC en estadio I; II: pacientes con CRC en estadio II; III: pacientes con CRC en estadio III; IV: pacientes con CRC en estadio IV

p valor: Significación estadística mediante chi.cuadrado, excepto edad que se ha utilizado la técnica paramétrica para igualdad de medias de Welch. Positiva si  $p < 0.005$

Con respecto a la edad, podemos observar en nuestro estudio que es mayor en los estadios más avanzados de la enfermedad. Esto es debido, probablemente, a que los enfermos afectados de pólipos acuden a nuestro centro a realizarse colonoscopias a edades tempranas debido a que ha habido algún caso de cáncer en su familia, o bien a que han superado la edad de cincuenta años a partir de la cual se recomienda una colonoscopia de cribado.

En cuanto al sexo tenemos que comentar que en el grupo control solamente se han incluido a 21.4% de varones, mientras que la distribución en los otros grupos es diferente, de hecho en los grupos DL y estadio IV es prácticamente invertida. Esto es debido al proceso de selección de los controles. Para ello recurrimos al personal de nuestro laboratorio, en su mayoría mujeres, ya que se requerían sujetos sanos y el procesado de la muestra tenía que ser muy rápido debido a que se tratan de pruebas que estudian estrés oxidativo. Con esto queremos dar a entender que los controles tenían que ir al laboratorio para realizar la extracción en un momento determinado, de ahí la dificultad de que personas sanas, sin conciencia de enfermedad, accedieran a prestarse como control. No obstante, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con respecto al sexo ( $p>0.05$ ).

Tanto la DM como la HTA son más frecuentes en los enfermos con cáncer. Esto probablemente vaya en consonancia con la edad ya que estos enfermos tienen edades más avanzadas. Lo mismo podemos decir de los pacientes que consumen estatinas.

También podemos observar cómo es más frecuente encontrar neoplasias previas en los grupos de enfermos afectados de cáncer.

En nuestro estudio es más frecuente la recidiva en los enfermos afectados de pólipos. Tal vez sea porque tienen alguna predisposición genética no identificada o bien porque tienen estados elevados de oxidación que agreden continuamente a la mucosa favoreciendo la displasia y al cáncer. Este último caso también puede ser consecuencia del anterior ya que puede existir alguna alteración genética que condicione ese estado oxidativo elevado. La recidiva de la enfermedad es más frecuente en aquellos pacientes que presentan antecedentes familiares de cáncer ( $p=0.044$ ) como se comentará posteriormente. De hecho, es más frecuente en aquellos que han presentado neoplasias previas ( $p=0.005$ ) lo cual puede indicar una predisposición a padecer cáncer, o bien la facilidad de la enfermedad para recidivar, tal y como muestran otros estudios (132).

Se puede observar en la tabla 8 cómo la mortalidad es más elevada en aquellos pacientes con enfermedades intercurrentes, tales como, enfermedades del sistema nervioso ( $p=0.019$ ), enfermedad asmática ( $p=0.032$ ) o Diabetes Mellitus (DM) ( $p=0.028$ ). Este hecho podría estar modificando asociaciones con las variables que



estudiaremos más adelante. Así mismo es más frecuente la mortalidad en aquellos enfermos que han padecido alguna neoplasia previa ( $p=0.033$ ), lo que también podría estar modificando las asociaciones del estudio.

### 5.1.2 PACIENTES ORGANIZADOS SEGÚN GRUPO DE ESTADÍO

PARAMÉTRICAS	CONTROL	PÓLIPO	TUMOR	p valor
<b>EDAD</b>	56,14 (16,65)	60,26 (10,93)	71,07 (11,41)	<b>&lt;0,001</b>
<b>SEXO (VARONES)</b>	21,4% (3)	59% (23)	58,6% (75)	<b>0,026</b>
<b>EVOLUCIÓN FALLECIMIENTO</b>	0	2,6% (1)	14,8% (19)	
P. DE MISMO GRADO O MENOR	0	10,3% (4)	10,9% (14)	
P. DE MAYOR GRADO	0	2,6% (1)	0,8% (1)	
P. DIFERENTE	0	10,3% (4)	0,8% (1)	
RECIDIVA CON METÁSTASIS	0	0	1,6% (2)	
SIN CAMBIOS	100% (14)	74,4% (29)	71,1% (91)	
<b>RECIDIVA</b>	0	33,3% (13)	14,1% (18)	0,074
<b>MUERTE</b>	0	2,6% (1)	14,8% (19)	<b>0,002</b>
<b>ENF. SIST. NERVIOSO</b>	0	0	4,7% (6)	0,12
<b>ENF. PSIQUIÁTRICA</b>	0	2,6% (1)	7% (9)	0,233
<b>ENF. CORONARIA</b>	0	2,6% (1)	8,6% (11)	0,136
<b>ATEROSCLEROSIS SIN E. COR.</b>	0	2,6% (1)	5,5% (7)	0,377
<b>ENF. RENAL</b>	0	7,7% (3)	6,3% (8)	0,381
<b>ENF. REUMÁTICA</b>	7,1 % (1)	14,4% (6)	6,3% (8)	0,236
<b>HIPERTRIGLICE. FAMILIAR</b>	0	0	8% (1)	0,706
<b>HIPERCOLESTE. FAMILIAR</b>	0	5,1% (2)	3,9% (2)	0,533
<b>ENF. ASMÁTICA</b>	0	5,1% (2)	4,7% (6)	0,514
<b>DIABETES MELLITUS</b>	0	5,1% (2)	20,3% (26)	<b>0,018</b>
<b>HTA</b>	14,3% (2)	0	44,5% (57)	<b>&lt;0,001</b>
<b>AINE</b>	0	5,1% (2)	5,5% (7)	0,474
<b>AAS</b>	0	0	6,3% (8)	0,058
<b>ESTATINAS</b>	7,1% (1)	12,8% (5)	25,8% (33)	0,269
<b>RT y/o QT PREVIO A CGÍA.</b>	0	0	8,6% (11)	<b>0,019</b>
<b>NEO. PREVIA EXTRACOLÓNICA</b>	0	2,6% (1)	22% (28)	
COLON	0	0	3,9% (5)	
AUSENCIA	100% (14)	97,4% (38)	74,0% (94)	

**Tabla 9.-** Resultados de edad, sexo, enfermedades intercurrentes, tratamientos, antecedentes personales y evolución de la enfermedad. Se muestran porcentajes con el número de pacientes (entre paréntesis), excepto en la edad que se muestran medias con su desviación estándar (entre paréntesis). p valor: Significación estadística mediante chi.cuadrado, excepto edad que se ha utilizado la técnica paramétrica para igualdad de medias de Welch. Positiva si  $p < 0.005$

Con el fin de comprobar cómo varían los resultados en los grandes grupos estudiado (control, pacientes con pólipos y pacientes con cáncer) hemos organizado los resultados que se muestran en la tabla 9.

Queremos comentar que la variable sexo con esta distribución sí resulta estadísticamente significativa y atiende a la explicación que se dio en el apartado anterior.

Como podemos observar los resultados son muy semejantes a los anteriores. Se trata de realizar grupos más amplios de pacientes. De esta manera mostramos los datos descriptivos en una clasificación que vamos a utilizar más adelante para estudiar el resto de variables analizadas en el estudio.

Las principales diferencias con la tabla 8 se encuentran, como ya hemos comentado, en la variable sexo. En cuanto a la variable recidiva ya no es significativa, probablemente porque al unir a los grupos tumorales las recidivas en éstos se acerca al número de recidivas que existen en los pacientes con pólipos. Las diferencias entre los grupos en cuanto a la enfermedad coronaria también dejan de ser significativas, probablemente porque la mayoría de los enfermos se encuentran en el estadio I y al unir los grupos ya no observamos esa diferencia. Lo mismo podemos decir de las estatinas cuyos principales usuarios se encontraban en los estadios I, II y III.

Sin embargo, en la distribución de la variable RT/QT previa a la cirugía pasa a ser significativa por razones obvias ya que únicamente los enfermos de cáncer reciben este tratamiento.

### ***5.1.3 PACIENTES ORGANIZADOS SEGÚN DIFERENCIACIÓN***

Dado que las anteriores clasificaciones aunaban criterios clínicos e histológicos, decidimos realizar una clasificación en función de criterios meramente histológicos para estudiar si los cambios que se observaban pudieran ser debidos a factores dependientes intrínsecamente del tumor.

PARAMÉTRICAS	CONTROL	SD	DL	G1	G2	G3	p valor
EDAD	56,14 (16,65)	61,29 (10,91)	56,9 (11,33)	71,71(9,87)	73,18 (10,94)	67,5(13,72)	<0,001
SEXO (VARONES)	21,4% (3)	53,6% (15)	70% (7)	59,8% (55)	64,7% (11)	25% (2)	0,034
EVOLUCIÓN FALLECIMIENTO	0	0,00%	10% (1)	11,1% (11)	11,8% (2)	12,5% (1)	
P. DE MISMO GRADO O MENOR	0	7,1% (2)	20% (2)	11,1% (11)	11,8% (2)	12,5% (1)	
P. DE MAYOR GRADO	0	3,6% (1)	10% (1)	1% (1)	0,00%	0,00%	
P. DIFERENTE	0	14,3 (4)	0	1% (1)	0	0	
RECIDIVA CON METÁSTASIS	0	0	0	1% (1)	0	12,5% (1)	
SIN CAMBIOS	100% (14)	78,6% (22)	60% (6)	74,7% (74)	76,5% (13)	62,5% (5)	0,123
RECIDIVA	0%	0	0	1% (1)	0	12,5% (1)	0,456
MUERTE	0	0	10% (1)	11,1% (11)	11,8% (2)	12,5% (1)	0,124
ENF. SIST. NERVIOSO	0	0	0	4,3% (4)	11,8% (2)	0%	0,251
ENF. PSIQUIÁTRICA	0	3,6% (1)	0	6,5% (6)	11,8% (2)	0%	0,416
ENF. CORONARIA	0	0	0	8,7% (8)	11,8% (2)	0%	0,099
ATEROSCLEROSIS SIN E. COR.	0	3,6% (1)	0	5,4% (5)	5,9% (1)	0%	0,669
ENF. RENAL	0	7,1% (2)	10% (1)	6,5% (6)	11,8% (2)	0%	0,581
ENF. REUMÁTICA	7,1% (1)	17,9% (5)	10% (1)	8,7% (8)	0	0%	0,225
HIPERTRIGLICE. FAMILIAR	0	0	0	1,1% (1)	0	0%	0,943
HIPERCOLESTE. FAMILIAR	0	0	20% (2)	5,4% (5)	0	0%	0,093
ENF. ASMÁTICA	0	7,1% (2)	0	5,4% (5)	5,9% (1)	0%	0,614
DIABETES MELLITUS	0	0	10% (1)	22,8% (21)	17,6% (3)	12,5% (1)	0,003
HTA	14,3% (2)	0	0	40,2% (37)	58,8% (10)	62,5% (5)	<0,001
AINE	0	3,6% (1)	10% (1)	5,4% (5)	0	0%	0,506
AAS	0	0	0	8,7% (8)	0	0%	0,074
ESTATINAS	7,1% (1)	10,7% (3)	10% (1)	23,9% (22)	11,8% (2)	25% (2)	0,329
RT y/ó QT PREVIA A CGÍA.	0	0	0	3,3% (3)	5,9% (1)	37,5% (3)	0,018
EXTRACOLÓNIC							
NEO. PREVIA A	0	3,6% (1)	0	20,9% (19)	35,3% (6)	12,5% (1)	
COLON	0	0	0	5,5% (5)	0	0%	
AUSENCIA	100% (14)	96,4% (27)	100% (10)	73,6% (67)	64,7% (11)	87,5% (7)	0,005

**Tabla 10.-** Resultados de edad, sexo, enfermedades intercurrentes, tratamientos, antecedentes personales y evolución de la enfermedad. Se muestran porcentajes con el número de pacientes (entre paréntesis), excepto en la edad que se muestran medias con su desviación estándar (entre paréntesis).

SD: Pacientes con pólipos sin displasia; DL: pacientes con pólipos con displasia leve; Ca in situ: pacientes con CRC in situ; G1: pacientes con CRC con diferenciación histológica G1; G2: pacientes con CRC con diferenciación histológica G2; G3: pacientes con CRC con diferenciación histológica G3.

p valor: Significación estadística mediante chi.cuadrado, excepto edad que se ha utilizado la técnica paramétrica para igualdad de medias de Welch. Positiva si  $p < 0.005$

Como ya hemos comentado es una manera de distribuir a los pacientes que vamos a utilizar en los análisis posteriores y hemos mostrado aquí los datos descriptivos del estudio.

Cabe destacar que la variable muerte deja de ser estadísticamente significativa. Esto nos hace pensar que el fallecimiento de los pacientes atiende más a razones clínicas que a clasificaciones histológicas del tumor.

## 5.2 RESULTADOS EN SUERO

### 5.2.1 PACIENTES ORGANIZADOS SEGÚN ESTADÍO

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos de las variables medidas en suero o en plasma. Se han considerado grupos de pacientes en función del estadio de CRC en el que se encontraban. En el capítulo anterior ya se ha detallado el número de pacientes que constan en cada grupo.

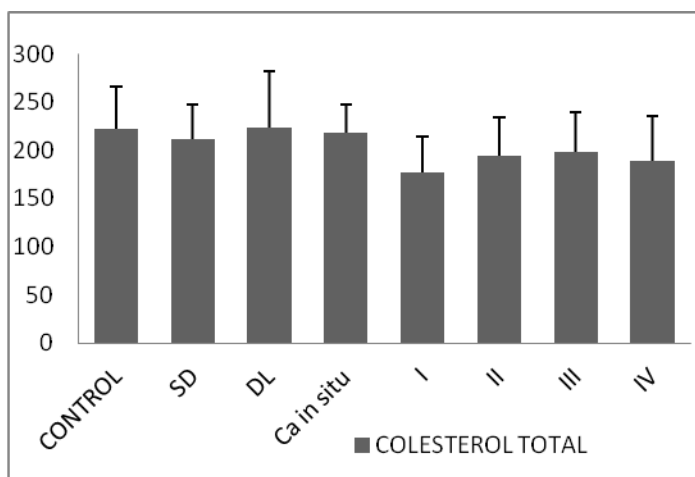
	CONTROL	SD	DL	Ca in situ	I	II	III	IV	p valor
<b>ESTRADIOL</b>	26,43 (29,87)	39,58 (68,71)	28,64 (22,64)	17,63 (8,13)	17,91 (7,12)	24,52 (30,66)	17,49 (7,85)	21,36 (9,07)	0,235
<b>TRIGLICÉRIDOS</b>	94,64 (37,97)	95,97 (50,45)	139,33 (48,74)	119,48 (73,20)	120,84 (44,25)	130 (46,55)	120,19 (49,53)	128,78 (46,72)	0,054
<b>COLESTEROL TOTAL</b>	222,38 (43,98)	211,15 (35,76)	223,57 (58,80)	217,78 (29,14)	176,53 (37,96)	194,89 (38,97)	198,78 (40,38)	189,01 (46,06)	<b>0,001</b>
<b>LDL</b>	126,55 (35,00)	135,39 (34,99)	146,16 (55,81)	140,90 (31,87)	114,49 (32,66)	126,72 (33,29)	127,75 (33,62)	126,32 (42,37)	0,213
<b>HDL</b>	66,17 (15,24)	56,56 (19,62)	49,54 (12,50)	52,99 (14,51)	43,03 (11,20)	41,28 (16,78)	46,98 (12,50)	37,67 (12,50)	<b>&lt;0,001</b>
<b>PT</b>	6,90 (0,21)	7,16 (0,35)	7,2 (0,31)	6,93 (0,59)	8,88 (12,58)	6,54 (0,59)	6,54 (0,85)	6,29 (0,84)	<b>&lt;0,001</b>
<b>PCR</b>	2,05 (2,33)	1,56 (1,28)	1,39 (0,55)	13,93 (26,53)	10,12 (17,93)	18,90 (26,07)	18,30 (23,06)	41,83 (62,01)	<b>&lt;0,001</b>
<b>CEA</b>	2,06 (1,097)	2,15 (1,57)	1,53 (0,89)	2,49 (2,39)	4,20 (4,78)	22,81 (84,80)	17,37 (32,85)	1203,81 (4639,91)	0,132
<b>CA 19,9</b>	9,93 (8,01)	6,89 (9,06)	(12,40)	10,97 (22,28)	12,29 (35,20)	17,30 (170,50)	43,17 (741,58)	193,02 (7213,13)	0,309
<b>MPO</b>	10,43 (4,31)	13,86 (9,19)	10,85 (4,21)	12,47 (3,96)	15,79 (6,89)	20,20 (18,97)	20,89 (23,86)	30,86 (50,90)	<b>0,006</b>
<b>LDL OX</b>	46,95 (30,01)	89,80 (40,95)	90,79 (39,50)	88,55 (34,09)	76,61 (26,48)	84,57 (18,67)	84,70 (19,43)	78,52 (23,53)	<b>0,012</b>
<b>β-CAROTENO</b>	511,67 (270,63)	523,19 (446,675)	256,70 (133,311)	308,43 (182,697)	208,10 (137,134)	205,71 (130,788)	211,04 (164,266)	181,73 (113,981)	<b>0,001</b>
<b>VITAMINA A</b>	0,423 (0,081)	0,48 (0,11)	0,56 (0,18)	0,36 (0,09)	0,43 (0,16)	0,35 (0,15)	0,38 (0,14)	0,24 (0,09)	<b>&lt;0,001</b>
<b>VITAMINA E</b>	14,26 (2,73)	13,50 (2,75)	15,60 (3,67)	12,24 (3,04)	13,34 (4,17)	13,71 (3,68)	13,82 (4,80)	11,99 (3,28)	0,208
<b>LICOPENO</b>	194,33 (66,17)	168,70 (84,99)	132,10 (65,30)	138,57 (106,62)	139,31 (111,71)	165,35 (131,50)	159,75 (140,41)	100,42 (71,20)	<b>0,028</b>

**Tabla 11.-** Resultados de variables medidas en suero. Se muestran medias con su desviación estándar (entre paréntesis).

SD: Pacientes con pólipos sin displasia; DL: pacientes con pólipos con displasia leve; Ca in situ: pacientes con CRC in situ; I: pacientes con CRC en estadio I; II: pacientes con CRC en estadio II; III: pacientes con CRC en estadio III; IV: pacientes con CRC en estadio IV

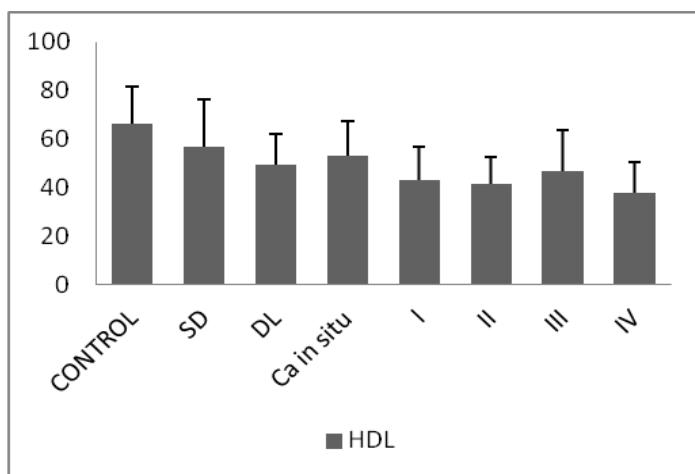
p valor: Significación estadística mediante técnicas paramétricas para igualdad de medias de Welch. Positiva si  $p < 0,005$

Como podemos comprobar, el CT es menor de forma estadísticamente significativa en los pacientes afectados de CRC que en aquellos diagnosticados de pólipos, de Ca in situ, o en el grupo control. Esta relación ya se ha descrito previamente por Gabay C. et al.(60). Como ya es conocido el colesterol disminuye ante cualquier estado inflamatorio o de estrés tal y como ocurre en el CRC (133). A este hecho podría unirse la circunstancia de que los enfermos incluidos en estos grupos pueden consumir estatinas con mayor frecuencia debido a enfermedades intercurrentes que son más



frecuentes en las edades predominantes en dichos grupos. Sin embargo, la prueba T no demostró relación entre el consumo de estatinas y los valores de CT ( $p=0.45$ ).

**Gráfico 1.** Niveles de CT

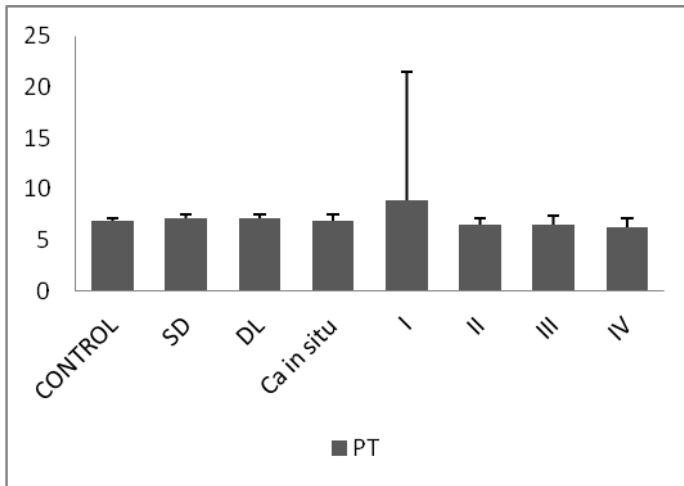


**Gráfico 2.** Niveles de HDL

En el caso del colesterol HDL también nos encontramos con una disminución estadísticamente significativa en los grupos anteriormente descritos. Este evento también ha sido descrito previamente por Hogan et al. (62). De hecho, es probable que la disminución de CT en esos grupos sea a

expensas de la disminución de la fracción de HDL, ya que dicha correlación ha resultado estadísticamente significativa ( $p<0.001$ ,  $R=0.337$ ). Este hecho nos puede hacer pensar en el HDL como un elemento protector de la enfermedad, o bien en un marcador de una dieta y un estilo de vida saludable que tiene como consecuencia la protección frente a esta enfermedad, tal y como describen otros autores (65–72). Apoyan esta idea la correlación positiva que muestra el HDL con  $\beta$ -caroteno ( $p<0.001$ ,  $R=0.313$ ), no mostrada en estudios anteriores y tampoco descrita con licopeno ( $p=0.002$ ,  $R=0.235$ ), ó al menos no de forma estadísticamente significativa; aunque en otros trabajos existen evidencias de la correlación con el cociente HDL/LDL(134); y una correlación negativa con un IMC alto ( $p<0.001$ ,  $R= -0.380$ ), mostrada por Alfadda et al.(135), con un número elevado de TG ( $p<0.001$ ,  $R= -0.507$ ) ya estudiado anteriormente por Albrink et al. (136) y una cifra alta de MPO ( $p=0.004$ ), no mostrada en otros estudios. Hay que decir que aunque estas correlaciones han podido ser

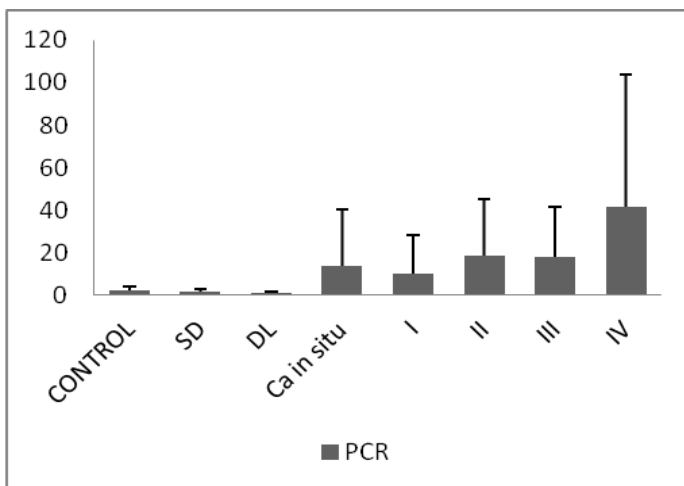
analizadas en otros trabajos en ninguno de ellos ha sido en relación con el CRC. Así mismo, los niveles bajos de HDL se encuentran asociados a los individuos sedentarios ( $p=0.025$ ), tal y como comenta otros autores (137,138), y a los obesos ( $p=0.002$ ), como describen Barter et al. (139). Por otra parte hay que destacar que los niveles bajos de HDL también se han asociado en nuestro estudio a los pacientes con aterosclerosis ( $p=0.033$ ) como ya han revisado Mackness B. et al. (140); con enfermedad renal (0.014) como han visto anteriormente Keane W.K. et al. (141); con asma ( $p=0.024$ ) descrito así mismo por Cakmak A. et al. (142); con DM ( $p=0.001$ ) revisado por Farbstein D. et al. (143) y con HTA ( $p=0.042$ ) revisado por Domingues J. et al. (144), por lo que podría ser que los individuos con estas enfermedades estuvieran con más frecuencia en los grupos que hemos mencionado (I, II, III y IV) y fuera ésta la causa de los niveles de HDL bajo en estos grupos. Efectivamente, esto puede ser así para la enfermedad coronaria ( $p=0.005$ ), DM ( $p=0.003$ ) y HTA ( $p<0.001$ ), por lo que harían falta posteriores estudios estratificados con una muestra mayor para concretar la afirmación anterior. También debemos comentar que existe una asociación positiva de los valores más bajos de HDL con el sexo femenino ( $p<0.001$ ), revisado por otros trabajos (145,146), así como una correlación positiva con los valores de estradiol (algo ya publicado por Masi C.M. et al. (147)). Parece que el sexo femenino podría estar influyendo en lo anteriormente comentado aunque no hay un predominio de mujeres en los grupos comentados ( $p=0.136$ ,  $R=0.220$ ). Así mismo la edad se correlaciona inversamente con los valores de HDL ( $p=0.019$ ,  $R= -0.175$ ), algo que parece constante en otros estudios (148), y en este caso los individuos de mayor edad se encuentran, ciertamente, en los grupos I, II, III y IV de forma estadísticamente significativa ( $p<0.001$ ) por lo que es probable que afecten a los valores de HDL. Por otra parte si estudiamos la asociación entre los niveles bajos de HDL y la variable muerte vemos que es positiva ( $p=0.002$ ), lo que podría apoyar nuestra idea aunque volvemos a tener el problema anterior ya que podría deberse esta mayor mortalidad a una mayor presencia de enfermedades intercurrentes.



**Gráfico 3.** Niveles de PT

Al hablar de las PT vemos que los valores son menores en los grupos de los estadios II, III y IV de forma estadísticamente significativa. El aumento en el grupo I está muy afectado por la desviación estándar por lo que no vamos a considerarlo. La disminución de estos valores probablemente sea

debida a la propia enfermedad tumoral en un contexto de reactivo de fase aguda. El hecho de que se correlacione con los valores de  $\beta$ -caroteno ( $p=0.013$ ,  $R=0.189$ ), vitamina A ( $p<0.001$ ,  $R=0.342$ ) y licopeno ( $p=0.040$ ,  $R=0.157$ ), relaciones no estudiadas previamente en el CRC, apoya la teoría descrita anteriormente que atribuye el descenso de estos parámetros a una reacción de fase aguda debida al proceso tumoral.

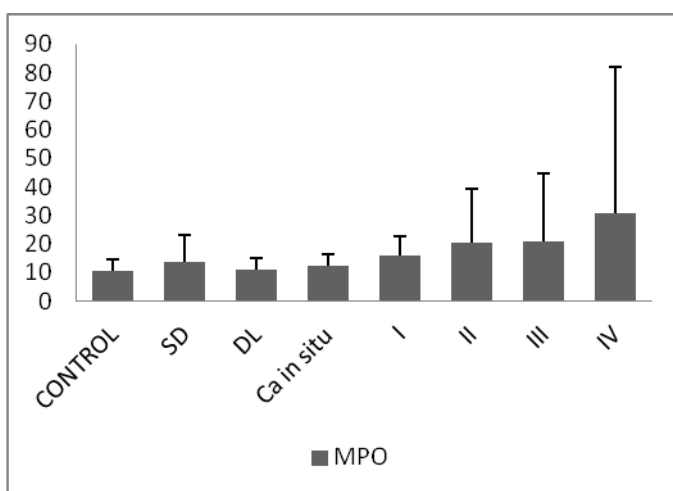


**Gráfico 4.** Niveles de PCR

En el caso de la PCR vemos cómo sus valores se incrementan a partir del grupo de Ca in situ. Este hecho se debe al propio proceso tumoral ya que se trata de un reactante de fase aguda. Esto corrobora lo que habíamos comentado anteriormente a cerca del colesterol, que su descenso se debía a un proceso de fase

aguda, ó inflamatorio, como ocurre en el CRC. Es interesante comentar que los valores de PCR se encuentran ya elevados desde el estadio de Ca in situ, reflejando un estado pro inflamatorio. Aunque se trata de una prueba inespecífica, unida a otras pruebas podría utilizarse como un marcador diagnóstico de la enfermedad. Ya se ha descrito en otros estudios que su aumento en pacientes con CRC se relaciona con un mal pronóstico

(54–58). Este parámetro se correlaciona con otros marcadores de enfermedad tumoral tales como el CEA ( $p=0.001$ ,  $R=0.239$ ), y CA 19.9 ( $p=0.008$ ,  $R=0.197$ ), e incluso algunos autores piensan que el aumento de PCR supone un factor de pronóstico independiente de estos marcadores para el CRC (149). Se puede comprobar que se correlaciona bien con los valores de MPO ( $p<0.001$ ,  $R=0.636$ ), coincidiendo con lo publicado por Masoodi I. et al. (150), mientras que otros autores no encuentran esta relación (151). Esto indica que la PCR, además de estar relacionada con los procesos de inflamación, podría estar implicada en los procesos de oxidación como hemos comentado en el capítulo anterior. Por otra parte, hay que comentar que se correlaciona de forma inversamente proporcional con  $\beta$ -caroteno ( $p=0.009$ ,  $R= -0.198$ ), vitamina A ( $p<0.001$ ,  $R= -0.394$ ) y licopeno ( $p=0.001$ ,  $R= -0.215$ ) como revelan otros autores (152,153) quienes aducen que las sustancias antioxidantes estudiadas protegen de los estados oxidativos e inflamatorios. Por nuestra parte, queremos añadir que también pudiera deberse a que la disminución de los valores de éstos dos últimos se comporte como reactivos de fase aguda como hemos comentado anteriormente. Los valores elevados de PCR se asocian de forma significativa con la mortalidad ( $p =0.027$ ), tal y como también indican otros autores (154,155).



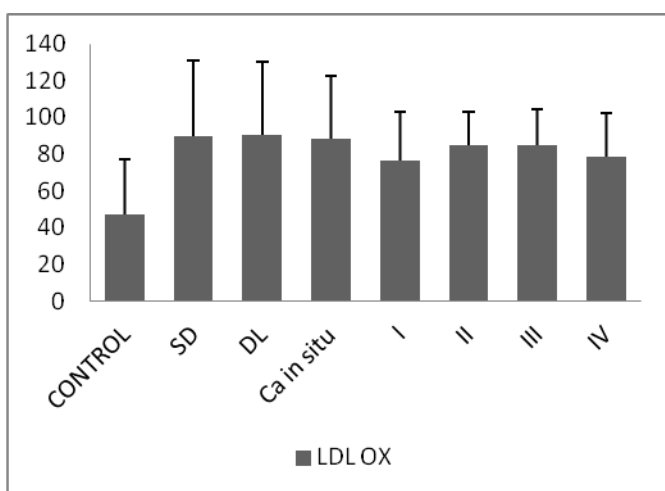
**Gráfico 5.** Niveles de MPO

Al estudiar los valores de MPO éstos van aumentando a partir del estadio de Ca in situ de forma estadísticamente significativa. Esto indica que en estos estadios los estados de oxidación se encuentran elevados con respecto al grupo control y que la oxidación es mayor cuanto mayor es el estadio. Ahora bien, tenemos que preguntarnos si

ésto es debido al proceso tumoral que incrementa el estado oxidativo o si el estado oxidativo, es el que predispone a un estadio mayor como consecuencia de un estado que favorece el daño del DNA y por tanto de las mutaciones que llevan a originar tumores más agresivos. Es importante destacar que este parámetro no se asocia en nuestro estudio a factores como la edad, el sexo o a otras enfermedades ( $p>0.05$ ) por lo que



podemos decir que este incremento observado es debido a la propia enfermedad estudiada. La MPO se correlaciona bien con los valores de CEA ( $p < 0.001$ ,  $R = 0.338$ ), CA19.9 ( $p < 0.001$ ,  $R = 0.292$ ) y PCR ( $p < 0.001$ ,  $R = 0.636$ ) por lo que se podría utilizar como un posible marcador de la enfermedad. Las dos primeras habían sido estudiadas previamente en otros trabajos y la correlación con PCR ya la hemos comentado en el apartado correspondiente. A su vez se correlaciona de forma inversamente proporcional con los valores de un antioxidante como es la vitamina A ( $p = 0.004$ ,  $R = -0.216$ ), algo que tampoco había sido estudiado previamente y que indica el papel como biomarcador de oxidación de la MPO. Tenemos que resaltar que este estudio es el primero que evalúa los valores de MPO en suero de pacientes con CRC. Los estudios previos se habían realizado en tejido tumoral y sano del mismo paciente obteniendo una elevación de MPO en el tejido tumoral (33–35). En el presente trabajo hemos podido comprobar que la MPO también se encuentra elevada en el suero de los pacientes con CRC siendo especialmente elevada en el estadio IV. Este hecho indica la relevancia de la MPO como marcador de oxidación en esta enfermedad.

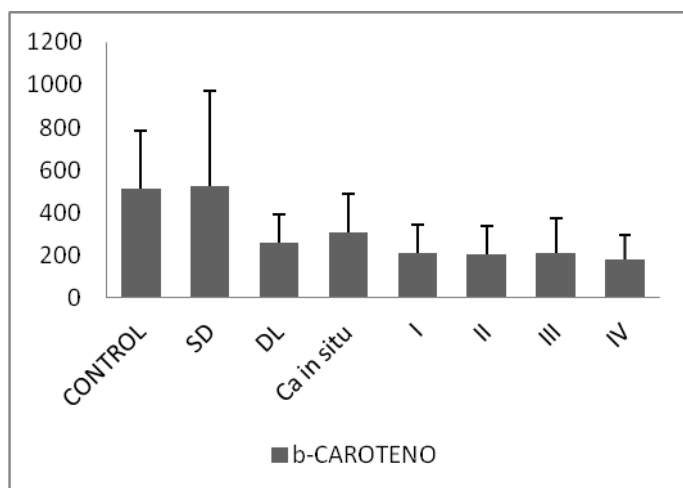


**Gráfico 6.** Niveles de LDLox

Con respecto a los valores de LDL ox comprobamos que se encuentran incrementados desde el grupo de pacientes con pólipos de forma estadísticamente significativa. Estos resultados no se habían estudiado previamente en otras publicaciones o al menos no se había estudiado dividiendo a los pacientes por estadios ni mucho menos se habían

realizado estudios previos respecto a pacientes con pólipos. Esto podría indicar que el estado oxidativo en la sangre de estos pacientes es mayor que en los del grupo control, por lo que podríamos utilizar LDL ox como un marcador de riesgo temprano. Tal vez un estado pro-oxidante sea el que confiere susceptibilidad para que estos pacientes desarrollen pólipos. Si este estado continúa o las defensas antioxidantes no funcionan, ya sea por una dieta y un estilo de vida inadecuado, o por la susceptibilidad genética, entonces podrían aparecer focos de displasia en el pólipo y más adelante desarrollarse

un CRC. Hay que destacar que este parámetro no se asocia a la edad ( $p=0.226$ ) ni al sexo ( $p=0.277$ ) ni a ninguna de las enfermedades intercurrentes estudiadas ( $p>0.05$ ) por lo que a priori apoya la hipótesis que hemos expuesto. Esta teoría viene avalada por un estudio previo que hemos comentado anteriormente y que señala la elevación de LDL como un factor de riesgo independiente para padecer CRC (27). En dicho estudio no se abordaba la posible relación de las LDL ox con otras enfermedades intercurrentes que pudieran modificar la asociación, pero ha sido estudiado en el presente trabajo. Tampoco se habían estudiado los niveles de LDL ox en pacientes con pólipos, como habíamos comentado anteriormente, los cuales se encuentran incrementados, algo que refuerza la teoría encontrada en estudios previos que señalan al estado oxidativo elevado como un factor de riesgo para padecer CRC. Al igual que en estudios previos (27), hemos encontrado una correlación positiva entre los valores de LDL ox y de vitamina E ( $p=0.003$ ,  $R=0.230$ ). Esta aparente contradicción consistente en la correlación de una sustancia antioxidante con un marcador de oxidación se debe a que las LDL unen vitamina E de forma fisiológica, por lo que las LDL oxidadas, aunque oxidadas, siguen teniendo en su interior vitamina E (27).

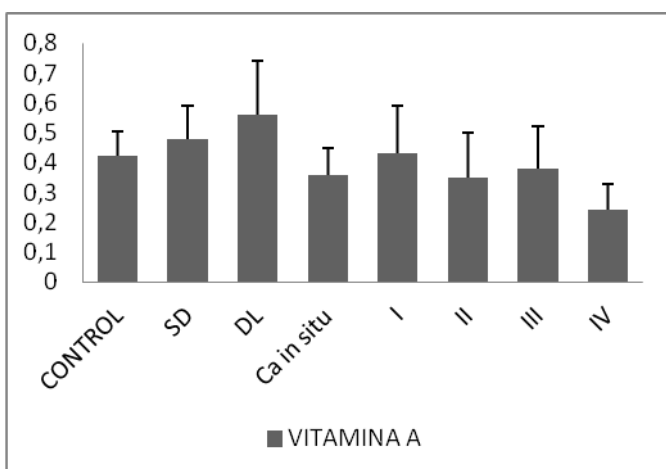


**Gráfico 7.** Niveles de b-caroteno

Al estudiar los niveles del antioxidante  $\beta$ -caroteno comprobamos que sufre un descenso brusco en los pacientes que presentan pólipos con displasia de forma estadísticamente significativa y que desciende aún más en los pacientes con CRC. Podemos pensar que un estilo de vida no saludable, pobre en estas

sustancias, es el factor favorecedor para que comience la displasia en el pólipo previamente formado. Esto vendría apoyado por estudios anteriores que, además de refutar nuestros resultados, señalan al  $\beta$ -caroteno como un factor protector para el CRC (27,46). No obstante, no hay estudios previos que comparen los niveles de este antioxidante desde el estadio de pólipo hasta el último estadio de la enfermedad. Al mismo tiempo podríamos desechar la idea de que este descenso se debiera a una

reacción de fase aguda ya que el hecho de producirse una displasia no modifica otros reactantes de fase aguda. Sin embargo, el descenso que ocurre en los enfermos con CRC podría ser imputado a este hecho, tal y como comentan otros autores (1,156). En nuestro estudio hemos encontrado que los niveles de  $\beta$ -carotenos se correlacionan de forma inversamente proporcional a la edad ( $p=0.009$ ,  $R= -0.199$ ). Teniendo en cuenta que existen diferencias significativas de edad en los grupos de control que hemos estudiado, se requerirían nuevos estudios para corroborar la hipótesis que hemos señalado. Hemos encontrado que existe una asociación de niveles altos de antioxidante con el sexo femenino ( $p<0.001$ ), tal y como también comentan Wakai K.et al. (157), la ausencia de DM ( $p=0.001$ ) y con la ausencia de HTA ( $p=0.002$ ), lo que refuta lo observado por otros autores (158–160) por lo que también la ausencia de enfermedades intercurrentes podría estar interviniendo en nuestra asociación. Hemos hallado una correlación directa entre los  $\beta$ -carotenos y el HDL ( $p<0.001$   $R=0.313$ ), lo que ya hemos comentado anteriormente, pero una correlación inversa con los TG ( $p=0.001$ ,  $R= -0.256$ ) algo que no se refleja en estudios anteriores de CRC, lo que puede indicar que los  $\beta$ -carotenos están elevados en aquellos sujetos que siguen un estilo de vida saludable. Hemos comprobado, también, correlación del HDL con otros antioxidantes como el licopeno ( $p<0.001$ ,  $R=0.304$ ), lo cual ya está referenciado en otros estudios y parece coherente ya que ambos antioxidantes comparten muchas de sus fuentes. Hay que destacar que hemos encontrado una asociación entre los niveles bajos de  $\beta$ -carotenos y los pacientes fallecidos en nuestro estudio ( $p<0.001$ ), lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos por Ito I.et al. (161).

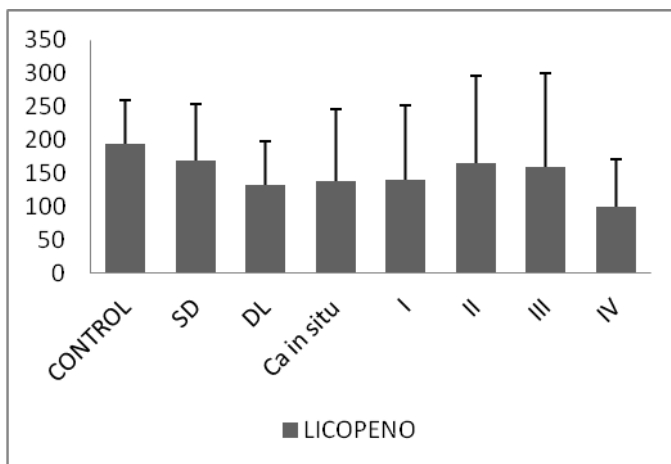


**Gráfico 8.** Niveles de vitamina A

Con respecto a la vitamina A encontramos que sus niveles descienden de forma estadísticamente significativa a partir del estadio de Ca in situ, encontrándose niveles más bajos en el estadio IV. Estos resultados coinciden con los estudios publicados anteriormente que señalan a la respuesta

inflamatoria sistémica como la responsable de este descenso, al verse disminudas la

proteína ligadora de retinol y la transtirretina (44). De hecho, nosotros también hemos encontrado una buena correlación inversa entre vitamina A y PCR ( $p < 0.001$ ,  $R = -0.394$ ), como hemos explicado anteriormente. La misma relación inversa ocurre con CEA ( $p = 0.029$ ,  $R = -0.166$ ) y CA 19.9 ( $p = 0.04$ ,  $R = -0.216$ ) al igual que en anteriores estudios para CEA (152) y no para CA19.9 de cuya correlación no hay estudios previos en CRC. También hemos visto que sus valores se correlacionan bien con otro antioxidante como la Vitamina E ( $p < 0.001$ ,  $R = 0.351$ ). Así mismo hemos comprobado valores más altos de vitamina A en aquellos individuos que realizan más ejercicio ( $p = 0.05$ ), aunque es posible que el incremento no sea debido al propio ejercicio si no a una dieta y a un modo de vida saludable, tal y como confirman Kitamura Y. et al. (162). Al igual que en estudios anteriores (1) hemos comprobado que existe una asociación de los niveles bajos de vitamina A con los fallecidos en el estudio ( $p = 0.017$ ), lo que señala que los individuos con niveles bajos de vitamina A tienen mayor posibilidad de muerte.

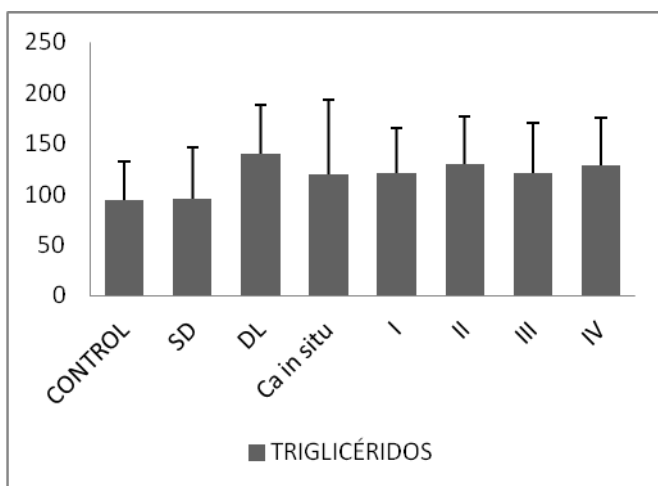


**Gráfico 9.** Niveles de licopeno

En relación con los niveles de licopeno en el gráfico podemos observar cómo están más elevados en el grupo control y especialmente bajos en el grupo de estadio IV. Es posible que la disminución en este grupo sea debido a una respuesta inflamatoria sistémica al igual que sucedía con la vitamina A

como lo revelan McMillan DC. et al. (156). Esto vendría apoyado por la correlación inversamente proporcional hallada en nuestro estudio con los valores de PCR ( $p = 0.005$ ,  $R = -0.215$ ), al igual que en el trabajo que acabamos de mencionar. También es posible que la disminución en todos los grupos diferentes al control confiera una mayor susceptibilidad tanto a los pólipos como a la displasia y al posterior CRC. Ya hemos comentado anteriormente las controversias encontradas en la literatura acerca del papel del licopeno en el CRC, unos aducen que es un protector mientras otros lo consideran pro-oxidante (50,51). Por lo que se desprende de nuestros datos parece jugar un papel protector. No obstante, somos conscientes de la limitación de nuestro grupo control. Además, hemos encontrado asociación entre los valores altos de licopeno y el sexo

femenino ( $p=0.002$ ), como relatan Ito Y. et al. (163), y una consistente relación entre valores altos de licopeno y ausencia de aterosclerosis ( $p=0.002$ ), como ya lo revelaron Klipstein-Grobusch K. et al. (164). Por todo esto, tenemos que ser precavidos antes de afirmar una hipótesis sin estudios más amplios. Al tratarse de una sustancia antioxidante no es extraña la correlación entre los niveles de  $\beta$ -caroteno ( $p<0.001$ ,  $R=0.304$ ) y vitamina E ( $p=0.006$ ,  $R=0.208$ ).



**Gráfico 10.** Niveles de triglicéridos

También hemos querido resaltar los resultados obtenidos con los TG ya que, aunque no resultan estadísticamente significativos ( $p=0.054$ ), ésto puede ser debido al reducido tamaño de la muestra que hemos contemplado. Vemos cómo los niveles de TG se encuentran más elevados a partir del grupo de DL, por lo que podemos pensar

que una mayor ingesta de grasas puede ocasionar una mayor susceptibilidad a la aparición de displasia. En estudios previos se demuestra la relación entre niveles elevados de triglicéridos y la aparición de pólipos colorectales adenomatosos (165–167) así como la relación con la aparición de CRC (168). También hemos encontrado asociación entre valores elevados de TG y obesidad ( $p=0.017$ ), tabaquismo ( $p=0.014$ ), enfermedad renal ( $p=0.023$ ), DM ( $p=0.022$ ) y HTA ( $p=0.012$ ). Estas asociaciones coinciden con lo descrito por otros autores (144,169–172). Por consiguiente, al igual que ocurre con el HDL, puede ser que los TG sean un mero marcador del estilo de vida y que sea éste quien realmente importe en la susceptibilidad a la aparición de la displasia y el posterior cáncer. Lo que parece claro es la existencia de una relación entre el metabolismo de las grasas y la susceptibilidad a padecer CRC tal y como indican otros autores (60). La aportación más importante de nuestro estudio, y que no se ha estudiado anteriormente, es plantear que esta relación se puede detectar en el estadio de pólipo, por lo que deberíamos considerar si una reversión en el estilo de vida y en la alimentación serían capaces de revertir la tendencia a padecer cáncer. A diferencia del HDL los TG no se encuentran asociados en nuestro estudio a la edad ( $p=0.915$ ) ni al

sexo ( $p=0.054$ ), por lo que no actuarán como factores de confusión. Hemos encontrado una buena correlación entre los TG y el IMC ( $p=0.012$ ,  $R=0.264$ ) lo que apoya la cuestión que anteriormente hemos comentado. Como ya hemos explicado anteriormente hemos hallado una correlación inversa con el HDL ( $p<0.001$ ,  $R= -0.507$ ) y los  $\beta$ -carotenos ( $p<0.001$ ,  $R= -0.256$ ), factores ambos que hemos propuesto como protectores o marcadores de un estado protector frente a la enfermedad. Al mismo tiempo, hemos comprobado que existe una correlación directa con las LDL ( $p=0.001$ ,  $R=0.248$ ), coincidiendo con Geurian K. et al. (173).

### 5.2.2 PACIENTES ORGANIZADOS SEGÚN GRUPO DE ESTADÍO

Con el fin de comprobar cómo varían los resultados en los grandes grupos estudiado (control, pacientes con pólipos y pacientes con cáncer) hemos organizado los resultados que se muestran en la siguiente tabla.

	<b>CONTROL</b>	<b>PÓLIPO</b>	<b>TUMOR</b>	<b>p valor</b>
<b>ESTRADIOL</b>	26,43 (29,87)	36,49 (59,28)	20,28 (17,28)	0,214
<b>TRIGLICÉRIDOS</b>	94,64 (37,97)	108,21 (53,14)	124,68 (49,51)	<b>0,034</b>
<b>COLESTEROL TOTAL</b>	222,38 (43,98)	214,66 (43,02)	192,55 (40,86)	<b>0,002</b>
<b>LDL</b>	126,55 (35,00)	138,43 (41,39)	125,51 (35,43)	0,159
<b>HDL</b>	66,17 (15,24)	54,58 (18,02)	43,23 (14,06)	<b>&lt;0,001</b>
<b>PT</b>	6,90 (0,21)	7,17 (0,34)	7,08 (6,13)	0,986
<b>PCR</b>	2,05 (2,33)	1,51 (1,12)	21,03 (36,47)	<b>&lt;0,001</b>
<b>CEA</b>	2,06 (1,097)	1,97 (1,43)	264,37 (2155,77)	0,678
<b>CA 19,9</b>	9,93 (8,01)	8,04 (10,11)	498,90 (3386,37)	0,577
<b>MPO</b>	10,43 (4,31)	13,05 (8,20)	20,70 (27,75)	0,104
<b>LDL OX</b>	46,95 (30,01)	90,08 (40,03)	82,33 (144,19)	<b>0,001</b>
<b><math>\beta</math>-CAROTENO</b>	511,67 (270,63)	451,16 (403,65)	213,70 (144,190)	<b>&lt;0,001</b>
<b>VITAMINA A</b>	0,423 (0,081)	0,50 (0,14)	0,35 (0,15)	<b>&lt;0,001</b>
<b>VITAMINA E</b>	14,26 (2,73)	14,06 (3,11)	13,12 (3,90)	0,31
<b>LICOPENO</b>	194,33 (66,17)	158,81 (80,96)	141,42 (116,50)	0,112

**Tabla 12.-** Resultados de variables medidas en suero. Se muestran medias con su desviación estándar (entre paréntesis).

p valor: Significación estadística mediante técnicas paramétricas para igualdad de medias de Welch. Positiva si  $p < 0.005$

Como podemos observar los resultados prácticamente no varían, siendo estadísticamente significativas las diferencias entre los grupos de la mayoría de variables que lo fueron con la anterior clasificación. Como podemos observar los valores siguen la misma tendencia que con la anterior clasificación con lo que se

corroboran los resultados obtenidos. En nuestra opinión esta clasificación aporta menos información que la anterior ya que con la anterior podemos saber en qué estadio de la enfermedad suceden los cambios que estamos estudiando. El objetivo de esta clasificación era realizar menos grupos, lo que nos permitiría aumentar el número de sujetos incluidos en cada grupo y poder realizar así un estudio con mayor potencia estadística. Sin embargo, vemos que esto sólo ocurre en el caso de los TG cuyas diferencias entre los grupos se vuelven significativas.

### 5.2.3 PACIENTES ORGANIZADOS SEGÚN DIFERENCIACIÓN

Dado que las anteriores clasificaciones aunaban criterios clínicos e histológicos decidimos realizar una clasificación en función de criterios meramente histológicos para comprobar si los cambios que se observaban pudieran ser debidos a factores dependientes intrínsecamente del tumor.

	CONTROL	SD	DL	G1	G2	G3	p valor
ESTRADIOL	26,43 (29,87)	39,58 (68,71)	29,07 (23,81)	18,30 (9,03)	20,33 (10,40)	17,10 (7,92)	0,35
TRIGLICÉRIDOS	94,64 (37,97)	95,98 (50,45)	144,70 (47,83)	125,94 (52,18)	126,67 (41,22)	110,79 (34,02)	<b>0,013</b>
COLESTEROL TOTAL	222,38 (43,98)	211,15 (35,76)	230,26 (57,39)	194,09 (41,7)	187,78 (39,27)	196,96 (47,52)	<b>0,016</b>
LDL	126,55 (35,00)	135,40 (34,99)	151,03 (56,32)	125,63 (36,28)	124,81 (31,20)	131,64 (36,05)	0,377
HDL	66,17 (15,24)	56,56 (19,62)	50,30 (12,91)	45,20 (14,71)	37,66 (11,06)	39,00 (9,10)	<b>&lt;0,001</b>
PT	6,90 (0,21)	7,17 (0,36)	7,21(0,33)	7,34 (7,21)	6,42 (0,74)	6,25 (0,89)	0,985
PCR	2,05 (2,33)	1,56 (1,28)	1,43 (0,57)	20,88 (39,63)	14,94 (20,12)	30,25 (39,17)	<b>&lt;0,001</b>
CEA	2,06 (1,097)	2,15 (1,57)	1,58 (0,92)	356,09 (2540,47)	23,52 (33,72)	17,06 (38,82)	0,923
CA 19,9	9,93 (8,01)	6,89 (9,06)	11,50 (12,94)	587,18 (3958,95)	221,36 (854,23)	92,72 (233,38)	0,927
MPO	10,43 (4,31)	13,86 (9,19)	10,71 (4,44)	21,42 (31,92)	19,41 (13,87)	18,24 (8,59)	0,468
LDL OX	46,95 (30,01)	89,8 (40,95)	92,51 (41,21)	81,11 (24,36)	83,12 (22,29)	84,34 (23,67)	<b>0,013</b>
β-CAROTENO	511,67 (270,63)	523,19 (446,68)	254,78 (141,25)	225,28 (153,23)	180,41 (131,99)	196,63 (102,90)	<b>0,004</b>
VITAMINA A	0,423 (0,081)	0,48 (0,11)	0,57 (0,89)	0,35 (0,14)	0,38 (0,18)	0,36 (0,15)	<b>&lt;0,001</b>
VITAMINA E	14,26 (2,73)	13,50 (2,75)	15,97 (3,68)	13,34 (4,04)	12,31 (3,15)	13,84 (5,04)	0,289
LICOPENO	194,33 (66,17)	168,70 (84,99)	140,56 (63,18)	147,87 (118,05)	125,53 (115,41)	143,50 (145,18)	0,668

**Tabla 13.-** Resultados de variables medidas en suero. Se muestran medias con su desviación estándar (entre paréntesis).

SD: Pacientes con pólipos sin displasia; DL: pacientes con pólipos con displasia leve; Ca in situ: pacientes con CRC in situ; G1: pacientes con CRC con diferenciación histológica G1; G2: pacientes con CRC con diferenciación histológica G2; G3: pacientes con CRC con diferenciación histológica G3.

p valor: Significación estadística mediante técnicas paramétricas para igualdad de medias de Welch. Positiva si  $p < 0.005$

En líneas generales podemos decir que los resultados obtenidos con esta clasificación son muy similares a los de la clasificación inicial. Los cambios los podemos encontrar dentro de cada tipo de diferenciación. Es decir, aunque los

parámetros medidos se comportan de forma similar en los grandes grupos (control, pólipos, tumor), varían cuando estudiamos su comportamiento en grupos más pequeños. Por lo general, hemos obtenido resultados más homogéneos entre los distintos grupos de tumor (G1, G2, G3) por lo que podemos decir que las variaciones son debidas en mayor medida al estadio clínico del tumor. Esto lo podemos comprobar mejor si observamos los parámetros de respuesta sistémica los cuales están muy bajos o muy altos (dependiendo de la prueba) en el último estadio del tumor (IV) pero que no se corresponde con ninguno de los grados de diferenciación. Esto es así con PCR, vitamina A o  $\beta$ -carotenos.

Cabe destacar que en esta clasificación no resultan significativas las diferencias de MPO entre los grupos. Este hecho es debido probablemente a que sus valores dependan en mayor medida del estadio clínico del proceso tumoral o bien a que los estados de oxidación más elevados (y por tanto con unos valores más elevados de MPO) condicionen un estadio clínico peor que favorezca las metástasis a distancia.

#### ***5.2.4 VALORACIÓN GLOBAL DE LOS RESULTADOS EN SUERO***

A la luz de los resultados aquí mostrados, podemos decir que en las diferentes fases del proceso tumoral desde la aparición del pólipo hasta el estadio IV el estado oxidativo en sangre va aumentando. Ese aumento lo podemos constatar por las variables MPO y LDL ox. Una de las causas que pueden ocasionar ese aumento es el descenso de las sustancias antioxidantes, probablemente atribuido a una disminución en la ingesta de las mismas.

Dependiendo del parámetro que estemos midiendo estos cambios se evidencian en uno u otro estadio del proceso. Lo que parece claro es que ya en la fase de pólipo, con o sin displasia, ocurren cambios en el estado oxidativo del sujeto que probablemente den lugar a una mayor susceptibilidad a padecer CRC. El caso más llamativo nos lo muestran los resultados con LDL ox que están elevados ya en el estadio de pólipo no displásico revelando un incremento del estrés oxidativo que, probablemente, haya dado lugar al propio pólipo y que unido a otros factores pueda dar



origen a una displasia y posteriormente a CRC. Otro de estos parámetros son los  $\beta$ -carotenos que disminuyen drásticamente en los sujetos con pólipos displásicos pudiendo ser una baja ingesta de estos antioxidantes una de las causas que elevan el estado oxidativo y que, por tanto, que den lugar a la displasia. Probablemente los parámetros que mejor definen el estado oxidativo en nuestro estudios sean los pro-oxidantes LDL ox y MPO y los antioxidantes vitamina A y  $\beta$ -carotenos.

No obstante, ya hemos comentado que hay que tener precaución a la hora de valorar todo lo dicho ya que los resultados han podido verse influidos en algunos casos por la edad, el sexo (en menor medida ya que los grupos están mejor equilibrados como ya hemos comentado anteriormente) y por las enfermedades intercurrentes. En este trabajo hemos realizado una primera aproximación de cómo estos factores han podido influir en los resultados.

Con el fin de estudiar mejor el estado oxidativo en suero hemos creado la variable OBSM1, que hemos descrito previamente. Esta variable nos permite analizar el grado de oxidación en los sujetos incluidos en el estudio desde una perspectiva objetiva ya que utiliza los marcadores séricos de oxidación que hemos descrito en el apartado de material y métodos. Esta variable la hemos considerado modificando la variable OBS original tal y como hicieron Goodman et al. (26). Los resultados se muestran en las siguientes tablas.

	<b>CONTROL</b>	<b>SD</b>	<b>DL</b>	<b>Ca in situ</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>p valor</b>
<b>OBSM1</b>	9 (1,50)	8 (2,00)	8 (2,00)	5,5 (5,00)	6 (2,00)	6 (5,00)	5 (3,00)	4 (2,25)	<b>&lt;0,001</b>

**Tabla 14.-** Resultados de variable OBSM1. Se muestran medias con su desviación estándar (entre paréntesis).

SD: Pacientes con pólipos sin displasia; DL: pacientes con pólipos con displasia leve; Ca in situ: pacientes con CRC in situ; I: pacientes con CRC en estadio I; II: pacientes con CRC en estadio II; III: pacientes con CRC en estadio III; IV: pacientes con CRC en estadio IV

p valor: Significación estadística mediante técnicas paramétricas para igualdad de medias de Welch. Positiva si  $p < 0.005$

	<b>CONTROL</b>	<b>PÓLIPO</b>	<b>TUMOR</b>	<b>p valor</b>
<b>OBSM1</b>	9,33 (1,41)	7,56 (1,56)	5,24 (2,41)	<b>&lt;0,001</b>

**Tabla 15.-** Resultados de variable OBSM1. Se muestran medias con su desviación estándar (entre paréntesis).

p valor: Significación estadística mediante técnicas paramétricas para igualdad de medias de Welch. Positiva si  $p < 0.005$

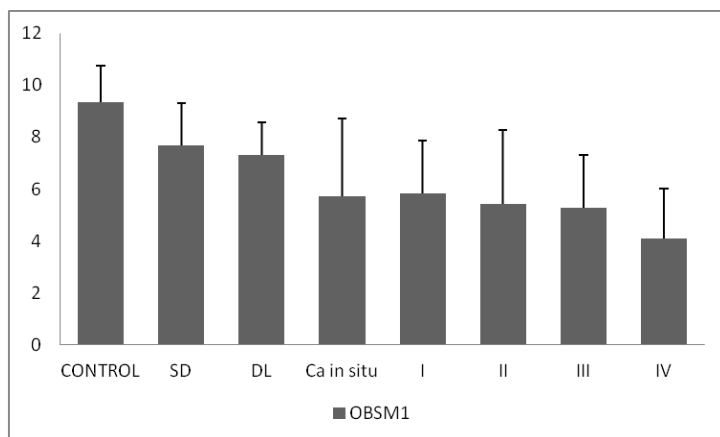
	<i>CONTROL</i>	<i>SD</i>	<i>DL</i>	<i>G1</i>	<i>G2</i>	<i>G3</i>	<i>p valor</i>
<b>OBSM1</b>	9,33 (1,41)	7,67 (1,66)	7,56 (1,01)	5,41 (2,48)	5,00 (1,73)	5,00 (2,93)	<b>&lt;0,001</b>

**Tabla 16.-** Resultados de variable OBSM1. Se muestran medias con su desviación estándar (entre paréntesis).

SD: Pacientes con pólipos sin displasia; DL: pacientes con pólipos con displasia leve; Ca in situ: pacientes con CRC in situ; G1: pacientes con CRC con diferenciación histológica G1; G2: pacientes con CRC con diferenciación histológica G2; G3: pacientes con CRC con diferenciación histológica G3.

p valor: Significación estadística mediante técnicas paramétricas para igualdad de medias de Welch. Positiva si  $p < 0.005$

Las tres tablas anteriores muestran los resultados de la variable OBSM1 habiendo agrupado a los pacientes de las tres formas anteriormente descritas. Esta variable se puede considerar como una medida global de la oxidación en la sangre del paciente. A menor valor de la variable, mayor es el estado oxidativo y viceversa.



**Gráfico 11.** Niveles de OBSM1

En cualquiera de las tres clasificaciones podemos comprobar cómo el estado oxidativo aumenta a medida que avanzamos en el estadio del tumor. Estos resultados obtenidos no se comentan en comparación con otros estudios debido a que ésta constituye una variable propia

y original de este trabajo y no es comparable con otros casos ya que otros autores utilizan variaciones de la misma adaptándose a las circunstancias de su caso. Como ya hemos mencionado anteriormente los cambios comienzan ya en la fase de pólipo y se hacen mucho más evidentes a partir del estadio de Ca in situ. Este estudio global de la oxidación nos permite aventurar la idea de que estados pro-oxidativos predisponen a una mayor susceptibilidad a padecer esta enfermedad. Estos estados pro-oxidantes pueden tener lugar por un menor consumo de antioxidantes, o bien por un estilo de vida poco saludable, algo que comentaremos en los apartados sucesivos.

Resulta de gran interés comentar la relación existente entre el perfil lipídico de los pacientes, el estado oxidativo y la propia enfermedad. Aunque ya estaba descrito en otros estudios que existe una relación entre cifras altas de colesterol y TG y cáncer de

colon (60), seguimos sin saber si se trata de la causa de la enfermedad o la consecuencia del estilo de vida y de la alimentación y si son estas últimas las causantes de la enfermedad (61). Lo mismo sucede con los niveles de HDL ya que, como se ha comentado anteriormente, niveles bajos de HDL están asociados con un mayor riesgo de padecer CRC (62). Tal y como refleja nuestro estudio en los resultados de las diferentes correlaciones anteriormente expuestas, es posible que tanto el estado pro-inflamatorio (niveles de PCR) como el estado oxidativo influyan en este proceso ya que es conocido que el HDL puede actuar como antioxidante (64,65,67). Desafortunadamente, los estudios que hemos llevado a cabo para relacionar el consumo de estatinas y AINEs con los niveles de colesterol y de HDL no han sido concluyentes. El análisis de los datos no nos aporta resultados concluyentes, lo que atribuimos al hecho de que una vez que el paciente consume el fármaco se obtienen poblaciones homogéneas en cuanto a los niveles de colesterol se refiere. Además, hay que tener en cuenta que debido a los análisis de rutina que se realizan en la mayoría de la población cada vez se inicia de forma más temprana el tratamiento con estatinas.

### ***5.2.5 ANÁLISIS MULTIVARIANTE***

Se ha realizado un análisis multivariante en el que se han tenido en cuenta las variables medidas en suero cuyas diferencias han resultado estadísticamente significativas, junto con la edad y el sexo de los pacientes. Los resultados se muestran en la tabla 17.

Aunque se muestran los resultados de las diferentes agrupaciones, vemos que no existen diferencias marcadas entre ellas, por ello vamos a comentar los resultados resultantes de organizar los pacientes en estadíos.

Según los análisis realizados las diferencias observadas entre los grupos para la edad, CT, PT, PCR, LDLox,  $\beta$ -caroteno y vitamina A además de ser estadísticamente significativas son independientes, es decir que no se asocian al resto de las variables estudiadas ni a la edad ni al sexo.

PACIENTES AGRUPADOS EN GRUPOS DE ESTADÍOS		PACIENTES AGRUPADOS EN ESTADÍOS	PACIENTES AGRUPADOS SEGÚN DIFERENCIACIÓN
VARIABLE	Sig.	Sig.	Sig.
EDAD	<b>0,001</b>	<b>0.005</b>	<b>0.003</b>
SEXO	0,121	0.348	0.129
COLESTEROLTOTAL	0,307	<b>0.002</b>	0.096
HDL	0,205	0.073	0.076
TG	,576	-	-
PT	<b>,003</b>	<b>0.021</b>	<b>0.008</b>
PCR	<b>&lt;0,000</b>	<b>0.004</b>	<b>0.002</b>
LDLOX	<b>&lt;0,000</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>
MPO	-	0.178	0.271
bCAROTENO	<b>0,009</b>	<b>0.004</b>	<b>0.014</b>
VITAMINAA	<b>0,011</b>	<b>0.001</b>	<b>0.041</b>
LICOPENO	-	0.074	0.473
OBSM1	<b>0,047</b>	0.233	0.171

**Tabla 17.-** Resultados de análisis multivariante. Se muestran valores de significación estadística Significación estadística mediante técnicas para contrastes de la razón de verosimilitud. Positiva si  $p < 0.005$

Este hecho resulta especialmente importante para demostrar la independencia de los valores de LDLox, ya que es un parámetro cuyos niveles son muy bajos en el grupo control y tenemos que recordar que la edad y el sexo son factores que podían influir dadas las condiciones de este grupo.

Por otra parte, es lógico que los valores de OBSM1 no resulten independientes ya que la variable se ha formado a partir de los propios valores de otras variables.

Estos resultados confirman los hallados por Leung et al. (1) que también encuentran independientes los cambios entre los grupos de vitamina A. Sin embargo en este estudio no encuentran independencia en el resto de las variables.

### 5.3 RESULTADOS EN TEJIDO

#### 5.3.1 PACIENTES ORGANIZADOS SEGÚN ESTADÍO

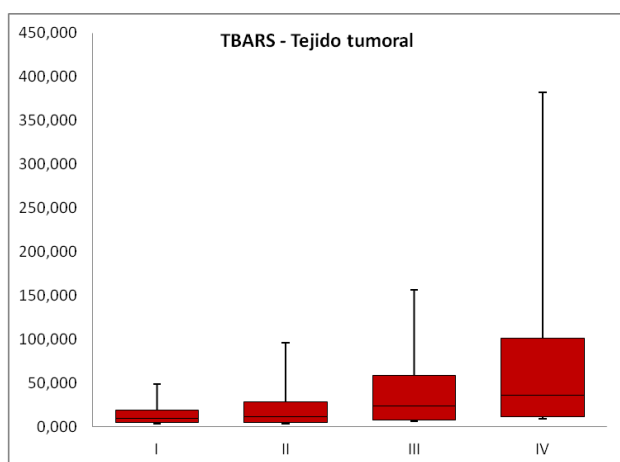
En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos de las variables medidas en tejido, ya sea tumoral o perilesional (sano). Se han considerado grupos de pacientes en función del estadio de CRC en el que se encontraban. En apartados anteriores ya se han detallado el número de pacientes que constan en cada grupo

VARIABLE	I	II	III	IV	p valor
<b>TBARS TUMOR</b>	4,86 (6,05)	6,78 (12,98)	16,18 (36,05)	24,91 (60,50)	<b>0,005</b>
<b>TBARS NORMAL</b>	4,30 (10,18)	4,96 (7,76)	4,54 (26,57)	12,33 (32,79)	0,08
<b>TBARS COCIENTE (TUMOR/SANO)</b>	1,21 (3,22)	1,43 (1,63)	2,32 (2,33)	1,95 (12,37)	0,575
<b>PN TOTALES TUMOR</b>	5,74 (7,25)	3,03 (2,03)	3,49 (7,43)	2,138 (4,50)	0,313
<b>PN TOTALES SANO</b>	3,142 (1,72)	3,30 (4,29)	1,34 (0)	4,92 (4,77)	0,614
<b>PN COCIENTE</b>	1,76 (0,36)	1,14 (13,98)	0	0,451 (0,27)	0,151
<b>IHQ APOD NORMAL</b>	1,25 (1,38)	1,50 (1,00)	2,00 (0,00)	1,93 (1,00)	0,176
<b>IHQ APOD TUMOR</b>	1,50 (1,00)	1,00 (1,50)	2,00 (0,25)	1,50 (1,88)	0,623
<b>IHQ APOD COCIENTE</b>	1,00 (0,19)	1,00 (1,50)	1,00 (0,23)	1,00 (0,63)	0,758

**Tabla 18.-** Resultados de variables medidas en tejido. TBARS: determinación de lípidos peroxidados. PN: proteínas nitrosiladas. IHQ: Inmunohistoquímica. Se muestran medianas con su rango intercuartil (entre paréntesis).

I: pacientes con CRC en estadio I; II: pacientes con CRC en estadio II; III: pacientes con CRC en estadio III; IV: pacientes con CRC en estadio IV

p valor: Significación estadística mediante técnicas no paramétricas por la prueba de Kruskal-Wallis. Positiva si  $p < 0.005$



**Gráfico 12.** Niveles de TBARS en el tejido tumoral.

En este gráfico se representan los niveles obtenidos de lípidos peroxidados mediante TBARS en tejido tumoral. Como podemos observar se obtienen valores más elevados cuanto más alto es el estadio tumoral. El máximo nivel se obtiene en pacientes con estadio IV. Estos datos confirman los resultados de estudios previos (37–39) que proponen un

aumento de los niveles de ROS a medida que aumenta la masa tumoral. Como ya se ha

comentado anteriormente los ROS atacan a los lípidos, entre otras moléculas, por lo que podemos medir el daño que producen mediante el método TBARS. Esto muestra cómo los niveles de estrés oxidativo aumentan a medida que lo hace el estadio tumoral. Sin embargo estos resultados contradicen lo propuesto por otros autores que observan una disminución de los niveles de lípidos peroxidados a medida que avanza el estadio tumoral (36). Otros autores exponen niveles incluso menores que en el tejido normal periadyacente a la lesión (19).

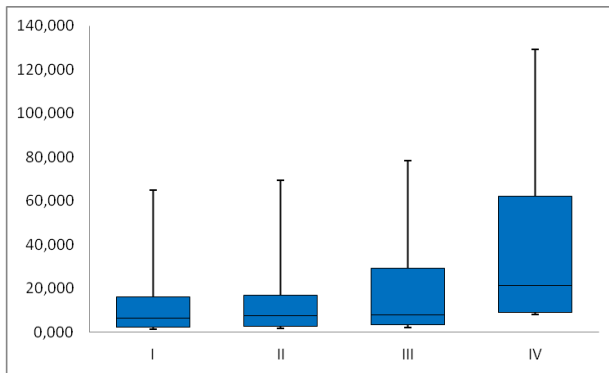
En ninguno de estos trabajos citados se estudia la relación de dichos parámetros con otras enfermedades del paciente, los tratamientos a los que está siendo sometido, el sexo, la edad y otros indicadores de hábitos de vida. Nosotros hemos encontrado que los niveles de TBARS son más elevados en aquellos enfermos que padecen Insuficiencia Renal ( $p < 0.05$ ). Este hecho podría estar condicionando los estudios de los que hemos hablado y por ello encontrar diferencias entre los distintos autores. Si bien es conocido que los niveles de lípidos peroxidados están elevados en el suero de pacientes con enfermedad renal (174–176), especialmente en fase terminal o en hemodiálisis. Es posible que estos enfermos tengan un estado de estrés oxidativo elevado en todo su organismo y esto afecte también a la mucosa colónica. No obstante, las diferencias observadas entre los pacientes con enfermedad renal que se encuentra en cada uno de los grupos no son estadísticamente significativas ( $p = 0.508$ ) por lo que creemos que no afecta a la validez de los resultados. De hecho, solo existe un paciente con enfermedad renal en el estadio IV que es donde se encuentran los valores de lípidos peroxidados más elevados. Los niveles de TBARS analizados en este trabajo no muestran relación estadísticamente significativa con ninguna otra enfermedad de los pacientes.

También se ha estudiado la relación de los niveles de lípidos peroxidados en tejido tumoral con diferentes tratamientos, encontrándose relación con aquellos pacientes que toman estatinas de tal forma que los tratados tienen niveles más bajos de lípidos peroxidados ( $p = 0.02$ ). Es conocido que las estatinas son capaces de reducir los niveles de peroxidación lipídica en suero (177–179), pero no se conocía su comportamiento en tejido de enfermos con CRC. De todas formas los resultados son previsibles según estos estudios previos. Según estos resultados las estatinas disminuyen el estrés oxidativo en el propio tejido tumoral y podrían utilizarse como base de un tratamiento para estos enfermos. No obstante, en nuestro estudio no existen evidencias

claras de que los enfermos con estatinas sobrevivan más tiempo que los no tratados (al menos hasta la fecha del presente trabajo), ni que éstos tengan menos recidivas de la enfermedad. Si bien existen estudios que señalan a las estatinas como fármacos protectores frente al CRC (64,73,74), incluso hay estudios que señalan su potencial uso curativo en asociación con quimioterapia (180). Es posible que el mecanismo subyacente se encuentre en esta reducción del estrés oxidativo que ocurre en la mucosa colónica, lo que conferiría protección frente a padecer CRC. No se ha encontrado relación entre los niveles de lípidos peroxidados en el tejido tumoral y los otros tratamientos estudiados.

Adicionalmente hemos estudiado los niveles de lípidos peroxidados en el tejido tumoral en relación con los tratamientos de quimioterapia (QT) y/o radioterapia (RT) administrados en algunos pacientes de forma previa a la cirugía y hemos comprobado que los pacientes sometidos a estos tratamientos tienen niveles más altos de lípidos peroxidados en el tejido tumoral ( $p=0.028$ ). Aunque era de esperar que la RT elevase estos valores (181) ello no había sido evidenciado en los casos de cáncer de colon, no obstante, están descritos estos incrementos con QT en suero (Farias IL).. También es posible que los individuos sometidos a este tipo de tratamientos más agresivos sean los que presenten tumores evolucionados y ya hemos visto que los tumores más avanzados presentan mayores niveles de lípidos peroxidados.

Al analizar los antecedentes familiares de los pacientes hemos encontrado que los niveles de lípidos peroxidados se encuentran más elevados en aquellos que tienen antecedentes familiares de primer grado con algún tipo de cáncer ( $p=0.045$ ), cáncer digestivo ( $p=0.018$ ) o cáncer de colon ( $p=0.026$ ). Este hecho no ha sido descrito previamente en la literatura y podría deberse a una susceptibilidad genética hereditaria para padecer cáncer de colon. Es posible que estos enfermos tengan una tendencia a tener un estado oxidativo más elevado o algún fallo en los mecanismos antioxidantes que les confiera una mayor susceptibilidad a padecer esta enfermedad. Este hecho podría explicar muchos casos de cánceres en los que parece que existe una agregación familiar pero no se consigue demostrar que sean hereditarios ya que a menudo no cumplen los criterios para entrar en los grupos de estudio (muchas veces por la edad avanzada de los afectados) y en otras ocasiones porque no se detecta la mutación responsable.



**Gráfico 13.** Niveles de TBARS en el tejido normal.

A parte de las aquí comentadas no se ha encontrado asociación adicional alguna entre los niveles de lípidos peroxidados en tejido tumoral y ningún otro tratamiento, enfermedad o modo de vida estudiado en el presente trabajo.

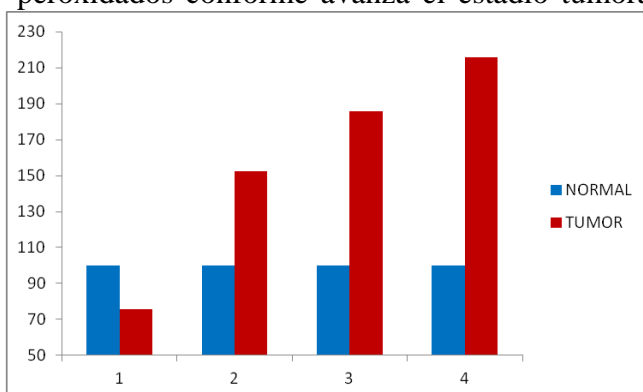
No obstante, es importante destacar que se ha encontrado una buena correlación con los niveles de Proteínas Nitrosiladas (PN) Cociente (PN de tejido tumoral/PN de tejido sano) ( $p < 0.001$ ,  $R = 0.905$ ). Esto evidencia que los dos parámetros resultan ser buenos marcadores del estrés oxidativo que está ocurriendo en la mucosa intestinal. También se ha encontrado una correlación con los niveles de ApoD en tejido tumoral ( $p = 0.022$ ,  $R = 0.365$ ), lo que indica que existe una respuesta de esta proteína frente al estrés oxidativo y que comentaremos posteriormente. Por otra parte, hemos comprobado una correlación negativa con la variable OBSM1 ( $p = 0.042$ ,  $R = -0.270$ ) lo que indica la buena relación entre los niveles de estrés oxidativo en plasma y en tejido (valores menores de OBSM1 se corresponden con mayores estados de oxidación).

Con respecto a los valores de TBARS en tejido normal perilesional podemos observar que existe un incremento en el estadio III y IV, si bien no resulta estadísticamente significativo ( $p > 0.05$ ). Estos valores obtienen una correlación negativa ( $p = 0.001$ ,  $R = -0.560$ ) con los niveles de ApoD en la pieza tumoral. Es posible que la disminución de la expresión de ApoD en la zona tumoral de los estadios más altos dependa del incremento del estrés oxidativo en la zona perilesional. Este incremento es posible que sea debido a varios factores. En primer lugar que la lesión esté produciendo ROS que contaminen esta zona, de modo que, cuanto mayor es el estadio mayor es el nivel de ROS y mayor la contaminación. También es posible que en estos estadios el estado oxidativo del paciente sea mayor y por ende también sea mayor en la mucosa normal. Como ya hemos comentado anteriormente en la literatura científica encontramos todas las posibilidades. En unos casos la peroxidación lipídica es menor (37–39), y en otros mayor (19) que en la mucosa tumoral, pero no hay referencias de los



niveles de la mucosa normal por estadíos, puesto que todos la agrupan como control independientemente del estadio en que se encuentre el paciente. Probablemente, lo más correcto sería considerar estos valores como contaminación, ya sea por proximidad a la zona de la lesión o por un estado hiperoxidativo en general (que no ocurriría en un individuo normal).

En cualquier caso, y para el presente trabajo, hemos decidido utilizar como control de cada sujeto su propia mucosa sana, habiendo obtenido los resultados que se muestran en la tabla 14. A pesar de que se observa un incremento en los niveles de lípidos peroxidados de la zona tumoral con respecto a la zona perilesional que es mayor cuanto mayor es el estadio (excepto en el estadio IV) los resultados que se obtienen no son estadísticamente significativos ( $p > 0.05$ ). Esto puede ser debido a varias circunstancias. Por un lado, al bajo número de individuos de que se dispuso para la muestra, dado que no fue posible recoger mucosa sana y tumoral de todos los pacientes seleccionados debido a que se recogían las porciones de mucosa que no eran imprescindibles para el diagnóstico clínico. Y principalmente, se puede deber a que no en todos los pacientes los valores de TBARS eran mayores en el tejido tumoral, algo que se corresponde con las observaciones de otros autores (19). Por este motivo decidimos construir el siguiente gráfico a modo meramente ilustrativo. Se ha asignado un valor de 100 a la media de los valores de TBARS de la mucosa normal de cada estadio y se halla el porcentaje de las medias de cada estadio de TBARS en el tumor. De esta manera solventamos el problema de la pérdida de pacientes. Aplicando las pruebas de Kruskal Wallis para muestras no aparejadas obtenemos que las diferencias aquí mostradas son estadísticamente significativas ( $p = 0.002$ ). En el gráfico 14 se puede visualizar cómo la tendencia general es un incremento en los valores de lípidos peroxidados conforme avanza el estadio tumoral. Es preciso destacar que el valor de



TBARS cociente se correlaciona muy bien con el de PN cociente ( $p < 0.001$ ,  $R = 0.950$ ) por lo que ambos son buenos indicadores de estrés oxidativo. TBARS cociente también se encuentra asociado (al igual que TBARS tumor y en el

**Gráfico 14.** Niveles de TBARS en el tejido, tomando los valores en mucosa normal como el 100%.

mismo sentido) a los antecedentes familiares de cáncer ( $p=0.011$ ), de cáncer digestivo ( $p=0.021$ ) y a la enfermedad renal ( $p=0.012$ ).

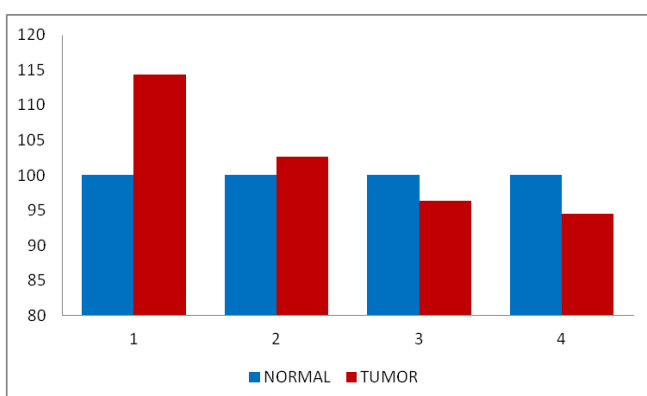
No obstante, no hay que olvidar que no tenemos un control de mucosa sana perteneciente a pacientes sin enfermedad intestinal. Esto no ha sido posible debido a que los pacientes que se someten a cirugía intestinal, aunque sea por causas diferentes a CRC, suelen tener un patrón de estrés oxidativo elevado como es el caso de la enfermedad inflamatoria intestinal u otros procesos que conlleven inflamación. Por esto, aunque se utilice mucosa perilesional como control, ésta no es la mucosa de un sujeto sano. Además, partimos de la idea, como hemos comprobado en el apartado anterior, de que existe un estado oxidativo aumentado de base que es el que condiciona una mayor susceptibilidad al cáncer, e incluso la mucosa sana perilesional debe de contener niveles más elevados de lípidos peroxidados que la mucosa de un individuo sano. Lo ideal sería poder analizar estos valores en una mucosa de este tipo y compararla con la mucosa perilesional de los pacientes, algo que no se ha realizado en ningún estudio previo.

El estrés oxidativo en tejido lo hemos determinado también analizando el grado de nitrosilación de proteínas tal y como se ha comentado en el apartado de material y métodos. En este caso, al igual que en el anterior, hemos medido proteínas nitrosiladas tanto en tejido tumoral (PN tumor) como en perilesional (PN sano). Así mismo, hemos determinado el valor obtenido en el tejido tumoral con respecto a su mucosa sana (PN cociente).

Analizando los resultados hemos encontrado una asociación entre PN tumor y RT/QT de tal manera que los pacientes tratados tienen valores más bajos de proteínas nitrosiladas ( $p=0.029$ ). Esto indicaría que la RT y la QT producen estrés oxidativo afectando a los lípidos pero de menor manera a las proteínas. Hay que decir que estos resultados no concuerdan bien con los encontrados en tumores de rata (182) en los que las radiaciones ionizantes aumentan la nitrosilación de proteínas y tampoco con los encontrados en líneas celulares tumorales en los que drogas administradas aumentan la nitrosilación de proteínas y la apoptosis (183). Adicionalmente hemos encontrado que los individuos fumadores tienen niveles más elevados de proteínas nitrosiladas en el tejido tumoral ( $p=0.039$ ). Si bien no hemos encontrado estudios previos en la literatura,

es bien conocido que el tabaco actúa como prooxidante (26) por lo que es lógico esperar un aumento en los niveles de proteínas nitrosiladas.

En este trabajo hemos determinado una buena correlación entre los niveles de PN cociente y TBARS tumor y TBARS cociente. Así mismo, hemos visto que existe una buena correlación con el nivel de estrógenos ( $p=0.004$ ,  $R=0.761$ ), algo no descrito previamente.



**Gráfico 15.** Niveles de Apo D en el tejido, tomando los valores en mucosa normal como el 100%.

En este trabajo también se muestran resultados de los niveles de ApoD en tejido. Se trata de medidas semicuantitativas en cortes histológicos realizados por el Servicio de Anatomía Patológica del HCUV. Se han asignado a las muestras cuatro valores según la expresión de ApoD que mostraran

(0,1,2,3). En este trabajo nos vamos a limitar a la medida semicuantitativa de ApoD sin entrar en otros detalles propios de la Anatomía Patológica y que ya hemos comentado que se analizan en el marco de un estudio más amplio. Con respecto a los resultados mostrados en la tabla 17 se muestran las medianas ya que se han realizado pruebas no paramétricas debido al tamaño muestral reducido de los grupos analizados. Las diferencias entre los grupos no resultan significativas probablemente debido al tamaño muestral reducido. Además, el hecho de que sólo haya cuatro valores posibles y que se hayan utilizado medianas no nos deja apreciar lo que puede estar ocurriendo. Por eso, hemos elaborado el siguiente gráfico a modo meramente ilustrativo, asignando un valor de 100 a la media de los valores de ApoD de la mucosa normal de cada estadio y se ha hallado el porcentaje de las medias de cada estadio de ApoD en el tumor. De esta manera vemos cómo los niveles de ApoD disminuyen al aumentar el estadio tumoral. No obstante, al aplicar la prueba de Kruskal Wallis para muestras no aparejadas no se alcanza significación estadística ( $p>0.05$ ). Estos resultados coinciden con los hallados en otro estudio previo (184) en el que miden la expresión del gen de ApoD en relación con la mucosa normal, aunque sin tener en cuenta los estadios. Según dicho estudio el gen de ApoD se encuentra metilado e inactivado en las células tumorales, siendo

identificado como gen supresor de tumores. Sin embargo, estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio indican que el proceso es más complejo y que la expresión de ApoD se produce cuando las células no se están dividiendo en respuesta al estrés oxidativo, ya que, esta proteína se sobre-expresa en casos de estrés celular promoviendo la apoptosis de las células dañadas (97,98).

Los niveles de ApoD en el tejido sano se asocian al polimorfismo que hemos llamado ApoD3 (RS1568565) en el gen de la ApoD, de tal forma que aquellos individuos homocigotos G/G tienen niveles más elevados de ApoD en el tejido sano perilesional ( $p=0.039$ ). En la distribución de este polimorfismo no se han observado diferencias significativas entre los distintos grupos del estudio tal y como comentaremos en un apartado posterior. Este hecho podría indicar que estos individuos tienen una expresión basal más elevada de ApoD, lo que podría conllevar un aumento de la protección frente al estrés oxidativo y por lo tanto a padecer cáncer. De esta manera se podría producir un aumento de la supervivencia aunque esto no se ha observado en el presente estudio. Al encontrarse el polimorfismo en una zona no codificante es difícil pensar en una proteína anómala y por eso hemos propuesto esta posibilidad. Los niveles de ApoD en el tejido normal tienen buena correlación con los niveles de ApoD en tejido tumoral ( $p<0.001$ ,  $R=0.610$ ). Se ha encontrado una correlación negativa con los niveles de vitamina E en suero ( $P=0.012$   $R= -0.359$ ), tal vez porque la vitamina E en suero se une a las LDL y éstas descienden (27) o porque la vitamina E desciende en los estadios más avanzados como consecuencia de la respuesta inflamatoria sistémica (47), aunque no se han encontrado estudios al respecto en la literatura. Así mismo, se ha encontrado una correlación negativa con la variable OBSM2 ( $p=0.030$ ,  $R= -0.462$ ). Esta variable se encuentra disminuida en estados oxidativos por lo que ApoD podría funcionar como una proteína antioxidante que se eleva al detectar estos estados.

Con respecto a los niveles de ApoD en el tejido tumoral hemos encontrado niveles más altos de esta proteína en los sujetos fumadores que en los no fumadores ( $p=0,031$ ). No hemos encontrado información al respecto en la bibliografía pero pensamos que el estado prooxidante al que conlleva el tabaco podría inducir una mayor expresión de ApoD. Aunque el hecho de que ocurra solamente en la zona tumoral hace que sean necesarios más estudios para corroborar este hecho. Como ya hemos comentado anteriormente ,se ha encontrado una buena correlación con TBARS tumor

( $p=0.022$ ,  $R=0.365$ ) y TBARS cociente ( $p=0.031$ ,  $R=0.415$ ). También se ha hallado una correlación negativa con TBARS normal ( $p=0.001$ ,  $R= -0.560$ ) que ha sido explicada anteriormente. Así mismo, se ha hallado una correlación negativa con los valores en suero de vitamina A ( $p=0.029$ ,  $R= -0.315$ ). Según estudios previos (185,186) la vitamina A induce la síntesis de ApoD en las células del cáncer de mama. En nuestro caso podría suceder que la disminución de vitamina A en los estadios más altos de la enfermedad debido a la respuesta inflamatoria sistémica (47) cesara su estímulo sobre las células cancerosas, lo que produciría un descenso en los niveles de ApoD en el tejido. De esta manera, el tumor no entraría en apoptosis y tendería a avanzar en el organismo. De nuevo hemos encontrado una correlación negativa con una variable que hemos utilizado para definir el estado oxidativo, la OBSM1 ( $p=0.027$ ,  $R= -0.319$ ), lo que indica que estos estados oxidativos pueden inducir la expresión de ApoD.

Como ya hemos comentado anteriormente hemos comparado los niveles de ApoD en el tumor con los de la mucosa sana en cada paciente mediante la variable ApoD cociente. Hemos encontrado que los individuos con un cociente más alto tienen una mayor mortalidad ( $p=0.047$ ) hasta la fecha, lo que podría contradecirse con los resultados de estudios previos (184). No obstante hay que tener en cuenta que Ogawa K. et al. han medido la expresión de ApoD mediante PCR cuantitativa y se refieren a cantidades totales de mRNA sin compararlas con la expresión de la proteína en el tejido sano, mientras que nosotros estamos utilizando un método semicuantitativo y lo hemos comparado con la mucosa normal.

### ***5.3.2 PACIENTES ORGANIZADOS SEGÚN DIFERENCIACIÓN***

Dado que las anteriores clasificaciones aunaban criterios clínicos e histológicos decidimos realizar una clasificación en función de criterios meramente histológicos para comprobar si los cambios que se observaban pudieran ser debidos a factores dependientes intrínsecamente del tumor.

En líneas generales podemos decir que los resultados obtenidos con esta clasificación son muy similares a los de la clasificación inicial. No obstante, aunque las diferencias en la variable TBARS tumor se pueden constatar no resultan

estadísticamente significativas. Esto nos lleva a pensar que la concentración de lípidos peroxidados en el tejido tumoral depende más del estadio clínico que de las características anatomopatológicas del tumor. En efecto, podemos observar que en G3 existe un aumento de lípidos peroxidados, pero con una dispersión muy elevada, por lo que pueden estar interviniendo otros factores. No siempre una diferenciación G3 se corresponde con un estadio alto ni una G1 con uno bajo por lo que deben existir características propias del paciente que hacen que esto sea así. Estas características se ven mejor reflejadas al agrupar a los pacientes por estadios clínicos que por criterios anatomopatológicos, al menos en las variables estudiadas en el presente trabajo.

	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>p valor</b>
<b>TBARS TUMOR</b>	9,33 (39,69)	9,91 (17,10)	38,18 (48,79)	0,283
<b>TBARS NORMAL</b>	9,08 (18,34)	4,13 (18,76)	4,67 (21,56)	0,663
<b>TBARS COCIENTE (TUMOR/SANO)</b>	1,23 (5,69)	2,25 (1,41)	3,42 (8,00)	0,322
<b>PN TOTALES TUMOR</b>	3,23 (5,42)	3,72 (10,02)	2,73 (2,64)	0,639
<b>PN TOTALES SANO</b>	4,17 (3,82)	0,39 (4,99)	5,34 (0)	0,365
<b>PN COCIENTE</b>	1,71 (1,64)	0,54 (0)	0,76 (0)	0,752
<b>IHQ APOD NORMAL</b>	1,50 (1,00)	2,00 (1,50)	2,00 (0,50)	0,297
<b>IHQ APOD TUMOR</b>	1,25 (1,00)	1,50 (1,50)	2,50 (0,75)	0,182
<b>IHQ APOD COCIENTE</b>	1,00 (0,67)	1,00 (1,18)	0,80 (0,17)	0,117

**Tabla 19.-** Resultados de variables medidas en tejido. Se muestran medianas con su rango intercuartil (entre paréntesis).

G1: pacientes con CRC con diferenciación histológica G1; G2: pacientes con CRC con diferenciación histológica G2; G3: pacientes con CRC con diferenciación histológica G3.

p valor: Significación estadística mediante técnicas no paramétricas por la prueba de Kruskal-Wallis. Positiva si  $p < 0.005$

### **5.3.3 VALORACIÓN GLOBAL DE LOS RESULTADOS EN TEJIDO**

En líneas generales podemos decir que los niveles de estrés oxidativo se encuentran más elevados en el tejido tumoral que en la mucosa perilesional y que son más elevados cuanto mayor es el estadio del tumor. Estos niveles son más bajos en pacientes que toman estatinas y más altos en aquellos que padecen Insuficiencia Renal, en los que han sido sometidos a tratamientos coadyuvantes, o en aquellos que tienen antecedentes familiares de cáncer, lo que podría estar modificando las asociaciones del estudio. En este sentido sería deseable ampliar el estudio con más pacientes para poder

estratificar. No obstante los niveles de estrés oxidativo se correlacionan bien con las variables que cuantifican el estado oxidativo del paciente.

Con respecto a ApoD podemos decir que de forma global se encuentra disminuida en el tejido tumoral con respecto a la mucosa perilesional. Como ya hemos comentado esto puede ser debido a la inactivación de la expresión del gen en la zona tumoral cuando las células se están dividiendo. No obstante es posible que también sea debido, al menos en parte, al descenso de la vitamina A en los estadios más altos como consecuencia de la respuesta inflamatoria sistémica, ya que esta vitamina induce la expresión del gen de ApoD.

En resumen, podemos decir que el estrés oxidativo que se produce en el tejido tumoral es mayor cuanto mayor es el estadio de la enfermedad y que la célula tumoral es capaz de evitar los mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo, como la ApoD. Uno de estos mecanismos puede ser el efecto que la ApoD tendría sobre la célula tumoral induciendo la apoptosis, sin embargo vemos que sus niveles se encuentran disminuidos en el tejido tumoral. Esta forma de protección frente al estrés oxidativo podría constituir uno de los diversos mecanismos por los que las células tumorales consiguen proliferar incontroladamente.

## 5.4 RESULTADOS DE ESTILO DE VIDA Y ALIMENTACIÓN

### 5.4.1 PACIENTES ORGANIZADOS SEGÚN ESTADÍO

En las tablas siguientes se muestran los resultados de las variables referentes al estilo de vida y alimentación de los pacientes obtenidas mediante la realización de un cuestionario a los individuos participantes en el estudio, como se ha detallado en el capítulo de material y métodos. Se han considerado grupos de pacientes en función del estadio de CRC en el que se encontraban. En apartados anteriores ya se han detallado el número de pacientes que constan en cada grupo.

	CON-TROL	SD	DL	Ca in situ	I	II	III	IV	p valor
<b>PESO</b>	-	69,90 (11,80)	76,80 (15,17)	67,50 (13,93)	66,00 (14,46)	69,80 (8,52)	67,88 (8,04)	80,92 (26,46)	0,235
<b>TALLA</b>	-	1,68 (0,87)	1,71 (0,10)	1,66 (0,82)	1,62 (0,13)	1,62 (0,70)	1,60 (0,76)	1,70 (0,77)	<b>0,037</b>
<b>IMC</b>	-	24,85 (3,24)	26,01 (3,68)	24,26 (3,77)	24,78 (2,77)	26,20 (3,53)	26,50 (2,87)	27,75 (7,46)	0,358
<b>G. DE OBESIDAD</b>		48,1% (13)	40% (4)	58,3% (7)	42,9% (3)	30,8% (4)	25% (2)	30,8% (4)	
<b>NORMAL DELGADEZ</b>	-	0	0	8,3% (1)	0	0	0	7,7% (1)	
<b>SOBREPESO</b>	-	48,1% (13)	30% (3)	16,7% (2)	57,1% (4)	53,8% (7)	62,5% (5)	38,5% (5)	
<b>O. GRADO I</b>	-	3,7% (1)	30% (3)	16,7% (2)	0	15,4% (2)	12,5% (1)	7,7% (1)	
<b>O. GRADO II</b>	-	0,00%	0%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	7,7% (1)	
<b>O. MÓRBIDA</b>	-	0,00%	0%	0,00%	0	0,00%	0,00%	7,7% (1)	0,821
<b>OBESIDAD</b>	-	51,9% (14)	60,0% (6)	33,3% (1)	57,1% (4)	69,2% (9)	75,0% (6)	61,5% (8)	0,57
<b>EJERCICIO AISLADO</b>	-	18,5% (5)	63,6% (7)	36,4% (4)	9,1% (1)	13,3% (2)	25% (2)	11,8% (2)	
<b>HABITUAL</b>	-	77,8% (21)	27,3% (3)	36,4% (4)	54,5% (6)	33,3% (5)	25% (2)	35,3% (6)	
<b>INTENSO</b>	-	3,7% (1)	0%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	5,9% (1)	
<b>SEDENTARISMO</b>	-	0,00%	9,1% (1)	27,3% (3)	36,4% (4)	53,3% (8)	0,00%	47,1% (8)	<b>&lt;0,001</b>
<b>SEDENTARISMO</b>	-	17,9% (5)	72,7% (8)	63,6% (7)	45,5% (6)	66,7% (10)	75,0% (6)	58,8% (10)	<b>0,002</b>
<b>FUMADOR</b>	30% (2)	40% (10)	60% (6)	40% (5)	50% (6)	30% (4)	30% (4)	40% (8)	0,801
<b>A. F. C. COLON</b>	-	71,41% (20)	72,7% (8)	18,2% (2)	9,1% (1)	6,7% (1)	0%	17,6% (3)	
<b>OTROS CC. DIGESTIVOS</b>	-	17,9% (5)	9,1% (1)	0%	9,1% (1)	0%	0%	5,9% (1)	
<b>OTROS TIPOS DE CÁNCER</b>	-	0%	0%	36,4% (4)	0%	6,7% (1)	11,1% (1)	5,9% (1)	
<b>SIN AA. FAMILIARES</b>	-	10,7% (3)	18,2% (2)	45,5% (5)	81,8% (9)	86,7% (13)	88,9% (8)	70,6% (12)	<b>&lt;0,001</b>

**Tabla 20.-** Resultados de variables referentes al estilo de vida de los pacientes y sus antecedentes familiares de cáncer. Se muestran medias con su desviación estándar (entre paréntesis) ó porcentajes con el número de pacientes correspondientes a ese porcentaje (entre paréntesis), según sea el caso.

SD: Pacientes con pólipos sin displasia; DL: pacientes con pólipos con displasia leve; Ca in situ: pacientes con CRC in situ; I: pacientes con CRC en estadio I; II: pacientes con CRC en estadio II; III: pacientes con CRC en estadio III; IV: pacientes con CRC en estadio IV

p valor: Significación estadística mediante técnicas paramétricas para igualdad de medias de Welch para variables cuantitativas y prueba de chi-cuadrado para cualitativas. Positiva si  $p < 0,005$



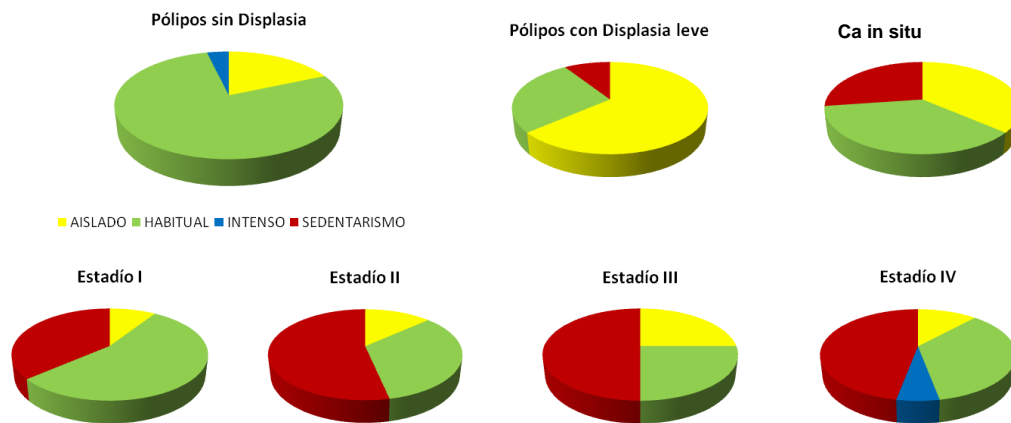
Como se puede observar existen diversas variables sin resultados en el grupo control. Esto es debido a que fue imposible conseguir que los individuos del grupo control accedieran a contestar de forma pormenorizada al cuestionario. Hay que tener en cuenta, como ya se ha comentado anteriormente, que se trata de sujetos sanos que no tienen consciencia de enfermedad por lo que este proceso es más complicado.

	<i>SD</i>	<i>DL</i>	<i>Ca in situ</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>	<i>p valor</i>
<b>FRUTAS</b>	375,33 (204,35)	395,82 (103,18)	325,56 (271,97)	242,71 (189,74)	335,14 (192,69)	287,30 (118,26)	260,80 (225,93)	0,147
<b>VEGETALES</b>	428,37 (234,74)	378,57 (354,10)	344,44 (323,50)	249,97 (168,81)	298,52 (158,14)	368,05 (202,11)	320,59 (328,78)	0,102
<b>ALCOHOL</b>	7,92 (23,16)	15,93 (34,48)	6,22 (12,72)	0,00 (1,71)	0,00 (0,96)	1,79 (11,35)	1,71 (10,27)	<b>0,005</b>
<b>CARNE ROJA</b>	59,16 (35,67)	72,43 (41,48)	39,78 (9,98)	38,57 (78,58)	85,10 (64,65)	73,36 (70,02)	77,53 (39,51)	0,125
<b>VÍSCERAS</b>	0,30 (7,33)	0,00 (5,50)	0,00 (4,11)	0,00 (3,67)	0,30 (7,33)	3,67 (3,37)	0,30 (3,67)	0,92
<b>CARNE ROJA + VÍSCERAS</b>	67,27 (46,41)	80,80 (36,43)	42,14 (14,74)	47,14 (74,34)	85,10 (62,94)	73,36 (71,57)	77,83 (61,13)	0,132
<b>CARNE PROCESADA</b>	1,67 (8,11)	14,29 (42,86)	1,67 (1,67)	1,67 (1,67)	1,67 (7,14)	1,67 (6,73)	7,14 (5,48)	<b>0,026</b>
<b>PESCADO</b>	48,90 (40,07)	48,14 (41,18)	39,19 (49,60)	43,02 (120,00)	38,26 (46,92)	38,57 (40,75)	36,29 (49,67)	0,991
<b>E. GRASAS</b>	274,55 (338,43)	289,10 (355,45)	179,80 (88,95)	89,90 (76,15)	179,80 (150,92)	211,90 (176,69)	94,71 (13,63)	<b>0,002</b>
<b>E. TOTAL</b>	2298,74 (768,33)	2698,25 (1189,00)	1963,91 (1019,30)	1398,44 (529,53)	1793,99 (643,84)	1972,22 (1307,93)	1612,45 (936,06)	<b>0,027</b>
<b>E. NO GRASAS</b>	1959,36 (768,83)	2165,61 (866,36)	1694,21 (952,47)	1308,54 (548,78)	1692,83 (536,13)	1749,01 (1083,90)	1522,55 (939,05)	0,067
<b>FIBRA TOTAL</b>	33,34 (16,60)	29,16 (14,35)	25,10 (18,42)	21,96 (11,64)	24,39 (8,82)	23,64 (3,40)	27,32 (15,37)	<b>0,012</b>
<b>GRASA TOTAL</b>	89,49 (52,20)	97,59 (66,14)	60,25 (49,65)	45,54 (20,79)	73,58 (41,05)	76,51 (54,94)	60,64 (33,80)	<b>0,025</b>
<b>AGP TOTAL</b>	15,12 (11,85)	20,53 (14,45)	9,42 (8,09)	8,12 (5,01)	13,66 (7,74)	15,10 (8,28)	8,98 (12,67)	0,108
<b>H. TOTAL</b>	18,84 (9,84)	16,97 (7,10)	15,14 (6,61)	15,05 (9,21)	13,69 (5,21)	15,50 (5,43)	15,95 (7,98)	0,171
<b>VC TOTAL</b>	346,60 (143,24)	256,78 (195,88)	320,44 (264,62)	255,52 (124,59)	215,87 (124,88)	206,17 (199,78)	336,89 (252,56)	<b>0,041</b>
<b>β-CAROTENO TOTAL</b>	6545,63 (3717,19)	5107,55 (3894,14)	4927,87 (4114,90)	4539,40 (2761,47)	3194,94 (3010,90)	3182,24 (3639,77)	5216,97 (4170,64)	<b>0,019</b>
<b>VE TOTAL</b>	7,78 (4,60)	8,05 (6,10)	5,07 (5,78)	4,50 (0,77)	5,24 (4,41)	7,73 (3,60)	4,73 (3,93)	<b>0,024</b>
<b>VD TOTAL</b>	5,55 (4,96)	6,26 (8,28)	4,60 (6,47)	6,34 (5,32)	3,42 (5,13)	3,01 (3,72)	5,26 (4,10)	0,884
<b>LUTEÍNA</b>	53,74 (48,24)	35,71 (37,63)	38,97 (54,43)	37,71 (8,57)	44,29 (53,04)	22,95 (36,86)	16,90 (37,71)	0,239
<b>LICOPENO</b>	57,74 (52,87)	66,07 (67,67)	46,84 (49,14)	37,50 (45,88)	58,39 (35,44)	61,73 (36,55)	48,21 (71,63)	0,195
<b>VA TOTAL</b>	1682,52 (997,22)	1479,47 (876,38)	1109,39 (1035,72)	1131,59 (767,48)	1031,86 (1001,49)	1316,59 (935,82)	1246,99 (1144,46)	0,245

**Tabla 21.-** Resultados de variables referentes a la alimentación de los pacientes. Se muestran medianas con su rango intercuartil (entre paréntesis).

SD: Pacientes con pólipos sin displasia; DL: pacientes con pólipos con displasia leve; Ca in situ: pacientes con CRC in situ; I: pacientes con CRC en estadio I; II: pacientes con CRC en estadio II; III: pacientes con CRC en estadio III; IV: pacientes con CRC en estadio IV

p valor: Significación estadística mediante técnicas no paramétricas de Kruskal Wallis. Positiva si  $p < 0.005$



**Gráfico 16.** Realización de ejercicio en los pacientes pertenecientes a diferentes estadios

En el gráfico 16 podemos observar cómo influye el ejercicio en el desarrollo del cáncer de colon. El número de pacientes que realizan ejercicio es estadísticamente significativo más elevado ( $p < 0.001$ ) en los estadios de pólipos que en los que presentan cáncer. Es más, en líneas generales podemos afirmar que el número de pacientes que practican ejercicio descende conforme avanza el estadio de la enfermedad. Otros estudios señalan la ausencia de ejercicio como un factor de riesgo para padecer esta enfermedad y señalan que un incremento del mismo disminuye el riesgo de desarrollar CRC (187–189). Además, numerosos estudios señalan que la supervivencia en pacientes con CRC aumenta con el incremento de los niveles de ejercicio físico (90). Según nuestros resultados el ejercicio habitual es posible que intervenga en la prevención del desarrollo de pólipos displásicos y prevenga que esos pólipos displásicos se transformen en cáncer. No obstante, hay que tener en cuenta que el ejercicio seguramente actúe como coadyuvante de otros elementos incluidos en el estilo de vida del paciente. Tanto es así que, como ya hemos comentado anteriormente, hemos encontrado que aquellos pacientes que realizan más ejercicio presentan niveles séricos más elevados de vitamina A ( $p = 0.005$ ) y vitamina E ( $p = 0.018$ ) tal y como se ha descrito en estudios previos (190,191). Esto, probablemente, se debe a que los pacientes que realizan ejercicio de forma habitual llevan un estilo de vida saludable en otros aspectos, aunque el mecanismo no está claro tal y como comentan los estos estudios. De hecho se ha comprobado que los sujetos que realizan ejercicio extremo tienen niveles disminuidos de vitaminas antioxidantes (192). También hemos comprobado que los individuos que realizan ejercicio de manera habitual toman mayor cantidad de alimentos ricos en carotenos ( $p = 0.046$ ) algo que apoya nuestra hipótesis. En relación a esto último

tenemos que decir que los individuos que realizan ejercicio habitual poseen menores niveles de oxidación en lo que se refiere a las variables OBSM1 ( $p=0.004$ ) y OBSM2 ( $p=0.016$ ) lo cual ratifica estudios previos que indican que los individuos que realizan ejercicio físico de forma moderada tienen mayores defensas antioxidantes y menores niveles de oxidación (193,194) aunque el mecanismo no parece estar claro, si bien parece que el ejercicio induce mecanismos antioxidantes que reducen el óxido nítrico. También hemos podido comprobar que los individuos que realizan ejercicio habitual fallecen menos ( $p=0.011$ ) tal y como mencionan estudios previos (90).



**Gráfico 17.** Sedentarismo en los pacientes pertenecientes a diferentes estadios

En el gráfico 17 hemos expuesto la influencia del sedentarismo en los pacientes del estudio. Hemos entendido como sedentarismo todo aquel paciente que no realiza ejercicio o que lo hace de manera aislada. De esta manera podemos comprobar que los pacientes que presentan cáncer (a excepción del estadio I) o algún tipo de displasia son en su mayoría sedentarios. Evidentemente este hecho está relacionado con todo lo expuesto anteriormente en referencia al ejercicio y como el ejercicio era un factor protector del CRC. No obstante hemos querido clasificar de esta manera a los pacientes para poder observar mejor las asociaciones con otros parámetros. Así podemos comprobar cómo los individuos sedentarios tienen cifras menores de HDL ( $p=0.025$ ) tal y como revelan otros autores (195,196), algo esperado pero importante si tenemos en cuenta que los individuos fallecidos presentan cifras bajas de HDL y realizan menos ejercicio. Por lo tanto, uno de los dos puede estar funcionando como un factor de confusión. Por otra parte, tenemos que comentar, que los individuos sedentarios consumen menos alimentos ricos en VC ( $p=0.023$ ) y en carotenos ( $p=0.031$ ) lo que

apoya nuestra hipótesis planteada anteriormente que indicaba que los pacientes que realizan ejercicio de forma poco habitual o no realizan ejercicio llevan a cabo, en líneas generales, una vida menos saludable. De esta manera vemos que pueden ser varios los factores que contribuyen al desarrollo y mantenimiento del estado hiperoxidativo existente en estos pacientes y que contribuye a la aparición del CRC. Tenemos que destacar que los individuos sedentarios tienen los alelos C/C para el polimorfismo que hemos llamado ApoD1 en mayor proporción que los no sedentarios. Con referencia a esto último no hemos encontrado bibliografía al respecto y tendríamos que llevar a cabo un estudio con mayor número de pacientes para verificar los datos. De corroborarse esto, podríamos pensar en una posible acción endocrina de la ApoD que induce que los individuos homocigotos C/C están predispuestos para no realizar ejercicio.

En el gráfico 18 hemos querido representar como se distribuyen los pacientes con antecedentes familiares de cáncer dependiendo del estadio en que se encuentren.



**Gráfico 18.** Distribución de los pacientes con AF de cáncer

Como podemos comprobar, la mayoría de los pacientes que tienen antecedentes familiares se encuentran en el grupo de pacientes con pólipos de forma estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ). Este hecho es un dato intrínseco de nuestro estudio y no comparable con otros y es debido a que los pacientes que acuden a la consulta de Digestivo para someterse a una colonoscopia lo hacen por presentar antecedentes familiares de cáncer de colon. Hemos hallado, en nuestro estudio, que los pacientes con

AF de cáncer sufren recidivas de la enfermedad con más frecuencia ( $p=0.044$ ), tal vez por tratarse la mayoría de ellos de pólipos que tienden a recidivar. No obstante, tenemos que decir que los pacientes con AF de cáncer presentan niveles más elevados de lípidos peroxidados en el tumor (TBARS tumor) ( $p=0.045$ ) y de TBARS cociente ( $p=0.011$ ). Esto es así tanto para los que presentan AF de cáncer de colon ( $p=0.026$ ) como para los que presentan AF de cáncer digestivo ( $p=0.018$ ). Como ya hemos comentado en el apartado anterior este hecho puede deberse a una predisposición genética que conlleve un estado hiperoxidativo que a su vez facilite tanto la aparición como el progreso de la enfermedad tumoral. Hay que recordar que la variable de lípidos peroxidados solo fue analizada en los pacientes con cáncer ya que de los pacientes con pólipos no obtuvimos una muestra óptima de tejido, con lo que no influye como factor de confusión el hecho que antes hemos comentado con respecto a las colonoscopias.

En lo referente a la alimentación de los pacientes incluidos en el estudio tenemos que decir que la información puede encontrarse sesgada debido a las propias circunstancias de la enfermedad en estudio. Es decir, como podemos comprobar los individuos afectados de cáncer consumen menos calorías totales ( $p=0.027$ ) lo cual quiere decir que comen menos cantidad. Esto es probablemente debido a su estado actual a pesar de que al realizar el cuestionario a estos pacientes se les especificó que debían señalar lo que comían habitualmente antes del diagnóstico. No obstante, hay que tener en cuenta que se trata de personas de edad avanzada y su ingesta total puede ser inferior a la de los individuos incluidos en los grupos de pacientes con pólipos, en su mayoría de menor edad. Por otra parte, hay que comentar que no contamos para el estudio con un grupo control y los individuos afectados de pólipos, aunque sanos, tienen un riesgo potencial de padecer cáncer, tanto por los pólipos, que de no haber sido extirpados seguirían su degeneración, como por los antecedentes familiares que presentan. Aunque se muestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos éstas probablemente sean debidas en su mayoría a que los individuos enfermos consumen menos cantidad de alimentos.

A pesar de las consideraciones expuestas anteriormente, consideramos que son importantes las asociaciones y correlaciones observadas entre los alimentos y otras variables del estudio. Esto es así ya que estas relaciones se refieren más a la proporción

de los alimentos que a la cantidad neta de los mismos en cada grupo, por lo que hemos podido estudiarlo con mayor facilidad.

Con respecto al consumo de vegetales hemos observado cómo se correlaciona bien con los niveles de  $\beta$ -carotenos en sangre ( $p=0.001$ ,  $R=0.301$ ) lo cual es lógico ya que estas sustancias se encuentran en los vegetales en mayor proporción. También se correlaciona bien con la variable OBSM1 ( $p=0.013$ ,  $R=0.243$ ) lo que indica que los individuos que consumen mayor cantidad de vegetales tienen menores niveles de oxidación (o mayores niveles de antioxidantes, OBSM1) tal y como revelan estudios previos (75–78).

En cuanto al alcohol vemos cómo los individuos con pólipos y Ca in situ consumen mayor cantidad de forma estadísticamente significativa ( $p=0.005$ ). Ya comentamos que el descenso del consumo de alcohol, probablemente sea debido a la propia enfermedad cancerosa y a las enfermedades intercurrentes. No obstante, tenemos que mencionar que los niveles de consumo de alcohol se correlacionan bien con los niveles de vitamina A ( $p=0.011$ ,  $R=0.231$ ), algo ya descrito previamente (197), dado que parece que el etanol incrementa los niveles de retinol en suero al inducir su salida del hígado para convertirse en ácido retinoico todo-trans en tejidos como el SNC. Del mismo modo hemos evidenciado que los individuos fumadores consumen mayor cantidad de alcohol ( $p<0.001$ ) lo cual es reflejo del estilo de vida que siguen estos individuos. También hemos observado que las mujeres consumen menos alcohol que los hombres ( $p<0.001$ ) en y que los afectados por enfermedades reumáticas también consumen menos alcohol ( $p=0.035$ ) tal vez debido a la contraindicación del alcohol por los fármacos que consumen de forma habitual.

El consumo de carne roja se correlaciona bien con los niveles de TG en suero ( $p=0.008$ ,  $R=0.238$ ) lo cual es lógico ya que la carne es una fuente de estos TG. También hemos observado que los obesos consumen más carne roja ( $p=0.039$ ) y que por el contrario los afectados de enfermedad reumática o de asma consumen menos ( $p=0.015$  y  $p=0.028$  respectivamente), posiblemente debido al propio estado de enfermedad.

Hemos encontrado que el consumo de vísceras es más elevado en aquellos enfermos que precisan de tratamiento coadyuvante con quimio o radioterapia ( $p=0.018$ ) sobre lo cual no hemos encontrado referencias en la literatura científica. Es posible que este tipo de alimentación conlleve una mayor gravedad de la enfermedad que haga necesario el uso de este tratamiento coadyuvante. Tanto es así que también hemos comprobado que los pacientes que recidivan o fallecen con más frecuencia dentro de la evolución de la enfermedad ingieren mayor cantidad de vísceras ( $p=0.022$ ). Al estudiar la mortalidad hemos comprobado que los individuos fallecidos ingerían vísceras en mayor cantidad ( $p=0.003$ ). Sobre este aspecto tampoco hemos encontrado ningún estudio previo por lo que consideramos importante este hallazgo ya que podría contribuir a la prevención del CRC si se confirma en estudios posteriores. Hay que tener en cuenta que los individuos que padecen DM consumen más cantidad de vísceras ( $p=0.014$ ) por lo que podría influir como factor de confusión ya que estos enfermos fallecen con más frecuencia en nuestro estudio ( $p=0.028$ ).

El consumo de carnes procesada parece ser mayor en los individuos con pólipos con DL y en aquellos que se encuentran en estadio IV ( $p=0.026$ ) pero dado lo amplio del rango intercuartil es posible que se deba a los valores extremos. Tenemos que comentar que el consumo de estas carnes procesadas ha sido mayor entre los fumadores ( $p=0.036$ ) lo cual puede ser un reflejo del estilo de vida de estos pacientes. Digamos que los pacientes fumadores en general se preocupan menos por llevar a cabo una dieta saludable. También hemos visto que este consumo es mayor en los afectados de enfermedades renales ( $p=0.007$ ) algo que ya se ha comprobado que aumenta el riesgo de padecer esta enfermedad (198). Sin embargo, el consumo es menor en los enfermos que padecen enfermedad reumática ( $p=0.036$ ) o asma ( $p=0.048$ ) tal vez debido al propio estado de enfermedad.

Hemos comprobado que aquellos afectados de neoplasia previa consumen más pescado ( $p=0.039$ ) lo cual puede indicar que estos enfermos comiencen a llevar una vida más saludable después de haber padecido la enfermedad siguiendo los consejos de su médico. Igualmente, es mayor el consumo de pescado en aquellos enfermos que sufren alguna recidiva ( $p=0.04$ ) aunque hay que tener en cuenta que la mayoría de las recidivas se llevan a cabo en los pacientes afectos de pólipos. En este último caso el razonamiento puede ser el mismo que en caso anterior y es que estos pacientes una vez

que han adquirido consciencia de enfermedad comiencen a llevar una vida saludable, algo que no limita las recidivas debido probablemente al escaso tiempo transcurrido.

El consumo de Energía proveniente de las grasas también es mayor en los afectados por pólipos ( $p=0.002$ ) posiblemente por la propia enfermedad de los enfermos con cáncer y por las enfermedades intercurrentes que les llevan a realizar una dieta más o menos estricta. Este consumo se correlaciona con el nivel de estrógenos ( $p=0.011$ ,  $R=0.228$ ), algo ya observado en otros estudios (199,200). Esto indica que existe una regulación endocrina que incrementa el nivel de estas hormonas sexuales en función de la grasa consumida, tal como indican estos estudios. Además, hay que tener en cuenta que a mayor grasa consumida existe mayor posibilidad de obesidad, por eso encontramos autores que piensan que el factor de riesgo que supone la obesidad para ciertos tipos de cáncer es debido al exceso de hormonas sexuales que se producen en los obesos (201,202). Aunque nosotros partíamos de la premisa de considerar a los estrógenos como un factor protector del cáncer de colon, tal como indicaban estudios previos (62) no hemos encontrado ningún resultado positivo a este respecto por lo que nos podemos estar encontrando ante un factor complejo ya que es posible que los estrógenos actúen como factor de protección mientras que la obesidad (sobre la que tampoco hemos obtenido ningún resultado en este sentido) actúe como factor de riesgo (75). El consumo de Energía proveniente de las grasas también tiene una buena correlación con los niveles séricos de HDL ( $p=0.025$ ,  $R=0.202$ ) ratificando los resultados de McEneny J. et al. (203). Es posible que la mayor parte de estas grasas no sean saturadas y de ahí el incremento de HDL, algo que avalaría el hecho de la buena correlación del consumo de grasas con la variable OBSM1 ( $p=0.038$ ,  $R=0.205$ ). También tenemos que tener en cuenta la premisa que hemos hecho al principio, y es que los individuos afectados de pólipos son los que más alimentos consumen y por tanto los que más grasas consumen, pero a la vez son los que menores niveles de oxidación tienen. Hemos observado que aquellos enfermos que padecen aterosclerosis consumen menos alimentos grasos ( $p=0.009$ ) tal vez porque se encuentren advertidos de lo perjudicial que resultan estos alimentos para su enfermedad. Así mismo los enfermos con enfermedad reumática también consumen menos cantidad de este tipo de alimentos ( $p=0.034$ ) al igual que los que padecen DM ( $p=0.038$ ), tal vez por la misma causa que hemos comentado anteriormente. Aquellos pacientes en tratamiento con estatinas también consumen menos grasas ( $p=0.029$ ) al igual que los tratados con AINE



( $p=0.006$ ) probablemente debido a la enfermedad subyacente por la que están siendo tratados.

Los niveles de Energía total ya hemos comentado al principio de este apartado que son mayores en los sujetos afectados de pólipos ( $p=0.027$ ). Así mismo se correlacionan con los de vitamina A en suero ( $p=0.036$ ,  $R=0.193$ ) lo cual es lógico ya que la vitamina A proviene de fuentes animales que son las que más energía aportan y, por tanto, aquellos individuos que consumen alimentos con mayor carga energética (ó más alimentos de forma neta) deben de tener mayores niveles de vitamina A en suero. Además estos alimentos que contienen vitamina A no son alimentos grasos, algo que hemos comprobado al observar que existe correlación entre el consumo de Energía no grasa y los niveles de vitamina A en suero ( $p=0.038$ ,  $R=0.190$ ). Esto viene a ratificar estudios previos que indican que dietas saludables bajas en grasas saturadas aumentan los niveles de vitamina A (204). También hemos observado que los individuos que menos alimentos consumen (menor energía total) son aquellos que están afectados por una enfermedad reumática ( $p=0.002$ ) probablemente por el propio estado de enfermedad.

El consumo de Energía que no proviene de las grasas es menor en aquellos pacientes afectados de enfermedad reumática ( $p=0.023$ ) y en los afectados de asma ( $p=0.037$ ) probablemente por su propia enfermedad. Como ya hemos indicado parece ser que estos dos grupos pacientes consumen en general menos cantidad de alimentos que el resto de los grupos del estudio.

Con respecto a los valores de Fibra ingeridos vemos como nuevamente es menor en los grupos con cáncer ( $p=0.012$ ) probablemente debido a las razones ya comentadas. Aparte de esto hay que decir que se correlacionan con los niveles séricos de HDL ( $p=0.031$ ,  $R=0.195$ ) verificando lo observado en otros estudios (205,206). El mecanismo no está claro, incluso estos autores que hemos citado exponen que hay diferencias según el tipo de fibra que se consuma, pero lo más probable es que una dieta rica en fibra sea un reflejo más de un estilo de vida saludable. No obstante existen estudios que indican que indican que una dieta rica en fibra insoluble disminuye los niveles séricos de HDL (207). Sea cual sea el mecanismo está ampliamente demostrado en la comunidad científica que una dieta rica en fibra previene la aparición de CRC

(4,5,7), lo mismo que unos niveles elevados de HDL (65). La ingesta de fibra también se correlaciona bien en nuestro estudio con los niveles de  $\beta$ -carotenos en suero ( $p<0.001$ ,  $R=0.415$ ) verificando lo expuesto por Wallström P. et al. (208), lo cual es fácil de pensar si tenemos en cuenta que los carotenos se encuentran en mayor medida en los vegetales, al igual que la fibra. Otra correlación que hemos encontrado con la ingesta de fibra se corresponde a las variables marcadoras de oxidación OBSM1 ( $p<0.001$ ,  $R=0.375$ ) y OBSM2 ( $p<0.001$ ,  $R=0.357$ ) lo que indica que los individuos que comen más fibras tienen un estado antioxidante más elevado lo cual se corresponde con lo que hemos comentado anteriormente.

Los valores de grasa total también son menores en los afectados por cáncer ( $p=0.025$ ), por lo que nuevamente hay que buscar las razones en la enfermedad cancerosa y en las enfermedades intercurrentes.

En lo que respecta a la ingesta de Ácidos Grasos Poliinsaturados (AGP) vemos como se correlaciona bien con los niveles de vitamina A en suero ( $p=0.015$ ,  $R=0.223$ ) lo que se corresponde con lo expuesto por Okita M. et al. (209). Hay que tener en cuenta que los AGP actúan como prooxidantes según diversos estudios (79,80) tal y como se comentó ampliamente en el apartado de revisión bibliográfica por lo que no hay que confundir este efecto con su efecto beneficioso para la salud y el riesgo cardiovascular que se menciona en el estudio al que nos hemos referido anteriormente (209). Como en otros tipos de alimentos nos encontramos que los afectados por enfermedad reumática ( $p=0.007$ ) y por asma ( $p=0.043$ ) consumen menos cantidad de este tipo de ácidos grasos.

Al analizar la ingesta de Hierro vemos como existe una buena correlación con los niveles de  $\beta$ -caroteno en suero ( $p=0.005$ ,  $R=0.256$ ), algo que no había sido analizado en estudios previos. Esto indica que la población que consume mayores cantidades de alimentos con hierro tiene niveles más elevados en sangre de vitaminas y antioxidantes, algo que se confirma al comprobar que su ingesta se correlaciona bien con los niveles de la variable OBSM1 ( $p=0.009$ ,  $R=0.258$ ). Hemos comprobado que los pacientes diabéticos consumen menos cantidad de hierro que el resto de los pacientes ( $p=0.033$ ) lo cual parece ser una consecuencia de la dieta que siguen estos pacientes para evitar las complicaciones de la enfermedad. Aunque no hemos obtenido resultados en este

sentido, estudios previos indican que el consumo de alimentos ricos en hierro se identifica con un menor riesgo a la hora de padecer CRC (210,211) mientras que Erhardt J.G. et al. (212) opinan lo contrario ya que el consumo de mayores cantidades de hierro suele estar asociado a una mayor ingesta de carne roja.

La vitamina C ingerida es menor en los grupos de enfermos que padecen cáncer ( $p=0.041$ ) a excepción de los pacientes en estadio IV, tal vez porque en este estadio es más fácil el consumo de dietas blandas a base de verduras y frutas. De todas formas los niveles de vitamina C ingeridos guardan buena correlación con los niveles de  $\beta$ -carotenos en suero ( $p<0.001$ ,  $R=0.403$ ), lo cual es lógico ya que ambos antioxidantes se encuentran en frutas y verduras. Lo mismo sucede con los niveles en suero de licopeno ( $p=0.019$ ,  $R=0.215$ ). Podemos decir que guarda buena correlación con la variable OBSM1 ( $p=0.013$ ,  $R=0.215$ ) y OBSM2 ( $p=0.040$ ,  $R=0.245$ ) lo que indica que los individuos que consumen mayor cantidad de vitamina C tienen mayores niveles antioxidantes. También queremos destacar que los pacientes sometidos a tratamiento coadyuvante con quimio o radioterapia consumen menor cantidad de vitamina C en los alimentos ( $p=0.008$ ). Esto puede indicar, al igual que comentamos en el caso de las vísceras, que estos individuos consumen menos alimentos saludables lo que conllevaría, entre otros factores, a una enfermedad más agresiva que necesite este tipo de tratamiento previo al acto quirúrgico para disminuir el tumor y poder así extirparlo con márgenes de seguridad. También hemos podido observar que los individuos sedentarios consumen menor cantidad de estos alimentos ( $p=0.023$ ) lo que es reflejo de un estilo de vida poco saludable.

Con respecto a los carotenos ingeridos también son menores en los estadios con cáncer, a excepción del estadio IV ( $p=0.019$ ) cuya explicación puede ser la misma que hemos utilizado para la vitamina C ya que ambos nutrientes se encuentran de forma más abundante en la fruta y los vegetales. Los carotenos ingeridos sí guardan buena correlación con los niveles en plasma de  $\beta$ -carotenos ( $p<0.001$ ,  $R=0.385$ ) lo cual es lógico. Así mismo guardan buena correlación con la variable OBSM1 ( $p=0.008$ ,  $R=0.262$ ) y OBSM2 ( $p=0.048$ ,  $R=0.216$ ) lo que indica de nuevo que los sujetos que consumen mayor cantidad de alimentos ricos en carotenos tienen un estado antioxidante mayor. También hemos comprobado que aquellos individuos que realizan ejercicio de forma habitual consumen mayor cantidad de carotenos ( $p=0.046$ ) mientras que los

sedentarios tienen un menor consumo de estas sustancias ( $p=0.031$ ) lo cual nuevamente es reflejo de que los individuos que llevan un estilo de vida saludable realizan más ejercicio y comen dietas ricas en antioxidantes. También tenemos que señalar que los enfermos afectados de DM consumen menor cantidad de estos alimentos ( $p=0.019$ ) así como los tratados con estatinas ( $p=0.04$ ). La causa más probable es que estos individuos aunque han reducido su alimentación a base de grase y han eliminado ciertos alimentos perjudiciales para su enfermedad no han aumentado el consumo de otros alimentos que resultarían beneficiosos.

En cuanto a la vitamina E ingerida vemos como de nuevo es menor en los grupos con cáncer a excepción del estadio III ( $p=0.024$ ). Sin embargo, no podemos decir que guarde buena relación con sus valores en plasma ( $p>0.05$ ,  $R=0.107$ ) lo cual se explica fácilmente si tenemos en cuenta la enfermedad que nos ocupa. Es decir, como hemos comentado anteriormente, los niveles de vitamina E se encuentran disminuidos en los pacientes con CRC, más disminuidos cuanto más avanzada está la enfermedad y esto es debido al descenso de las proteínas ligadoras como respuesta de fase aguda (47). Por lo tanto, el hecho de no encontrar una correlación entre ambas es debido a que los enfermos con CRC tienen disminuidos sus niveles en plasma aunque consuman alimentos ricos en esta vitamina debido a su propia enfermedad. No obstante hemos de decir que no hemos encontrado descrito el estudio de esta correlación en la literatura en el entorno de pacientes con CRC. Sin embargo, sí hemos observado la existencia de correlación entre los niveles de vitamina E ingerida y los niveles séricos de vitamina A ( $p=0.020$ ,  $R=0.213$ ), lo cual probablemente indique que los sujetos encuestados consuman estas vitaminas liposolubles de forma conjunta aunque procedan de fuentes diferentes (correlación entre la ingesta de vitamina A y la ingesta de vitamina E con  $p<0.001$  y  $R=0.513$ ). Así mismo, los niveles de vitamina E ingeridos guardan buena correlación con las variables OBSM1 ( $p=0.012$ ,  $R=0.248$ ) y OBSM2 ( $p=0.047$ ,  $R=0.217$ ) lo que indica que los sujetos que ingieren mayores cantidades de vitamina E tienen mayor estado antioxidante. También hemos comprobado que los pacientes que tienen que ser sometidos a radio o a quimioterapia consumen menor cantidad de vitamina E ( $p=0.034$ ) lo que puede contribuir a desarrollar una enfermedad más agresiva que necesite estos tratamientos.

En lo que se refiere a los niveles de vitamina A ingerida sucede lo mismo ya que no se correlacionan bien con sus valores en suero ( $p > 0.05$ ,  $R = 0.167$ ) debido a la misma causa que hemos expuesto con la vitamina E. Sin embargo, si se correlacionan bien con los niveles de  $\beta$ -carotenos en suero ( $p = 0.004$ ,  $R = 0.267$ ) por lo que los individuos deben consumir los dos antioxidantes de forma similar (de hecho ambas ingestas tienen buena correlación con  $p < 0.001$  y  $R = 0.715$ ). Lo que sucede es que la enfermedad, debido a la respuesta inflamatoria sistémica, impide que los valores en suero se correlacionen con los de la ingesta. Además hemos obtenido una correlación positiva con la variable de oxidación OBSM1 ( $p = 0.029$ ,  $R = 0.216$ ) lo que indica que los sujetos que ingieren mayor cantidad de vitamina A tienen un mayor estado antioxidante.

En cuanto a los valores de vitamina D ingerida observamos como guardan correlación con los niveles séricos de TG ( $p = 0.045$ ,  $R = 0.181$ ) algo para lo que no hemos conseguido encontrar explicación en la bibliografía, más bien al contrario ya que estudios existentes muestran un descenso de triglicéridos en individuos y ratas tratadas con suplementos de vitamina D (213,214). Al igual que en otros casos hemos observado que los pacientes sometidos a tratamientos coadyuvantes con quimio o radioterapia consumen menos cantidad de esta vitamina con la dieta ( $p = 0.016$ ), lo que pensamos que puede estar provocando junto a otros factores el desarrollo de una enfermedad más agresiva que necesite estos tratamientos. Tal vez sea un hecho anecdótico comentar que los individuos homocigotos A/A para el polimorfismo ApoD3 ingieren con la dieta mayores cantidades de vitamina D ( $p = 0.002$ ).

Otra discrepancia encontrada en nuestro estudio es la correlación entre la ingesta de alimentos ricos en luteína y los niveles séricos de PCR ( $p = 0.033$ ,  $R = 0.192$ ) ya que Gruber M. et al. (215) revelan que los pacientes que consumen altos niveles de luteína tienen valores reducidos de PCR y además hay numerosos estudios que indican cómo un consumo elevado de antioxidantes reduce los niveles de PCR al reducir la inflamación (216–218). Sin embargo nos encontramos ante un caso de enfermedad. Al igual que sucedía con la vitamina E, se ha comprobado que los niveles de luteína están disminuidos en los enfermos con CRC (1) debido a la disminución de sus proteínas ligadoras. Teniendo en cuenta que estos enfermos en estadios avanzados tienen elevados niveles de PCR, no es extraño entonces hallar esta correlación positiva. En el caso de los pacientes afectados de DM observamos que consumen menos cantidad de alimento

ricos en luteína ( $p=0.032$ ) tal vez por la razón que antes comentamos en el caso de los carotenos. Lo que más nos llama la atención es comprobar que los pacientes fallecidos en el estudio consumían menor cantidad de alimentos ricos en luteína ( $p=0.01$ ). Esta relación no había sido observada hasta la fecha en la literatura y la consideramos de importancia ya que podría ayudar a prevenir el CRC.

En cuanto a la ingesta de alimentos ricos en licopeno no hemos encontrado una buena correlación con los niveles en suero de licopeno ( $p>0.005$ ,  $R=0.118$ ), de nuevo debido al mismo problema, ya que sus niveles disminuyen en suero con la enfermedad como reactante de fase aguda(1). Sin embargo, hemos hallado correlación con los niveles de  $\beta$ -caroteno ( $p<0.001$ ,  $R=0.460$ ) que no se modifican por la propia enfermedad. Esto nos viene a decir que probablemente de no ser debido a la enfermedad estos individuos también tendrían una buena correlación con los niveles de licopeno en suero ya que probablemente los individuos que consumen alimentos ricos en  $\beta$ -carotenos también lo hacen con alimentos ricos en licopeno (de hecho ambos consumos se correlacionan bien siendo  $p<0.001$  y  $R=0.319$ ). Como hemos podido observar la ingesta de licopeno se correlaciona bien con las variables de oxidación OBSM1 ( $p=0.007$ ,  $R=0.263$ ) y OBSM2 ( $p=0.046$ ,  $R=0.219$ ) lo que indica que los individuos que consumen niveles más elevados de licopeno tienen un estado antioxidante más elevado en suero. También hemos comprobado que los pacientes sometidos a tratamientos coadyuvantes consumen menos cantidad de alimentos ricos en licopeno lo que podría contribuir a desarrollar una enfermedad más agresiva. Del mismo modo hemos observado que los pacientes afectados de enfermedades del SNC consumen más cantidad de licopeno en la dieta ( $p=0.034$ ), hecho probablemente circunstancial debido al reducido tamaño de la muestra de estos enfermos, no obstante tendremos ocasión de comprobarlo con estudios posteriores. Así mismo, queremos comentar que los pacientes en tratamiento con AAS consumen menor cantidad de licopeno ( $p=0.035$ ) probablemente debido a que son pacientes con una enfermedad de base y que no seguían una dieta saludable hasta el diagnóstico de su enfermedad, posteriormente modificaron la dieta eliminando alimentos perjudiciales pero no incrementando los más beneficiosos.

#### 5.4.2 PACIENTES ORGANIZADOS SEGÚN GRUPO DE ESTADÍO

Con el fin de comprobar cómo varían los resultados en los grandes grupos estudiados (control, pacientes con pólipos y pacientes con cáncer) hemos organizado los resultados relacionados con el estilo de vida mostrándolos en la siguiente tabla.

	CONTROL	PÓLIPO	TUMOR	p valor
<b>PESO</b>	-	71,72 (12,93)	71,25 (16,80)	0,832
<b>TALLA</b>	-	1,69 (0,91)	1,65 (0,90)	0,091
<b>IMC</b>	-	25,16 (3,35)	26,03 (4,75)	0,309
<b>G. DE OBESIDAD</b> NORMAL	-	45,9% (17)	37,7% (20)	0,818
DELGADEZ	-	0	3,8% (2)	
SOBREPESO	-	43,2% (16)	43,4% (23)	
O. GRADO I	-	10,8% (4)	11,3% (6)	
O. GRADO II	-	0,00%	1,9% (1)	
O. MÓRBIDA	-	0,00%	1,9% (1)	
<b>OBESIDAD</b>	-	54,1% (20)	58,5% (31)	0,665
<b>EJERCICIO</b> AISLADO	-	31,6% (12)	17,7% (11)	<0,001
HABITUAL	-	63,2% (24)	37,1% (23)	
INTENSO	-	2,6% (1)	1,6% (1)	
SEDENTARISMO	-	2,6% (1)	43,5% (27)	
<b>SEDENTARISMO</b>	-	33,3% (13)	61,3% (38)	0,006
<b>FUMADOR</b>	30% (2)	40% (16)	40% (27)	0,86
<b>A. F.</b> C. COLON	-	71,8% (28)	11,1% (7)	<0,001
OTROS CC. DIGESTIVOS	-	15,4% (6)	3,2% (2)	
OTROS TIPOS DE CÁNCER	-	0%	11,1% (7)	
SIN AA. FAMILIARES	-	12,8 % (5)	74,6% (47)	

**Tabla 22.-** Resultados de variables referentes al estilo de vida de los pacientes y sus antecedentes familiares de cáncer. Se muestran medias con su desviación estándar (entre paréntesis) ó porcentajes con el número de pacientes correspondientes a ese porcentaje (entre paréntesis), según sea el caso.  
p valor: Significación estadística mediante técnicas paramétricas para igualdad de medias de Welch para variables cuantitativas y prueba de chi-cuadrado para variables cualitativas. Positiva si  $p < 0.005$

Como bien podemos observar los resultados no difieren en gran medida a incluir a los pacientes en grupos más amplios. El único parámetro que varía es la talla, algo propio de cada individuo y que en principio no modifica los resultados del estudio ya que los resultados de IMC no varían.

En definitiva, podemos decir que las diferencias que se observan entre los pacientes con pólipos y los aquellos que padecen cáncer son significativas para las variables ejercicio ( $p < 0.001$ ), sedentarismo ( $p = 0.006$ ) y antecedentes familiares de cáncer ( $p < 0.001$ ), algo que ya hemos explicado con detalle en el apartado anterior. Por lo tanto podemos concluir que esta nueva clasificación no aporta gran cosa a los resultados del estudio.

En la tabla siguiente se muestran los resultados de la ingesta alimentaria de los pacientes según esta clasificación.

<b>NO PARAMÉTRICAS</b>	<b>PÓLIPO</b>	<b>TUMOR</b>	<b>p valor</b>
<b>FRUTAS</b>	379,86 (217,23)	274,25 (186,25)	<b>0,006</b>
<b>VEGETALES</b>	418,97 (301,75)	314,05 (296,23)	<b>0,003</b>
<b>ALCOHOL</b>	8,16 (27,78)	0,03 (9,40)	<b>0,001</b>
<b>CARNE ROJA</b>	65,09 (40,00)	64,16 (58,67)	0,956
<b>VÍSCERAS</b>	0,30 (7,33)	0,30 (3,97)	0,832
<b>CARNE ROJA + VÍSCERAS</b>	71,79 (45,03)	65,99 (67,89)	0,8
<b>CARNE PROCESADA</b>	3,33 (14,15)	1,67 (7,14)	0,153
<b>PESCADO</b>	48,14 (42,86)	36,29 (47,92)	0,362
<b>E. GRASAS</b>	274,58 (351,57)	103,14 (144,40)	<b>&lt;0,001</b>
<b>E. TOTAL</b>	2368,37 (1005,79)	1790,61 (873,08)	<b>&lt;0,001</b>
<b>E. NO GRASAS</b>	1989,05 (857,46)	1615,83 (862,47)	<b>0,001</b>
<b>FIBRA TOTAL</b>	30,22 (18,29)	23,97 (11,61)	<b>&lt;0,001</b>
<b>GRASA TOTAL</b>	90,69 (71,85)	63,37 (50,80)	<b>0,001</b>
<b>AGP TOTAL</b>	16,34 (14,64)	10,00 (10,46)	<b>0,003</b>
<b>H. TOTAL</b>	17,78 (9,63)	15,05 (6,61)	<b>0,001</b>
<b>VC TOTAL</b>	338,31 (190,46)	240,07 (211,34)	<b>0,004</b>
<b>CA TOTAL</b>	6053,14 (4085,30)	3775,62 (4496,35)	<b>&lt;0,001</b>
<b>VE TOTAL</b>	7,96 (5,62)	4,79 (5,03)	<b>&lt;0,001</b>
<b>VD TOTAL</b>	6,18 (8,35)	5,15 (5,58)	0,332
<b>LUTEÍNA</b>	44,21 (54,18)	35,71 (60,78)	0,077
<b>LICOPENO</b>	59,76 (64,76)	51,31 (53,21)	<b>0,028</b>
<b>VA TOTAL</b>	1615,21 (1068,13)	1131,59 (1086,61)	<b>0,003</b>

**Tabla 23.-** Resultados de variables referentes a la alimentación de los pacientes. Se muestran medianas con su rango intercuartil (entre paréntesis).  
p valor: Significación estadística mediante técnicas no paramétricas de Kruskal Wallis. Positiva si  $p < 0,005$

Como podemos observar en la tabla al incluir a los pacientes en grupos más amplios se hace más visible la disminución de la ingesta en los pacientes con cáncer tal y como comentábamos en el apartado anterior. No vamos a repetir por tanto las conclusiones a las que llegamos sobre este hecho ya que, como acabamos de comentar, en ninguna variable estudiada la ingesta es mayor en los pacientes que padecen cáncer. Lo único que podemos destacar es que no existen diferencias significativas entre los grupos para algunos tipos de alimentos que se consideran factores de riesgo para el CRC tales como la carne roja.



### 5.4.3 PACIENTES ORGANIZADOS SEGÚN DIFERENCIACIÓN

Dado que las anteriores clasificaciones aunaban criterios clínicos e histológicos decidimos realizar una clasificación en función de criterios meramente histológicos para comprobar si los cambios que se observaban pudieran ser debidos a factores dependientes intrínsecamente del tumor. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

PARAMÉTRICAS	CONTROL	SD	DL	G1	G2	G3	p valor
<b>PESO</b>	-	69,90 (11,80)	75,33 (15,32)	71,15 (13,009)	59,75 (6,076)	55,00(0)	0,298
<b>TALLA</b>	-	1,68 (0,09)	1,71 (0,14)	1,65 (0,1)	1,60 (0,04)	0,6 (0)	0,246
<b>IMC</b>	-	24,85 (3,24)	25,56 (3,60)	26,04 (3,86)	23,32 (2,90)	21,48	0,293
<b>G. DE OBESIDAD</b>							
NORMAL	-	48,1% (13)	44,4% (4)	40,5% (17)	50% (2)	100% (1)	
DELGADEZ	-	0	0	2,4% (1)	0	0	
SOBREPESO	-	48,1% (13)	33,3% (3)	40,5% (17)	50% (2)	0,00%	
O. GRADO I	-	3,7% (1)	22,2% (2)	14,3% (6)	0,00%	0,00%	
O. GRADO II	-	0,00%	0%	2,4% (1)	0,00%	0,00%	
O. MÓRBIDA	-	0,00%	0%	0,00%	0	0,00%	0,969
<b>OBESIDAD</b>	-	51,9% (14)	55,6% (5)	56,8% (25)	50% (2)	0,00%	0,808
<b>EJERCICIO</b>							
AISLADO	-	18,5% (5)	70% (7)	17% (8)	0,00%	100% (2)	
HABITUAL	-	77,8% (21)	20% (2)	38,3% (18)	66,7% (4)	0,00%	
INTENSO	*	3,7% (1)	0%	2,1% (1)	0,00%	0,00%	
SEDENTARISMO	-	0,00%	10% (1)	42,6% (20)	33,3% (2)	0,00%	<0,001
<b>SEDENTARISMO</b>	-	17,9% (5)	80% (8)	58% (29)	33,3% (2)	100% (2)	<0,001
<b>FUMADOR</b>	33,3% (2)	35,7% (10)	66,7% (6)	37,5% (21)	57,1% (4)	50% (1)	0,553
<b>A. F.</b>							
C. COLON	-	71,4% (20)	80,8% (8)	12,5% (6)	0%	0%	
OTROS CC. DIGESTIVOS	-	17,9% (5)	10% (1)	4,2% (2)	0%	0%	
OTROS TIPOS DE CÁNCER	-	0%	0%	12,5% (6)	0%	0%	
SIN AA. FAMILIARES	-	10,7% (3)	10% (1)	70,8% (34)	100% (6)	100% (2)	<0,001

**Tabla 24.-** Resultados de variables referentes al estilo de vida de los pacientes y sus antecedentes familiares de cáncer. Se muestran medias con su desviación estándar (entre paréntesis) ó porcentajes con el número de pacientes correspondientes a ese porcentaje (entre paréntesis), según sea el caso.

SD: Pacientes con pólipos sin displasia; DL: pacientes con pólipos con displasia leve; Ca in situ: pacientes con CRC in situ; G1: pacientes con CRC con diferenciación histológica G1; G2: pacientes con CRC con diferenciación histológica G2; G3: pacientes con CRC con diferenciación histológica G3.

p valor: Significación estadística mediante técnicas paramétricas para igualdad de medias de Welch para variables cuantitativas y prueba de chi-cuadrado para variables cualitativas. Positiva si  $p < 0.005$

Como podemos comprobar los resultados no varían con esta nueva clasificación. Por lo tanto, podemos afirmar que es indiferente agrupar a los pacientes desde el punto de vista de la histología del tumor, o hacerlo desde un punto de vista que aúna criterios clínicos e histológicos.

En la siguiente tabla se muestran los resultados de las variables correspondientes a la ingesta alimentaria de los pacientes.

	<b>SD</b>	<b>DL</b>	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>p valor</b>
<b>FRUTAS</b>	375,33 (204,35)	395,82 (103,18)	272,84 (217,50)	370,51 (163,76)	320,65 (90,53)	0,172
<b>VEGETALES</b>	428,37 (234,74)	378,57 (354,10)	338,54 (333,22)	277,71 (152,95)	323,23 (283,36)	<b>0,021</b>
<b>ALCOHOL</b>	7,92 (23,16)	15,93 (34,48)	0,00 (8,18)	0,00 (38,39)	3,66 (7,32)	<b>0,003</b>
<b>CARNE ROJA</b>	59,16 (35,67)	72,43 (41,48)	57,05 (58,19)	91,12 (60,84)	45,21 (48,33)	0,1997
<b>VÍSCERAS</b>	0,30 (7,33)	0,00 (5,50)	0,00 (3,67)	5,65 (12,27)	0,00 (0,00)	<b>0,026</b>
<b>CARNE ROJA + VÍSCERAS</b>	67,27 (46,41)	80,80 (36,43)	59,79 (59,02)	108,36 (72,33)	45,21 (48,33)	0,156
<b>CARNE PROCESADA</b>	1,67 (8,11)	14,29 (42,86)	1,67 (36,37)	7,14 (33,93)	4,40 (5,48)	<b>0,001</b>
<b>PESCADO</b>	48,90 (40,07)	48,14 (41,18)	36,37 (56,60)	55,00 (83,22)	76,51 (84,45)	0,89
<b>E. GRASAS</b>	274,55 (338,43)	289,10 (355,45)	102,67 (144,40)	179,80 (141,59)	61,84 (98,00)	<b>&lt;0,001</b>
<b>E. TOTAL</b>	2298,74 (768,33)	2698,25 (1189,00)	1790,61 (902,11)	1959,67 (631,01)	1370,34 (617,13)	<b>0,001</b>
<b>E. NO GRASAS</b>	1959,36 (768,83)	2165,61 (866,36)	1612,25 (861,48)	1744,13 (623,93)	1308,50 (519,13)	<b>0,01</b>
<b>FIBRA TOTAL</b>	33,34 (16,60)	29,16 (14,35)	23,45 (12,83)	23,13 (5,37)	20,32 (1,56)	<b>0,001</b>
<b>GRASA TOTAL</b>	89,49 (52,20)	97,59 (66,14)	61,65 (35,76)	85,60 (54,68)	47,10 (45,89)	<b>0,005</b>
<b>AGP TOTAL</b>	15,12 (11,85)	20,53 (14,45)	9,81 (9,46)	13,91 (15,58)	7,29 (8,97)	<b>0,026</b>
<b>H. TOTAL</b>	18,84 (9,84)	16,97 (7,10)	14,24 (7,79)	16,09 (6,55)	12,75 (5,63)	<b>0,027</b>
<b>VC TOTAL</b>	346,60 (143,24)	256,78 (195,88)	254,22 (219,07)	176,91 (221,87)	254,70 (215,28)	0,061
<b>CA TOTAL</b>	6545,63 (3717,19)	5107,55 (3894,14)	4075,07 (4990,45)	2906,13 (3765,98)	4797,06 (4456,02)	<b>0,006</b>
<b>VE TOTAL</b>	7,78 (4,60)	8,05 (6,10)	4,73 (5,35)	5,38 (11,13)	4,85 (3,80)	<b>0,005</b>
<b>VD TOTAL</b>	5,55 (4,96)	6,26 (8,28)	5,18 (7,40)	7,26 (8,38)	3,00 (5,42)	0,821
<b>LUTEÍNA</b>	53,74 (48,24)	35,71 (37,63)	41,31 (54,59)	30,48 (68,13)	4,29 (8,57)	0,058
<b>LICOPENO</b>	57,74 (52,87)	66,07 (67,67)	48,21 (47,81)	61,70 (85,12)	28,57 (46,43)	<b>0,175</b>
<b>VA TOTAL</b>	1682,52 (997,22)	1479,47 (876,38)	1065,80 (1087,93)	1161,69 (1343,54)	1236,69 (12,19)	<b>0,02</b>

**Tabla 25.-** - Resultados de variables referentes a la alimentación de los pacientes. Se muestran medianas con su rango intercuartil (entre paréntesis).

SD: Pacientes con pólipos sin displasia; DL: pacientes con pólipos con displasia leve; Ca in situ: pacientes con CRC in situ; G1: pacientes con CRC con diferenciación histológica G1; G2: pacientes con CRC con diferenciación histológica G2; G3: pacientes con CRC con diferenciación histológica G3.

p valor: Significación estadística mediante técnicas no paramétricas de Kruskal Wallis. Positiva si  $p < 0.005$

Como podemos comprobar, los resultados no varían en gran medida al aplicar esta clasificación. El dato más llamativo sigue siendo que los individuos que padecen cáncer consumen menos cantidad de alimentos. Sin embargo, queremos mencionar que los pacientes con tumor diferenciado en G2 consumen mayor cantidad de vísceras que los demás grupos de forma significativa ( $p=0.026$ ). Tal vez esta clase de alimentación favorezca el desarrollo de este tipo de tumos aunque no hemos encontrado ninguna publicación en este sentido.

#### 5.4.4 VALORACIÓN GLOBAL DE LOS RESULTADOS REFERENTES A ESTILO DE VIDA Y ALIMENTACIÓN

Para valorar el estado oxidativo de los pacientes del estudio hemos generado la variable OBS que incluye datos, tratamientos, modo de vida y alimentación. De esta manera podemos analizar cómo varía el estado oxidativo en función de los estadios de la enfermedad. Es preciso comentar que en el estudio de esta variable se vio reducido el tamaño muestral debido a varias cuestiones. No nos fue posible conseguir datos sobre alimentación y estilo de vida de todos los pacientes ni pudimos contar con un grupo control. Estos incidentes hicieron que creáramos las variables OBSM1, ya explicada anteriormente y OBSM2 que nos han permitido valorar el estado oxidativo de los pacientes de forma que no hemos necesitado las variables comentadas y, por tanto, hemos podido ampliar el tamaño muestral ya que utilizamos en ellas datos del suero de los pacientes. La variable OBSM2, como ya hemos comentado en el apartado de material y métodos, incluye los datos de suero que contiene la variable OBSM1 junto con datos de tratamientos con AAS y AINEs y el del consumo de tabaco, resultando una variable mixta entre OBSM1 y OBS pero que nos permite contar con un número mayor de pacientes que OBS.

En la siguiente tabla mostramos los resultados de la variable OBS y OBSM2 variable dependiendo del estadio de los pacientes.

	Control	SD	DL	Ca in situ	I	II	III	IV	p valor
<b>OBS</b>	-	10,00 (3,00)	7,50 (3,25)	8,00 (4,00)	8,00 (4,25)	9,00 (4,00)	7,00 (4,25)	9,00 (4,25)	0,347
<b>OBSM2</b>	10,50 (1,29)	9,00 (2,08)	8,56 (1,42)	7,08 (3,65)	7,09 (2,88)	6,61 (3,23)	7,40 (2,76)	5,55 (2,70)	<b>0,001</b>

**Tabla 26.-** Resultados de variables OBS y OBSM2. Se muestran medianas con su rango intercuartil (entre paréntesis) en el caso de OBS y medias con su desviación estándar (entre paréntesis) en el caso de OBSM2. SD: Pacientes con pólipos sin displasia; DL: pacientes con pólipos con displasia leve; Ca in situ: pacientes con CRC in situ; I: pacientes con CRC en estadio I; II: pacientes con CRC en estadio II; III: pacientes con CRC en estadio III; IV: pacientes con CRC en estadio IV  
p valor: Significación estadística mediante técnicas no paramétricas de Kruskal Wallis para OBS e igualdad de medias de Welch para OBSM2. Positivas si  $p < 0.005$

	<i>CONTROL</i>	<i>PÓLIPO</i>	<i>TUMOR</i>	<i>p valor</i>
<b>OBS</b>	-	9,00 (3,50)	8,00 (4,00)	<b>0,046</b>
<b>OBSM2</b>	10,50 (1,29)	8,89 (1,92)	6,58 (3,03)	<b>&lt;0,001</b>

**Tabla 27.-** Resultados de variables OBS y OBSM2. Se muestran medianas con su rango intercuartil (entre paréntesis) en el caso de OBS y medias con su desviación estándar (entre paréntesis) en el caso de OBSM2.

p valor: Significación estadística mediante técnicas no paramétricas de Kruskal Wallis para OBS e igualdad de medias de Welch para OBSM2. Positivas si  $p < 0.005$

	<i>CONTROL</i>	<i>SD</i>	<i>DL</i>	<i>G1</i>	<i>G2</i>	<i>G3</i>	<i>p valor</i>
<b>OBS</b>	-	10,00 (3,00)	7,50 (3,25)	8,00 (4,00)	6,00 (2,00)	6,00 (0,00)	<b>0,02</b>
<b>OBSM2</b>	10,50 (1,29)	9,00 (2,08)	8,75 (1,39)	6,70 (3,08)	5,43 (2,51)	6,50 (3,54)	<b>0,016</b>

**Tabla 28.-** Resultados de variables OBS y OBSM2. Se muestran medianas con su rango intercuartil (entre paréntesis) en el caso de OBS y medias con su desviación estándar (entre paréntesis) en el caso de OBSM2. con su rango intercuartil (entre paréntesis).

SD: Pacientes con pólipos sin displasia; DL: pacientes con pólipos con displasia leve; Ca in situ: pacientes con CRC in situ; G1: pacientes con CRC con diferenciación histológica G1; G2: pacientes con CRC con diferenciación histológica G2; G3: pacientes con CRC con diferenciación histológica G3.

p valor: Significación estadística mediante técnicas no paramétricas de Kruskal Wallis para OBS e igualdad de medias de Welch para OBSM2. Positivas si  $p < 0.005$

Con respecto a esta variable OBS vemos que no resulta estadísticamente significativa al estudiarla en los diferentes grupos ( $p > 0.05$ ) en la clasificación por estadios. Sin embargo estas diferencias se hacen significativas al distribuir a los pacientes en grupos mayores (tabla 27) y al agruparlos por la diferenciación del tumor (tabla 28). Esto podría indicar que estados alimentarios y de estilo de vida que conlleven un estado oxidativo mayor pueden contribuir a una diferenciación tumoral G2 ó G3 ( $p = 0.02$ ).

Los valores de OBS presentan una buena correlación con los niveles séricos de licopeno ( $p = 0.013$ ,  $R = 0.254$ ),  $\beta$ -carotenos ( $p = 0.001$ ,  $R = 0.343$ ) y OBSM1 ( $p = 0.004$ ,  $R = 0.320$ ) lo que quiere decir que el estado de oxidación del individuo medido a partir de parámetros nutricionales y de estilo de vida guarda buena relación con el estado de oxidación medido a partir de variables séricas. Podemos decir que en nuestro estudio concuerda lo medido en suero y lo medido en los parámetros alimenticios y de estilo de vida del paciente lo que le confiere un grado de validez interna, de manera que podemos valorar el estado de oxidación de los sujetos participantes de forma que se tengan en cuenta varios parámetros. Así mismo esta variable OBS se relaciona de manera inversa con los valores séricos de MPO ( $p = 0.046$ ,  $R = -0.204$ ) lo cual es lógico ya que éste

parámetro actúa como marcador de oxidación tal y como habíamos comentado anteriormente. También hemos comprobado que esta variable OBS es mayor en mujeres que en varones ( $p=0.007$ ) lo que puede causar un factor de confusión para el estudio. Los pacientes con AF de cáncer tienen una OBS más disminuida lo que indica que pueden existir otros factores distintos al componente genético que estén contribuyendo a la susceptibilidad al cáncer, por ejemplo la alimentación que se lleva a cabo en el entorno familiar y los hábitos que se adquieren en el seno de una determinada familia. Estas correlaciones y asociaciones se comentan en este estudio por primera vez y por eso no se hace referencia a otras citas bibliográficas.

En cuanto a la variable OBS2 observamos como sí resulta estadísticamente significativa ( $p=0.001$ ) en cualquiera de las clasificaciones propuesta, siendo sus valores más elevados en el grupo control. Sus niveles van disminuyendo conforme avanza el estadio de la enfermedad lo que quiere decir que aumentan los niveles de oxidación. En líneas generales vemos como no existen grandes diferencias con respecto a la variable OBSM1 al introducir parámetros como los tratamientos con AINEs y el hábito de fumar. No obstante queremos comentar que esta variable es más elevada en las mujeres ( $p<0.001$ ) lo que podría estar modificando las diferencias que observamos en los diferentes grupos. También es más elevada en los pacientes que realizan ejercicio ( $p=0.016$ ) lo cual está en relación con el hecho que hemos comentado anteriormente en el que explicamos como el ejercicio habitual reduce los niveles de estrés oxidativo. Sin embargo, sus valores se encuentran disminuidos en la enfermedad psiquiátrica ( $p<0.001$ ), en la enfermedad renal ( $p=0.049$ ), y en la DM ( $p=0.007$ ) por lo que estas enfermedades también pueden estar modificando las diferencias entre los grupos debido a la comorbilidad. No obstante, hay que destacar que los pacientes fallecidos tienen niveles disminuidos de esta variable ( $p=0.039$ ) lo que indica mayor oxidación. Hay que destacar que esta variable es independiente de la edad ( $p>0.05$ ) por lo que no afecta a la distribución entre los grupos.

## 5.5 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DEL GEN DE APOLIPOPROTEÍNA D

En las tablas siguientes se muestran los resultados obtenidos dependiendo de la clasificación que hayamos usado para agrupar a los pacientes, tal y como hemos realizado en los apartados anteriores.

	CON-TROL	SD	DL	Ca in situ	I	II	III	IV	p valor
<b>APOD 1</b> RS1467282 C/C	83,3% (5)	71,4% (20)	81,8% (9)	84,6% (11)	70,0% (21)	84,8% (28)	91,3% (21)	81,5% (22)	0,838
C/T	16,7% (1)	25,0% (7)	18,2% (2)	15,4% (2)	30,0% (9)	15,2% (5)	8,7 (2)	18,5% (5)	
T/T	0%	3,6% (1)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<b>APOD 3</b> RS1568565 A/A	14,3% (2)	25,0% (7)	9,1% (1)	30,8% (4)	33,3% (10)	21,2% (7)	21,7% (5)	18,5% (5)	0,745
A/G	71,4% (10)	50% (14)	45,5% (5)	38,5% (5)	36,7% (11)	51,5% (17)	60,9% (14)	51,9% (14)	
G/G	14,3% (2)	25,0% (7)	45,5% (5)	30,8% (4)	30,0% (9)	27,3% (9)	17,4% (4)	29,6% (8)	

**Tabla 29.-** Resultados del análisis de polimorfismos del gen de la ApoD. Se muestran porcentajes con el número de pacientes correspondientes a ese porcentaje (entre paréntesis).

SD: Pacientes con pólipos sin displasia; DL: pacientes con pólipos con displasia leve; Ca in situ: pacientes con CRC in situ; I: pacientes con CRC en estadio I; II: pacientes con CRC en estadio II; III: pacientes con CRC en estadio III; IV: pacientes con CRC en estadio IV

p valor: Significación estadística mediante pruebas de Chi-Cuadrado. Positiva si  $p < 0.005$

	CONTROL	PÓLIPO	TUMOR	p valor
<b>APOD 1</b> RS1467282 C/C	83,3% (5)	74,4% (29)	81,5% (110)	0,463
C/T	16,7% (1)	23,1% (9)	18,5% (25)	
T/T	0%	2,6% (1)	0,00%	
<b>APOD 3</b> RS1568565 A/A	14,3% (2)	20,5% (8)	35,2% (34)	0,519
A/G	71,4% (10)	48,7% (19)	49,6% (67)	
G/G	14,3% (2)	30,8% (12)	25,2% (34)	

**Tabla 30.-** Resultados del análisis de polimorfismos del gen de la ApoD. Se muestran porcentajes con el número de pacientes correspondientes a ese porcentaje (entre paréntesis).

p valor: Significación estadística mediante pruebas de Chi-Cuadrado. Positiva si  $p < 0.005$

	CON-TROL	SD	DL	G1	G2	G3	p valor
<b>APOD 1</b> RS1467282 C/C	83,3% (5)	71,4% (20)	81,8% (9)	82,7% (81)	88,2% (15)	100% (7)	0,634
C/T	16,7% (1)	25,0% (7)	18,2% (2)	17,3% (17)	11,8% (2)	0%	
T/T	0%	3,6% (1)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<b>APOD 3</b> RS1568565 A/A	14,3% (2)	25,0% (7)	9,1% (1)	24,5% (24)	29,4% (5)	42,9% (3)	0,546
A/G	71,4% (10)	50% (14)	45,5% (5)	52,0% (51)	35,3% (6)	42,9% (3)	
G/G	14,3% (2)	25,0% (7)	45,5% (5)	23,5% (23)	35,3% (6)	14,3% (1)	

**Tabla 31.-** Resultados del análisis de polimorfismos del gen de la ApoD. Se muestran porcentajes con el número de pacientes correspondientes a ese porcentaje (entre paréntesis). SD: Pacientes con pólipos sin displasia; DL: pacientes con pólipos con displasia leve

p valor: Significación estadística mediante pruebas de Chi-Cuadrado. Positiva si  $p < 0.005$

Los resultados mostrados en las tablas anteriores indican que no existe ninguna relación entre los polimorfismos estudiados del gen de la ApoD y el cáncer colorectal.

Como habíamos comentado previamente en el capítulo de objetivos e introducción nuestra idea era indagar si alguno de estos polimorfismos tenía relación con la enfermedad estudiada de tal forma que pudiera predisponer a padecerla. Como hemos mostrado no hay ninguna evidencia que nos haga pensar en ello.

Únicamente podemos decir que dentro del polimorfismo al que hemos llamado ApoD 3 (RS1568565) los individuos homocigotos G/G parece que tienen mayores niveles de ApoD en el tejido normal periadyacente al tumor ( $p=0.039$ ). Dado que este polimorfismo se encuentra en un intrón del gen de ApoD es posible que estos individuos expresen mayores cantidades de proteína lo que les podría conferir una mayor protección frente al estrés oxidativo. No obstante harían falta más experimentos para corroborar esta hipótesis.

Además de los polimorfismos mostrados también hemos estudiado el polimorfismo al que hemos llamado ApoD 2 (RS5952). No se muestran los resultados ya que todos los individuos del estudio resultaron ser homocigotos C/C, excepto un individuo que fue heterocigoto C/T, sin conseguir demostrar que esto tuviera ninguna implicación en el estudio.

## 5.6 RESULTADOS DE SUPERVIVENCIA

Se ha realizado un estudio de supervivencia en el que hemos analizado todas las variables descritas anteriormente. Hay que tener en cuenta que nuestro estudio comenzó en el año 2008 y se han estado reclutando pacientes hasta diciembre de 2010 por lo que el tiempo que cada paciente lleva incluido en el estudio es diferente. Los análisis de supervivencia que se presentan datan de julio de 2011 que fue la última vez que se revisaron las historias de los pacientes. No obstante, estos datos pueden sufrir variaciones en los próximos años ya que tenemos previsto realizar una revisión anual de la situación de los pacientes.

Para las variables cuantitativas se han realizado quintiles y se ha estudiado la supervivencia dependiendo del quintil en el que se encuentren los pacientes.

En la siguiente tabla se muestran los resultados de supervivencia de las variables analizadas en suero dentro del estudio.

VARIABLE							p valor
E2	Quintiles	<10,67	10,67 - 13,9	13,9 - 21	21 - 28,066	>28,066	0,225
	Media de supervivencia (IC 95%)	799,054 (768,23 - 829,88)	736,49 (655,41 - 817,56)	781,82 (705,49 - 858,16)	694,17 (594,28 - 794,05)	771,86 (708,65 - 835,07)	
	Porcentaje de supervivencia	97,30%	88,60%	89,70%	78,80%	88,90%	
TG	Quintiles	<78,8	78,8 - 98,67	98,67 - 123,73	123,73 - 152,33	>152	0,911
	Media de supervivencia (IC 95%)	760,50 (708,13 - 812,87)	717,36 (637,92 - 796,79)	777,78 (697,74 - 857,81)	726,29 (656,86 - 795,72)	757,09 (675,30 - 838,87)	
	Porcentaje de supervivencia	91,70%	86,10%	88,90%	89,20%	88,60%	
CT	Quintiles	<162,334	162,334 - 190,934	190,934 - 207,53	207,53 - 236,13	>236,13	<b>0,037</b>
	Media de supervivencia (IC 95%)	640,57 (538,69 - 742,45)	815,37 (761,67 - 869,07)	739,08 (658,15 - 820,01)	790,76 (757,48 - 824,04)	762,58 (695,56 - 829,60)	
	Porcentaje de supervivencia	77,80%	91,70%	86,50%	97,10%	91,70%	
LDL	Quintiles	<95,172	95,172 - 116,306	116,306 - 136,37	136,37 - 162,362	>162,362	,8510
	Media de supervivencia (IC 95%)	731,42 (639,01 - 823,83)	757,24 (683,22 - 831,26)	796,18 (732,90 - 859,45)	727,89 (653,88 - 801,90)	763,08 (696,49 - 829,67)	
	Porcentaje de supervivencia	86,10%	88,90%	89,20%	88,60%	91,70%	
HDL	Quintiles	<34,4	34,4 - 41	41 - 48	48 - 58,602	>58,602	<b>&lt;0,001</b>
	Media de supervivencia (IC 95%)	588,66 (480,11 - 697,20)	776,09 (705,23 - 846,95)	784,87 (718,69 - 851,05)		773,18 (723,73 - 822,63)	
	Porcentaje de supervivencia	72,20%	87,20%	91,20%	100%	94,4%	
PT	Quintiles	<6,17	6,17 - 6,7	6,7 - 7	7 - 7,27	>7,27	0,144



	Media de supervivencia (IC 95%)	567,94 (492,54-643,34)	718,43 (654,13-782,72)	726,37 (661,35-791,38)	765,77 (684,96-846,57)		
	Porcentaje de supervivencia	81,10%	88,90%	89,50%	86,80%	100%	
PCR	Quintiles	<1	1,00 - 2	2,00 - 5,00	5,00 - 16,868	>16,868	<b>&lt;0,001</b>
	Media de supervivencia (IC 95%)	832,11 (807,11 - 857,11)	846,83 (816,12 - 877,55)	778,30 (734,50 - 822,11)	735,15 (660,72 - 809,58)	541,35 (427,91 - 654,79)	
	Porcentaje de supervivencia	98%	96,20%	97%	88,60%	63,90%	
CEA	Quintiles	<1	1,00 - 2	2,00 - 3	3,00 - 8	>8,00	<b>0,027</b>
	Media de supervivencia (IC 95%)	813,34 (764,84 - 861,84)	773,34 (731,09 - 815,59)	806,12 (744,84 - 867,40)	682,54 (590,95 - 774,53)	663,26 (565,55 - 760,97)	
	Porcentaje de supervivencia	91,10%	94,90%	96,20%	82,90%	80%	
CA 19.9	Quintiles	<2,592	2,592 - 5,286	5,286 - 10,736	10,736 - 19	>19	0,187
	Media de supervivencia (IC 95%)	770,37 (707,80 - 832,94)	852,56 (831,41 - 873,71)	765,88 (692,29 - 839,48)	523,48 (460,79 - 586,18)	711,63 (621,15 - 802,10)	
	Porcentaje de supervivencia	88,90%	97,10%	89,20%	83,80%	85,70%	
MPO	Quintiles	<8,97	8,97 - 11,74	11,74 - 14,93	14,93 - 20,17	>20,17	<b>0,004</b>
	Media de supervivencia (IC 95%)		789,10 (743,46 - 834,73)	748,08 (680,57 - 815,60)	709,45 (630,03 - 788,87)	604,66 (500,66 - 708,66)	
	Porcentaje de supervivencia	100%	94,30%	91,70%	86,10%	74,30%	
LDL OX	Quintiles	<60,559	60,559 - 73,6442	73,6442 - 83,732	83,732 - 98,7896	>98,7896	0,356
	Media de supervivencia (IC 95%)	706,21 (611,63 - 800,78)	826,40 (790,68 - 862,12)	801,44 (733,55 - 869,33)	712,02 (635,93 - 788,11)	743,56 (667,87 - 819,25)	
	Porcentaje de supervivencia	85,30%	97,10%	91,40%	82,90%	87,90%	
β-CAROT.	Quintiles	<120	120 - 174,2	174,2 - 253,2	253,2 - 380,4	>380,4	<b>0,044</b>
	Media de supervivencia (IC 95%)	692,14 (613,13 - 771,15)	737,32 (669,40 - 805,25)	685,24 (583,99 - 786,49)	777,54 (716,36 - 838,72)		
	Porcentaje de supervivencia	85,70%	88,20%	78,80%	94,30%	100%	
VIT A	Quintiles	<0,25	0,25 - 0,322	0,32 - 0,42	0,42 - 0,51	>0,51	0,236
	Media de supervivencia (IC 95%)	685,35 (607,47 - 763,23)	756,03 (685,11 - 826,95)	691,87 (604,77 - 778,97)	772,71 (715,54 - 829,88)	824,03 (783,58 - 864,48)	
	Porcentaje de supervivencia	82,10%	93,30%	84,20%	93,60%	96,90%	
VIT E	Quintiles	<10,36	10,36 - 12,1	12,1 - 14,08	14,08 - 16,24	>16,24	0,677
	Media de supervivencia (IC 95%)	702,73 (618,44 - 787,02)	709,95 (627,99 - 791,91)	765,69 (709,67 - 821,70)	782,43 (722,02 - 842,84)	773,71 (696,65 - 850,76)	
	Porcentaje de supervivencia	85,30%	86,10%	93,80%	91,40%	91,20%	
LICOPENO	Quintiles	<56,6	56,6 - 97,2	97,2 - 150	150 - 230,6	>230,6	0,587
	Media de supervivencia (IC 95%)	713,10 (622,07 - 804,13)	733,00 (649,87 - 816,13)	765,70 (701,83 - 829,57)	754,34 (688,09 - 820,59)	801,41 (733,80 - 801,78)	
	Porcentaje de supervivencia	82,40%	88,60%	91,20%	91,40%	93,90%	
OBSM1	Quintiles	<3,6	3,6 - 5	5,00 - 7	7,00 - 8	>8	<b>0,011</b>
	Media de supervivencia (IC 95%)	712,27 (633,18 - 791,36)	637,94 (547,06 - 728,83)	734,92 (665,67 - 804,16)			
	Porcentaje de supervivencia	84,80%	77,50%	89,70%	100,00%	100%	

**Tabla 32.-** Resultados de supervivencia de variables medidas en suero. Se muestran quintiles, media de supervivencia con intervalo de confianza al 95% (entre paréntesis) y porcentaje de supervivencia, excepto para los casos en los que la supervivencia es del 100%.  
p valor: Significación estadística mediante técnicas de Kaplan Meier. Positiva si  $p < 0.005$

Como podemos comprobar los individuos con niveles de colesterol total por debajo de 162 tienen menor supervivencia ( $p=0.0337$ ). Esto se debe a que la disminución de los niveles de colesterol funciona como un reactante de fase aguda ante fenómenos inflamatorios tal y como ocurre en el CRC, de hecho los individuos en fases más avanzadas tienen menores niveles de colesterol total. Esto se corresponde con lo publicado Cengiz O. et al. (219) que señalan al colesterol total como un buen marcador para evaluar la supervivencia en esta enfermedad.

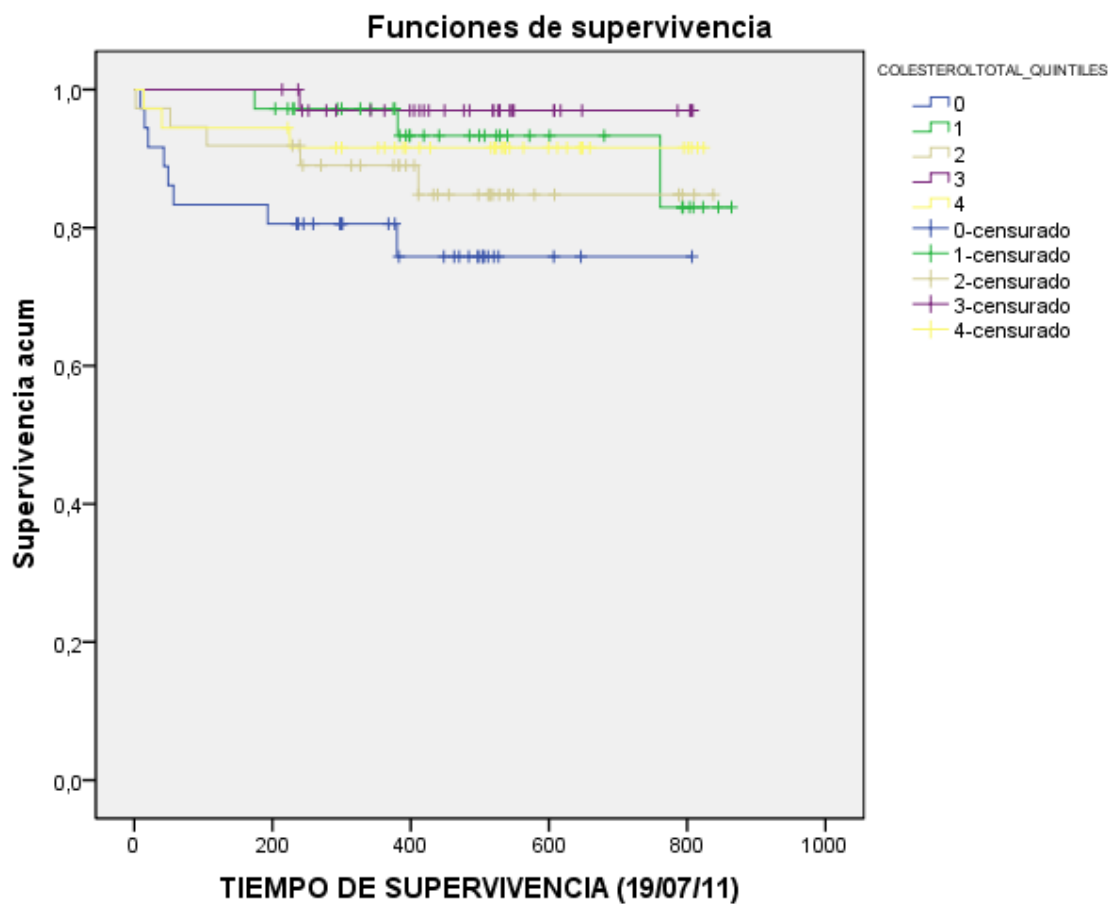


Gráfico 19. Supervivencia en función de los niveles de CT

Con respecto al colesterol HDL vemos como los individuos con niveles más elevados alcanza mayor supervivencia ( $p < 0.001$ ). Ya habíamos indicado previamente como otros autores (64–72) señalan los niveles bajos de HDL como un factor de riesgo para el CRC. También habíamos señalado en apartados anteriores como el HDL se encontraba disminuido en los estadios más avanzados. Hemos encontrado estudios previos que estudian el riesgo de padecer cáncer de colon en función de los niveles de HDL (64–72) y también trabajos en los que estudiaban la supervivencia en función de los niveles de colesterol (1), pero en ninguna de ellos había un aumento de la supervivencia estadísticamente significativa con niveles más elevados de HDL. Este estudio demuestra que los individuos con menores niveles de HDL presentan menor supervivencia en caso de presentar un CRC. Dada la importancia del HDL en esta enfermedad y en otras entidades de carácter cardiovascular debemos proponer programas de salud públicos orientados a mantener en la población unos niveles elevados de HDL como mecanismo preventivo, induciendo a un estilo de vida saludable y al consumo de una dieta que aumente estos niveles en suero.

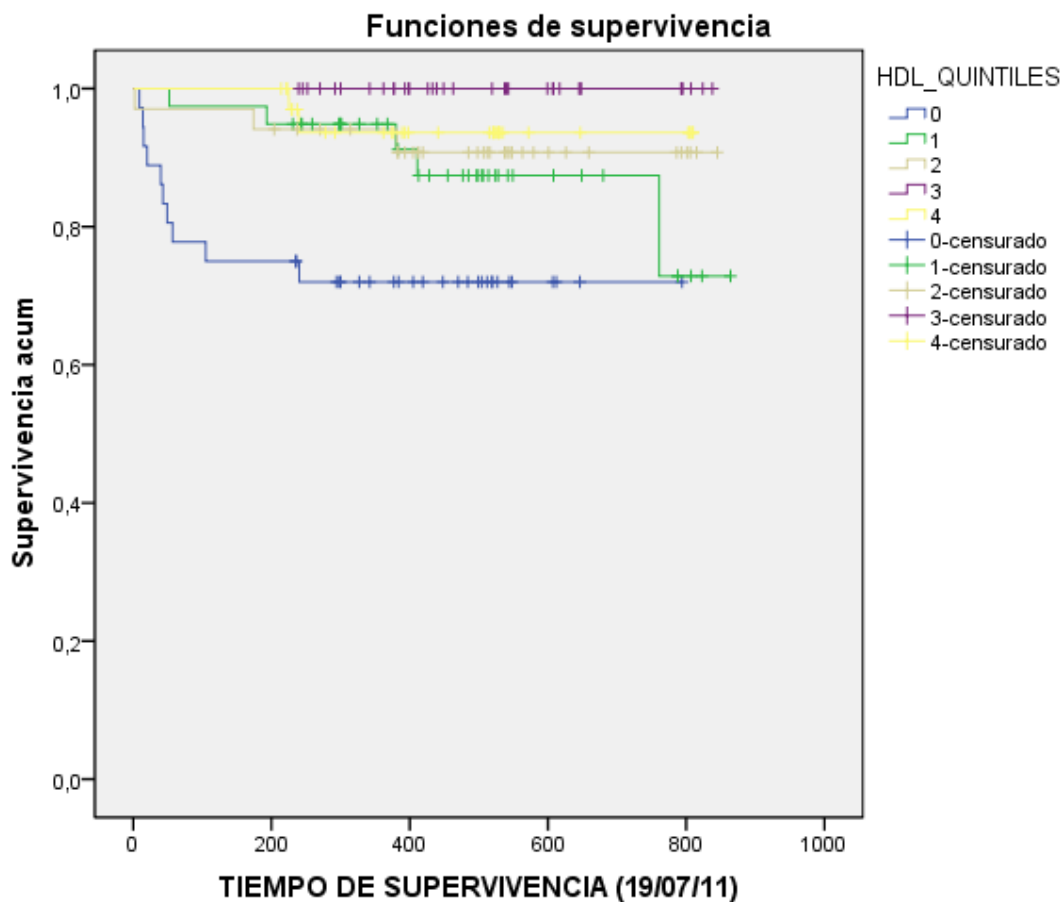
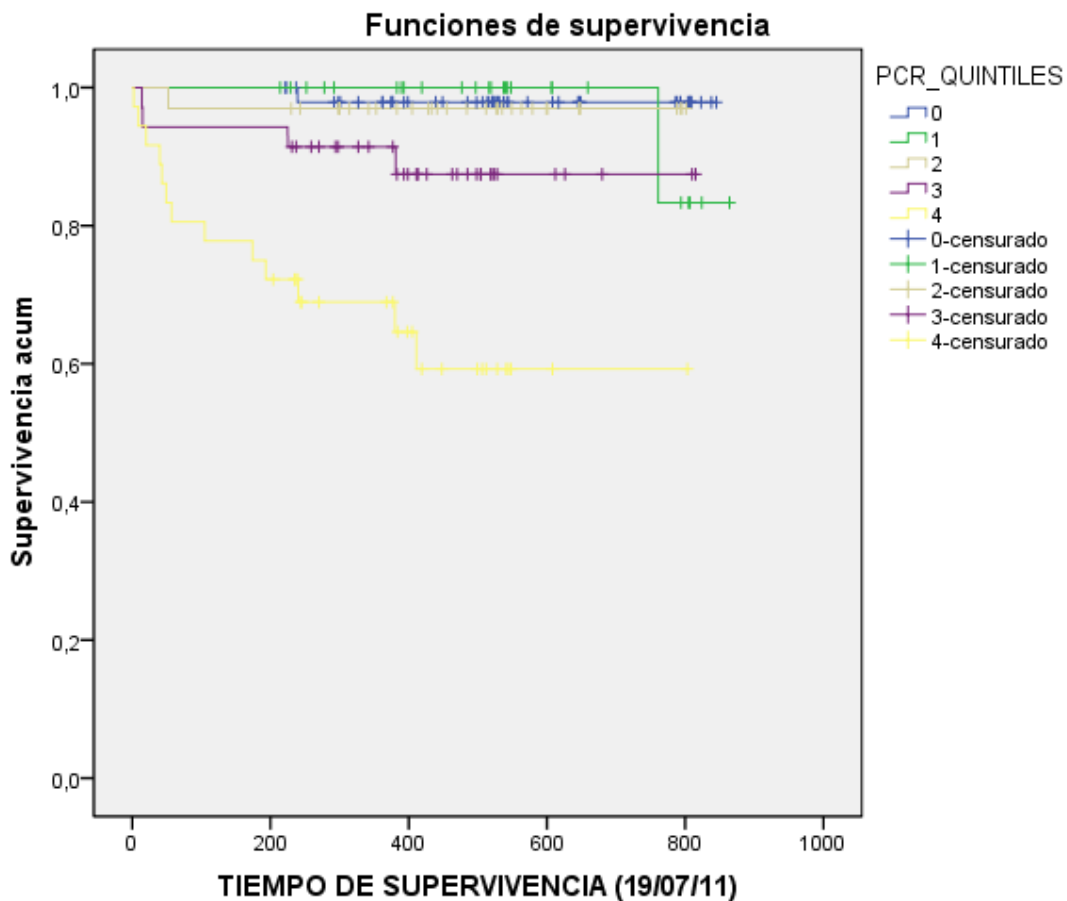


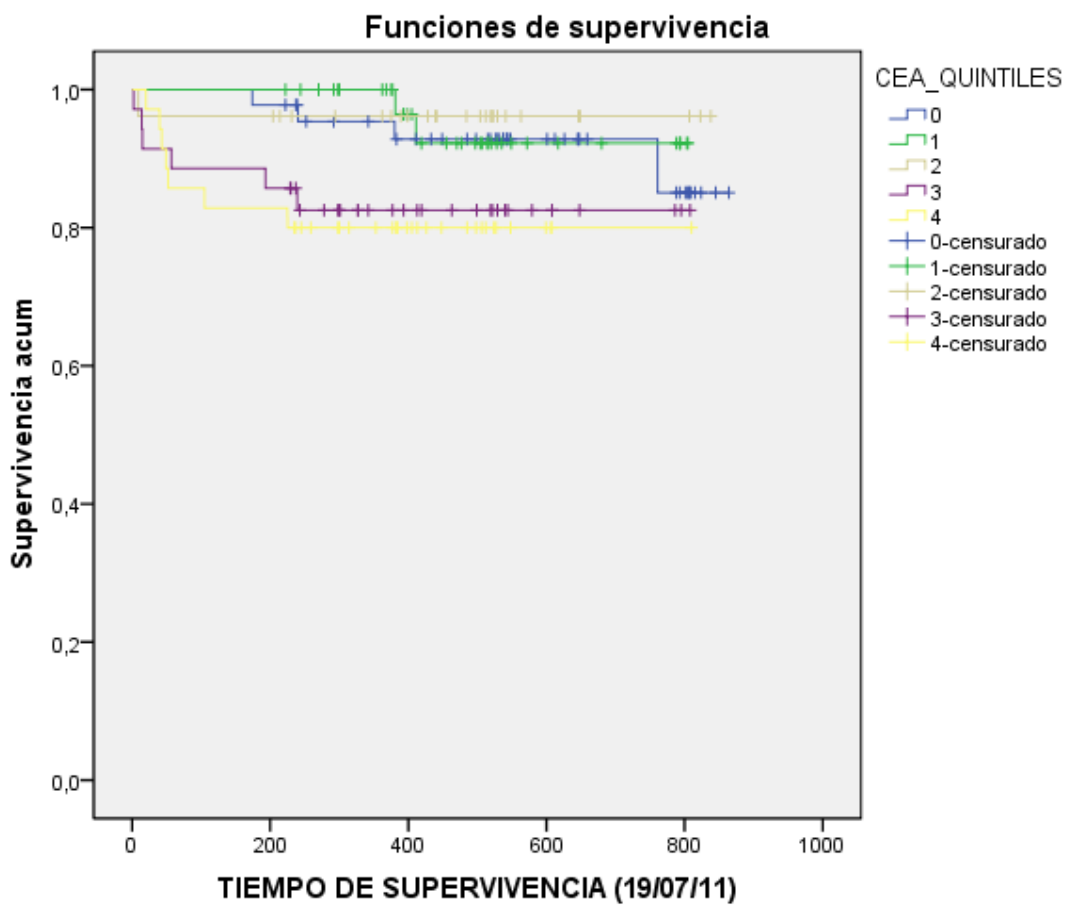
Gráfico 20. Supervivencia en función de los niveles de HDL

En el caso de los niveles de PCR vemos como los individuos con niveles más elevados tienen mayor mortalidad ( $p < 0.001$ ). Como ya hemos comentado la PCR es una proteína de fase aguda y se eleva en los estadios más avanzados de la enfermedad por lo que es lógico pensar que existe mayor número de individuos fallecidos con niveles altos de PCR. Estos resultados coinciden con los de otros autores que señalan a la PCR como un importante marcador en la supervivencia dentro de esta enfermedad (154,220–223). Estos autores también señalan a la PCR como un marcador pronóstico para estos enfermos asociando los niveles más elevados con una muerte temprana.



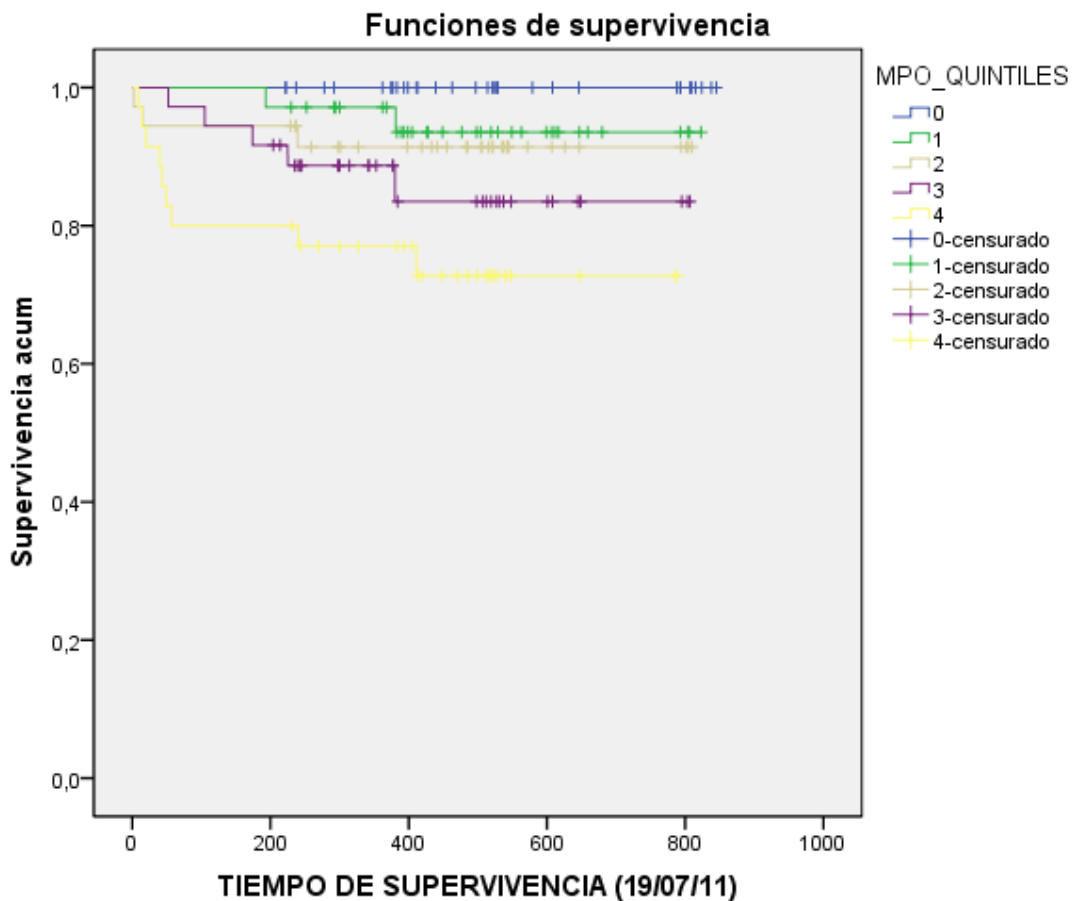
**Gráfico 21.** Supervivencia en función de los niveles de PCR

Otro marcador importante es el CEA en el que vemos como niveles elevados indican una disminución de la supervivencia ( $p=0.027$ ), tal y como indican otros estudios (224–228). De hecho, este marcador se utiliza de forma seriada para identificar pacientes con escasas posibilidades de supervivencia y para predecir recidivas.



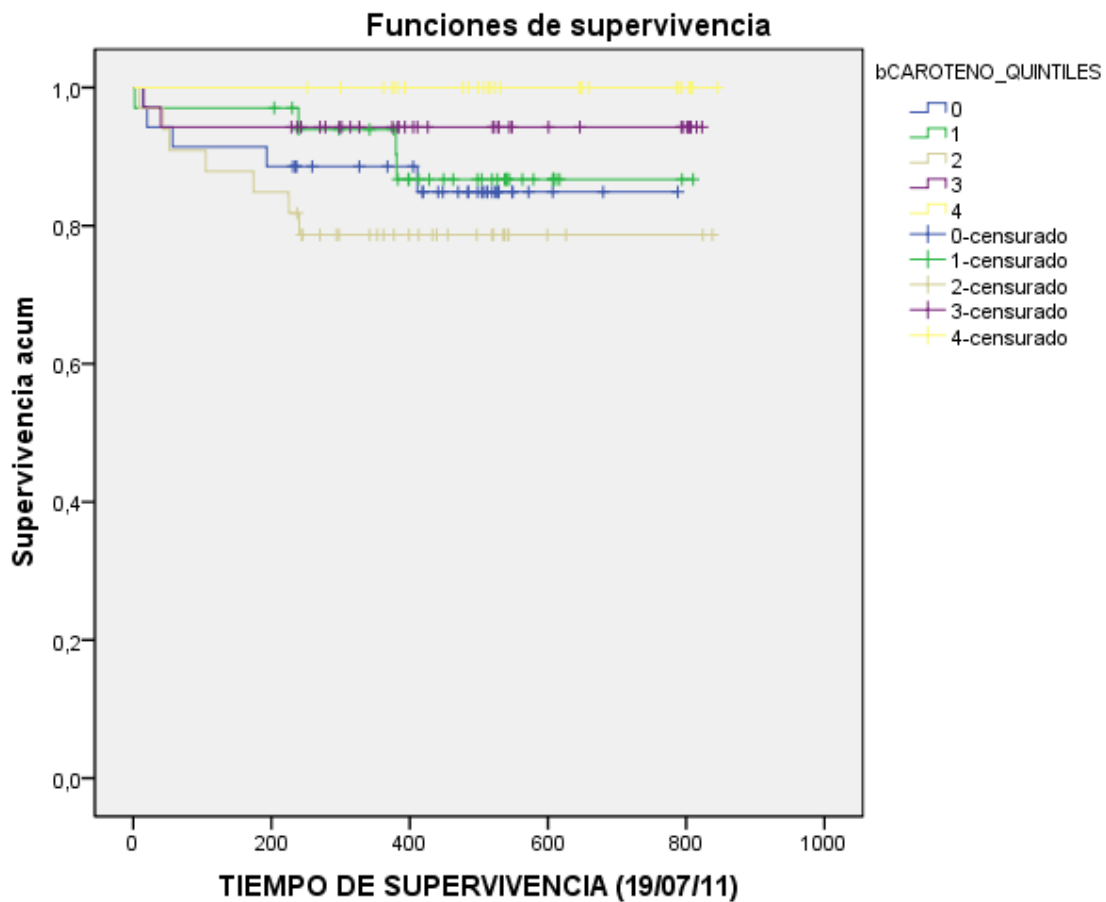
**Gráfico 22.** Supervivencia en función de los niveles de CEA

Como ya hemos comentado anteriormente este constituye el primer estudio en el que se evalúa la MPO en suero dentro del CRC. Y podemos confirmar que los niveles más altos indican menor supervivencia ( $p=0.004$ ) por lo que puede ser considerado como un buen marcador de supervivencia. Sin embargo el resultado va más allá ya que niveles elevados de MPO indican niveles elevados en plasma estrés oxidativo, por lo que podemos decir que individuos con altos niveles de estrés oxidativo tienen menores posibilidades de sobrevivir en esta enfermedad.



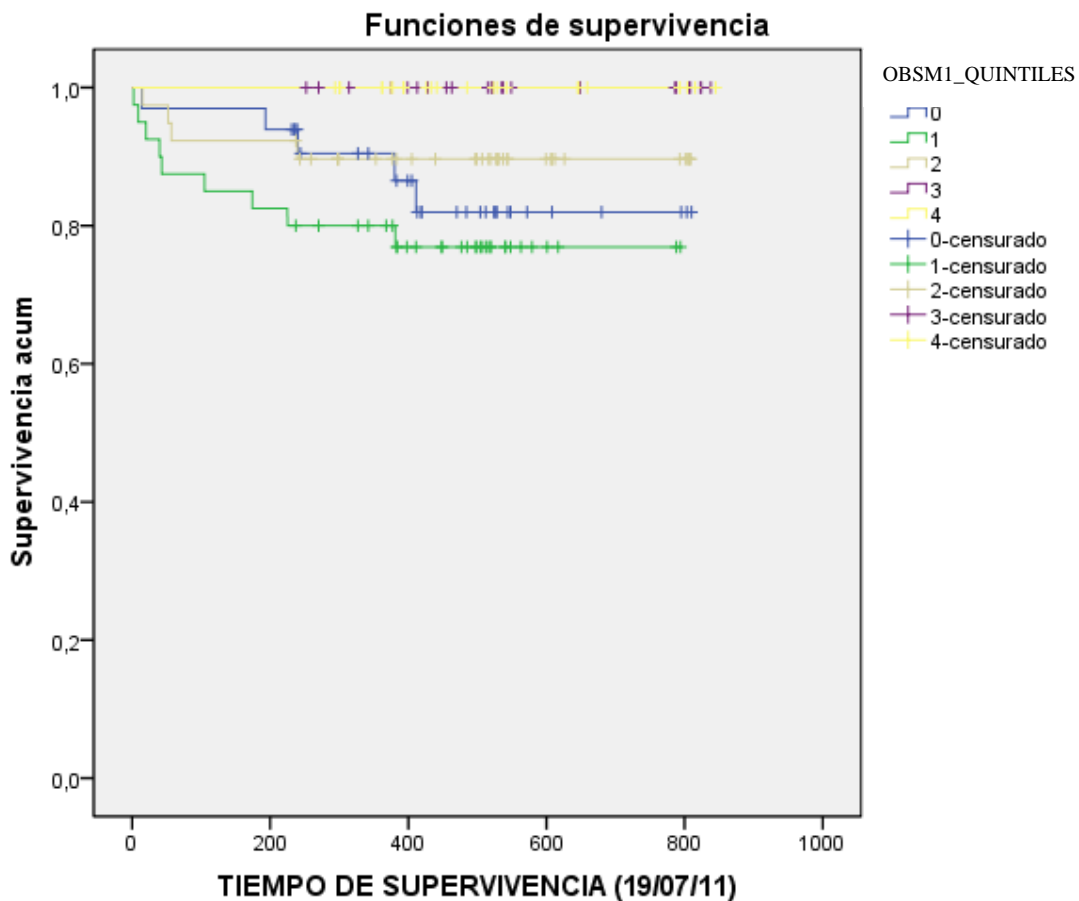
**Gráfico 23.** Supervivencia en función de los niveles de MPO

Cuando analizamos los resultados de los  $\beta$ -carotenos observamos como existe una mayor supervivencia cuanto más elevados son sus niveles en plasma ( $p=0.044$ ) tal y como comentan otros autores (161,229). En otros estudios a los que nos hemos referido anteriormente encuentran un aumento en la supervivencia en referencia a los niveles séricos de alfa carotenos pero no de beta carotenos (1). Este hecho viene a apoyar lo que hemos mencionado anteriormente proponiendo que los pacientes con unos niveles de antioxidantes elevados tienen una mayor supervivencia y por lo tanto un mejor pronóstico.



**Gráfico 24.** Supervivencia en función de los niveles de b-Carotenos

Con respecto a la variable OBSM1 vemos como aquellos individuos con valores más elevados tienen una mayor supervivencia ( $p=0.011$ ) lo que vuelve a refrendar lo anteriormente expuesto. Aquellos pacientes con un nivel elevado de antioxidantes en suero y/o bajo de pro-oxidantes tienen una mayor supervivencia. Este hecho confiere a esta variable una gran utilidad al poder ser utilizada para identificar dichos estados de forma objetiva ya que utiliza valores medidos en suero. Los pacientes identificados precozmente podrían ser beneficiarios de un tratamiento preventivo basado en una mejora de la alimentación el modo de vida y suplementos nutricionales para revertir su situación.



**Gráfico 25.** Supervivencia en función de los niveles de OBM1



En la siguiente tabla se muestran los resultados de supervivencia de las variables medidas en tejido.

		<4,42	4,42-6,67	6,67-11,79	11,79-38,92	>38,92	
TBARS TUMOR	Media de supervivencia (IC 95%)	584,40 (542,38-626,42)	453,45 (300,38-606,53)	526,73 (409,69-643,77)		532,27 (474,85-589,69)	0,236
	Porcentaje de supervivencia	90,9%	72,7%	81,8%	100%	90,9%	
TABARS NORMAL	Media de supervivencia (IC 95%)	572,27 (507,38)	476,70 (381,31-572,09)	313,63 (189,01-438,26)	9,94-30,98	543,10 (439,16-647,042)	0,068
	Porcentaje de supervivencia	90,90%	90%	60%	100%	90%	
TBARS COCIENTE	Media de supervivencia (IC 95%)	498,79 (365,62-631,96)	455,75 (283,71-627,79)	455,33 (350,62-560,05)	2,54-5,93	490,12 (420,68-559,56)	0,638
	Porcentaje de supervivencia	75,00%	75,00%	88,90%	100%	87,5%	
PN TUMOR	Media de supervivencia (IC 95%)	472,57 (309,90-635,24)	638,87 (448,22-829,52)	425,71 (304,28-547,15)	3,77-9,94	471, (331,27-610,72)	0,629
	Porcentaje de supervivencia	71,40%	75,00%	71,40%	100%	85,70%	
PN SANO	Media de supervivencia (IC 95%)		352 (177,17-526,83)	336,50 (147,24-525,76)	214,75 (28-401,50)		0,422
	Porcentaje de supervivencia	100,00%	75,00%	75,00%	50%	100%	
PN COCIENTE	Media de supervivencia (IC 95%)		28,33 (2,47-54,20)			214 (144,96-498,12)	0,053
	Porcentaje de supervivencia	100,00%	0,00%	100%	100%	50%	
IHQ APOD NORMAL	Media de supervivencia (IC 95%)	591,53 (525,98-657,07)	447,17 (302,54-591,80)	564,36 (506,29-622,42)	526,12 (388,85-663,40)		0,892
	Porcentaje de supervivencia	94,10%	83,30%	85,7%	87,5%	100%	
IHQ APOD TUMOR	Media de supervivencia (IC 95%)		540,62 (451,12-630,12)	567,79 (509,05-626,57)			0,573
	Porcentaje de supervivencia		85,70%	85,70%	100%	100%	
IHC APO D	Media de supervivencia (IC 95%)			600,12 (564,66-635,68)	508 (341,60-674,40)	461,25 (284,99-637,51)	0,264
	Porcentaje de supervivencia	100%		92%	83,3%	75%	

**Tabla 32.-** Resultados de supervivencia de variables medidas en suero. Se muestran quintiles, media de supervivencia con intervalo de confianza al 95% (entre paréntesis) y porcentaje de supervivencia, excepto para los casos en los que la supervivencia es del 100%.

p valor: Significación estadística mediante técnicas de Kaplan Meier. Positiva si  $p < 0.005$

Como podemos observar ninguna de ellas se relaciona con la supervivencia de forma estadísticamente significativa. No obstante, este hallazgo habrá que esperar a realizar nuevos análisis y a la revisión anual de la supervivencia de los pacientes.

En la siguiente tabla se muestran los resultados de supervivencia de las variables relacionadas con el estilo de vida, las enfermedades intercurrentes y los tratamientos.

OBSM2	Quintiles	<5		5,00 - 7		7,00 - 9		9,00 - 10		>10		0,007
	Media de supervivencia (IC 95%)	735,02 (654,79-815,26)		604,49 (465,61-743,38)		778,72 (720,57-836,87)						
	Porcentaje de supervivencia	89,70%		71,40%		96%		100%		100%		
ESTADIO		Control	SD	DL	Ca in situ	I	II	III	IV			0,002
	Media de supervivencia (IC 95%)			808,25 (781,52-834,98)		570,17 (509,66-630,68)	737,12 (667,88-806,36)	514,45 (440,83-588,06)	459,89 (367,24-552,54)			
	Porcentaje de supervivencia	100,00%	100,00%	90,90%	100,00%	89,70%	91,20%	78,30%	70,40%			
GRUPO DE ESTADIO		Control				Pólipo			Tumor			0,015
	Media de supervivencia (IC 95%)					858,28 (847,38-869,18)			708,28 (663,76-752,81)			
	Porcentaje de supervivencia	100%				97,40%			85,00%			
DIFERENCIACIÓN		Control	SD	DL	G1	G2	G3					0,260
	Media de supervivencia (IC 95%)			808,25 (781,52-834,98)	728,78 (680,69-776,87)	553,35 (458,77-647,93)	722,62 (578,93-866,32)					
	Porcentaje de supervivencia	100%	100%	90,00%	88,00%	88,20%	87,50%					
SEXO		Varón					Mujer					0,139
	Media de supervivencia (IC 95%)	735,08 (638,81-786,35)					814,90 (742,96-856,88)					
	Porcentaje de supervivencia	85,10%					93,70%					
AF		No Cánceres		Ca de colon		Otros Ca digestivos		Otros cánceres			0,106	
	Media de supervivencia (IC 95%)	718,87 (643,01-794,72)		823,86 (783,01-864,70)		838,25 (794,54-881,96)						
	Porcentaje de supervivencia	84,60%		97,10%		87,50%		100%				
EJERCICIO		E. Aislado		E. habitual		E. Intenso		Sedentarismo			0,006	
	Media de supervivencia (IC 95%)			805,86 (759,55-852,16)				630,02 (515,74-744,30)				
	Porcentaje de supervivencia	100,00%		93,90%		100%		75%				
SEDENTARISMO		Si					No					0,122
	Media de supervivencia (IC 95%)	762,58 (692,28-835,88)					807,77 (763,93 - 851,61)					
	Porcentaje de supervivencia	86,30%					94,80%					
GRADO DE OBESIDAD		Delgadez	Normal	Sobrepeso	Grado I	Grado II	Grado III	O. Mórbita				0,129
	Media de supervivencia (IC 95%)	252 (48,27-455,73)	791,38 (720,71-862,05)	794,03 (746,39-841,68)								
	Porcentaje de supervivencia	50,00%	89,70%	92,50%	100%	100%		100%				
OBESIDAD		Si					No					0,218

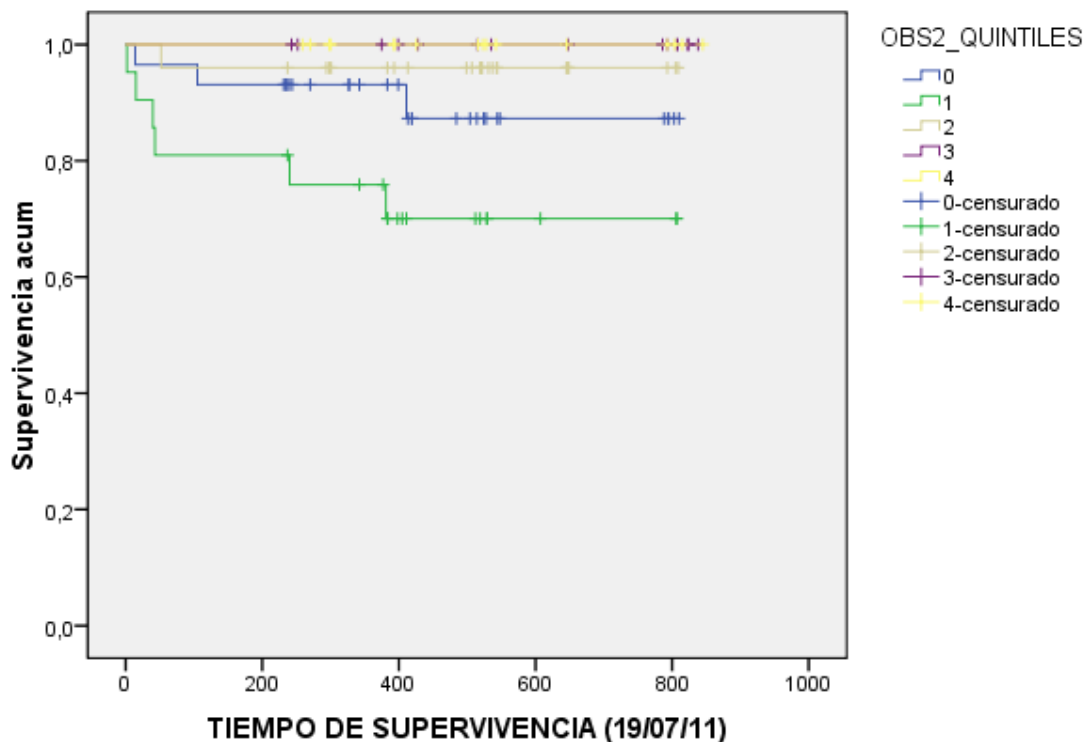
	Media de supervivencia (IC 95%)	803,06 (764,83 - 841,28)	776,18 (701,38 - 850,99)		
	Porcentaje de supervivencia		94,20%	87,80%	
FUMADOR			Si	No	
	Media de supervivencia (IC 95%)	746,85 (681,49-812,21)	788 (734,40-841,60)		0,869
	Porcentaje de supervivencia		88,90%	90,10%	
ENF. S. NERVIOSO			Si	No	
	Media de supervivencia (IC 95%)	303,17 (87,67 - 518,67)	791,48 (758,58-824,38)		<b>&lt;0,001</b>
	Porcentaje de supervivencia		50,00%	90,20%	
ENF PSIQUIÁTRICA			Si	No	
	Media de supervivencia (IC 95%)	468 (373,17-562,83)	780,20 (744,51-815,88)		0,93
	Porcentaje de supervivencia	90,00%	88,80%		
ENF CORONARIA			Si	No	
	Media de supervivencia (IC 95%)	418,81 (309,91-527,70)	788,38 (754,12-822,64)		0,077
	Porcentaje de supervivencia	75,00%	89,90%		
ATEROSCLEROSIS			Si	No	
	Media de supervivencia (IC 95%)	528,37 (281,26-775,49)	789,59 (755,88-823,30)		<b>0,007</b>
	Porcentaje de supervivencia	62,50%	90,10%		
ENF. RENAL			Si	No	
	Media de supervivencia (IC 95%)	749,54 (743,47-815,42)	779,45 (743,47-815,42)		0,962
	Porcentaje de supervivencia	90,90%	88,70%		
ENF. REUMÁTICA			Si	No	
	Media de supervivencia (IC 95%)	807 (699,07-914,93)	761,61 (726,08-797,14)		0,708
	Porcentaje de supervivencia	93,30%	88,50%		
HIPERTRIGLICERIDEMIA			Si	No	
	Media de supervivencia (IC 95%)		779,57 (744,53-814,62)		0,759
	Porcentaje de supervivencia	100%	88,80%		
ENF. ASMÁTICA			Si	No	
	Media de supervivencia (IC 95%)	603,00 (243,46-762,54)	790,67 (757,45-823,88)		<b>0,001</b>
	Porcentaje de supervivencia	62,50%	90,10%		
HIPERCOLESTEROLEMIA			Si	No	
	Media de supervivencia (IC 95%)		776,84 (740,73-812,95)		0,39
	Porcentaje de supervivencia	100%	88,40%		
DM			Si	No	
	Media de supervivencia (IC 95%)	631,79 (522,81-740,78)	799,92 (766,44-833,40)		<b>0,019</b>
	Porcentaje de supervivencia	75,00%	91,40%		
HTA			Si	No	
	Media de supervivencia (IC 95%)	742,39 (692,96-791,81)	771,79 (727,60-815,98)		0,574
	Porcentaje de supervivencia	91,50%	87,60%		
NEO PREVIA		Neo extracolónica	Neo de colon	Ausencia de neo previa	
	Media de supervivencia (IC 95%)	635,11 (522,71-747,51)	797,31 (762,54-832,07)		<b>0,017</b>
	Porcentaje de supervivencia	75,90%	100,00%	91%	

		Si	No	
AINE	Media de supervivencia (IC 95%)	658,52 (457,14-859,91)	784,68 (749,85-819,51)	0,19
	Porcentaje de supervivencia	77,80%	89,50%	
AAS	Media de supervivencia (IC 95%)	437,75 (325,45-550,05)	781,43 (746,22-816,34)	0,671
	Porcentaje de supervivencia	87,50%	89,00%	
ESTATINAS	Media de supervivencia (IC 95%)	698,90 (618,12-779,68)	789,36 (752,07-826,66)	0,26
	Porcentaje de supervivencia	84,60%	90,10%	
RT y/ó QT PREVIA A LA CGÍA.	Media de supervivencia (IC 95%)	590,99 (424,83-757,15)	791,01 (756,84-825,19)	0,034
	Porcentaje de supervivencia	66,70%	90,50%	

**Tabla 33.-** Resultados de supervivencia de variables relacionadas con el estilo de vida, las enfermedades intercurrentes y el tratamiento. Se muestran quintiles, media de supervivencia con intervalo de confianza al 95% (entre paréntesis) y/ó porcentaje de supervivencia según el caso, excepto para los casos en los que la supervivencia es del 100%.

p valor: Significación estadística mediante técnicas de Kaplan Meier. Positiva si  $p < 0.005$

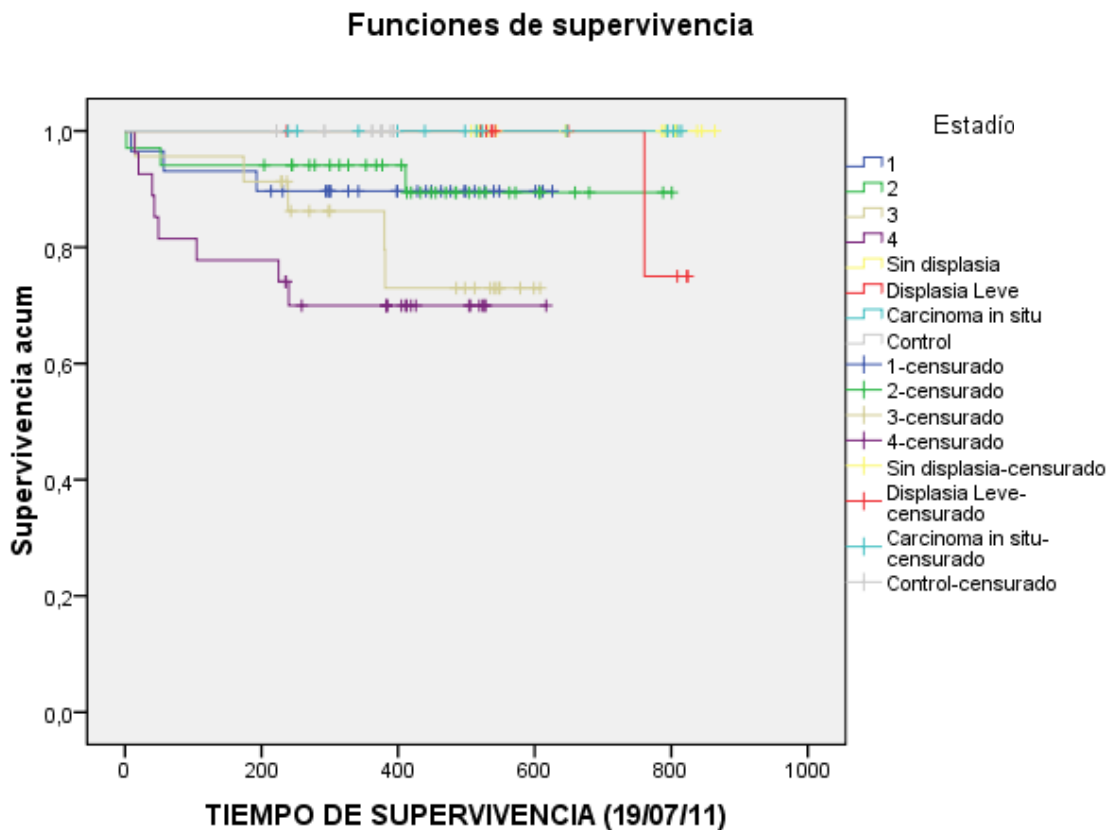
### Funciones de supervivencia



**Gráfico 27.** Supervivencia en función de los niveles de OBSM2

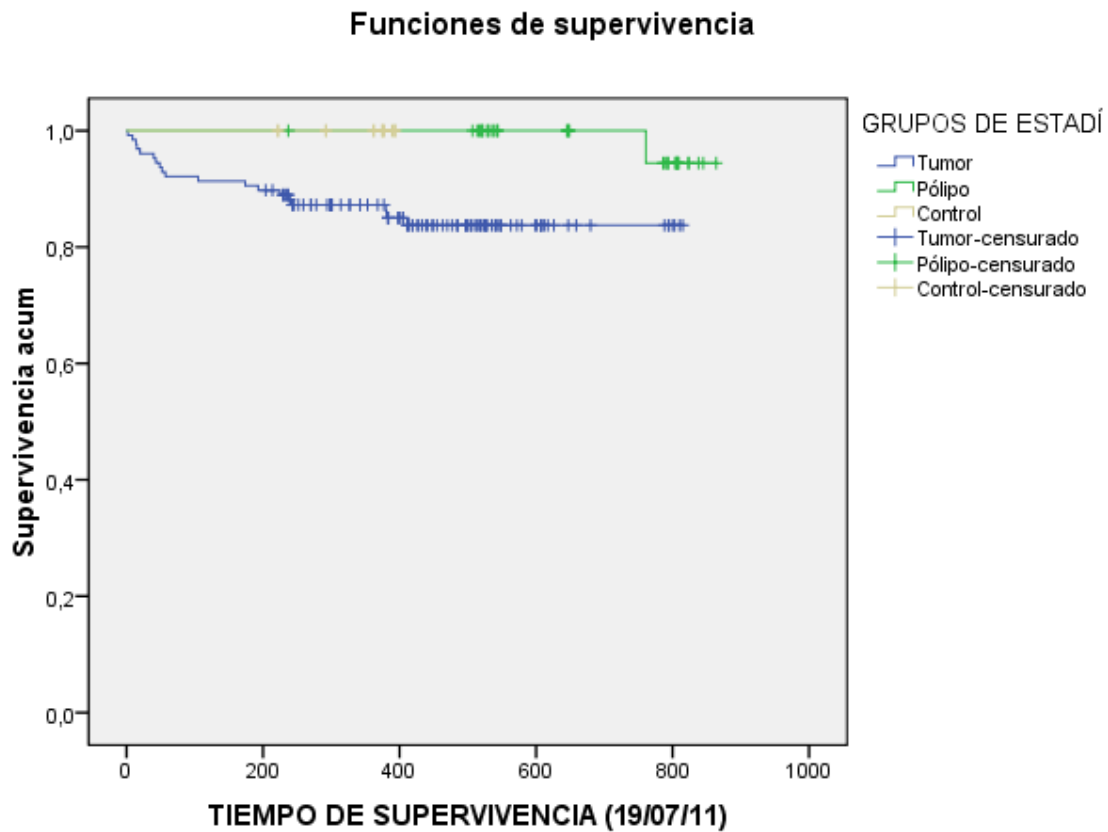
De la misma manera podemos observar como la variable OBSM2 también se relaciona con la supervivencia, de tal forma que, los individuos con valores elevados consiguen una mayor supervivencia ( $p=0.007$ ). Este resultado coincide en líneas generales con lo que hemos comentado para la variable anterior, OBSM1, con la salvedad que en este caso incluimos en la variable parámetros de suero pero también de estilo de vida como son el tabaquismo y los tratamientos con AINEs y AAS. De esta manera identificando a estos pacientes podremos administrarle un tratamiento preventivo como el que hemos comentado anteriormente y además aconsejarles sobre la posibilidad de añadir estos dos fármacos a dicho tratamiento.

Como podemos comprobar la supervivencia va disminuyendo conforme avanza el estadio, siendo mínima en el estadio IV ( $p=0.002$ ), tal y como ya han descrito otros autores (230–233). Cuanto mayor es el estadio más avanzada está la enfermedad y por tanto menor es la probabilidad de supervivencia a pesar de un correcto tratamiento.



**Gráfico 27.** Supervivencia en función del Estadio tumoral

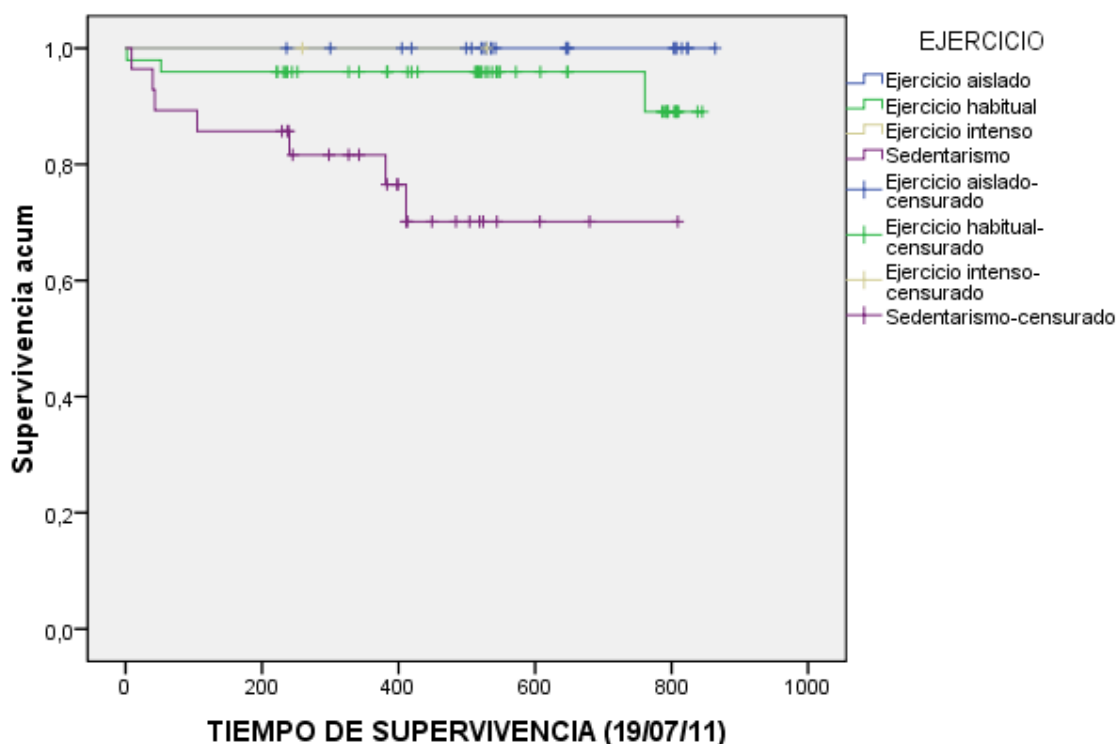
Lo mismo sucede si clasificamos a los pacientes en grupos mayores, donde la menor supervivencia se alcanza en el grupo de individuos que padecen CRC (p=0.015).



**Gráfico 28.** Supervivencia en función del grupo de estadío

Al analizar los datos referentes al ejercicio realizado por los pacientes comprobamos que aquellos que realizan ejercicio, aunque sea de forma aislada, tienen mayor supervivencia que aquellos que no realizan ningún tipo de ejercicio (p=0.006), tal y como también comentan otros autores (234,235). Esto indica de nuevo que aquellos individuos que mantienen un estilo de vida saludable aumentan las posibilidades de supervivencia en esta enfermedad. Por lo tanto, habrá que llevar a cabo programas dirigidos a incrementar estas actividades como por ejemplo realizar ejercicio, aunque sea de forma aislada en aquellas personas que por sus características no toleren el ejercicio habitual.

## Funciones de supervivencia

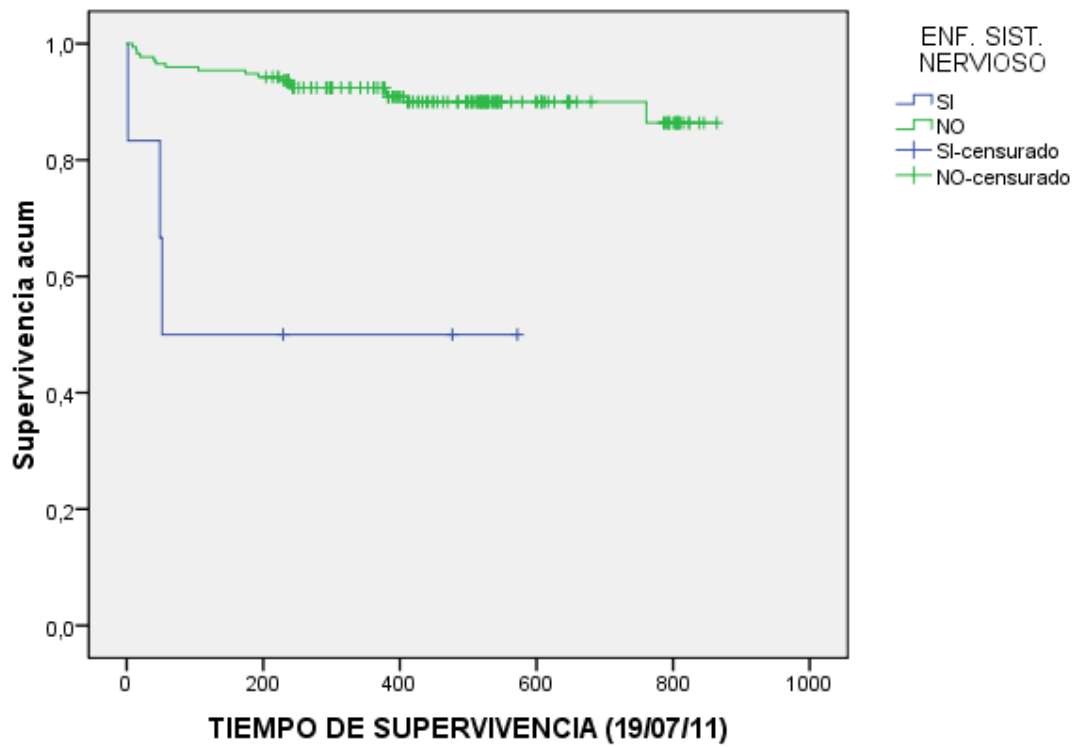


**Gráfico 29.** Supervivencia en función de los niveles de ejercicio

Al analizar las enfermedades intercurrentes hemos visto que aquellos enfermos que padecen alguna enfermedad del SNC tienen menor supervivencia ( $p < 0.001$ ). Esto puede indicar que la causa sea la comorbilidad, por lo que puede estar actuando como factor de confusión a la hora de analizar la supervivencia en otras variables.

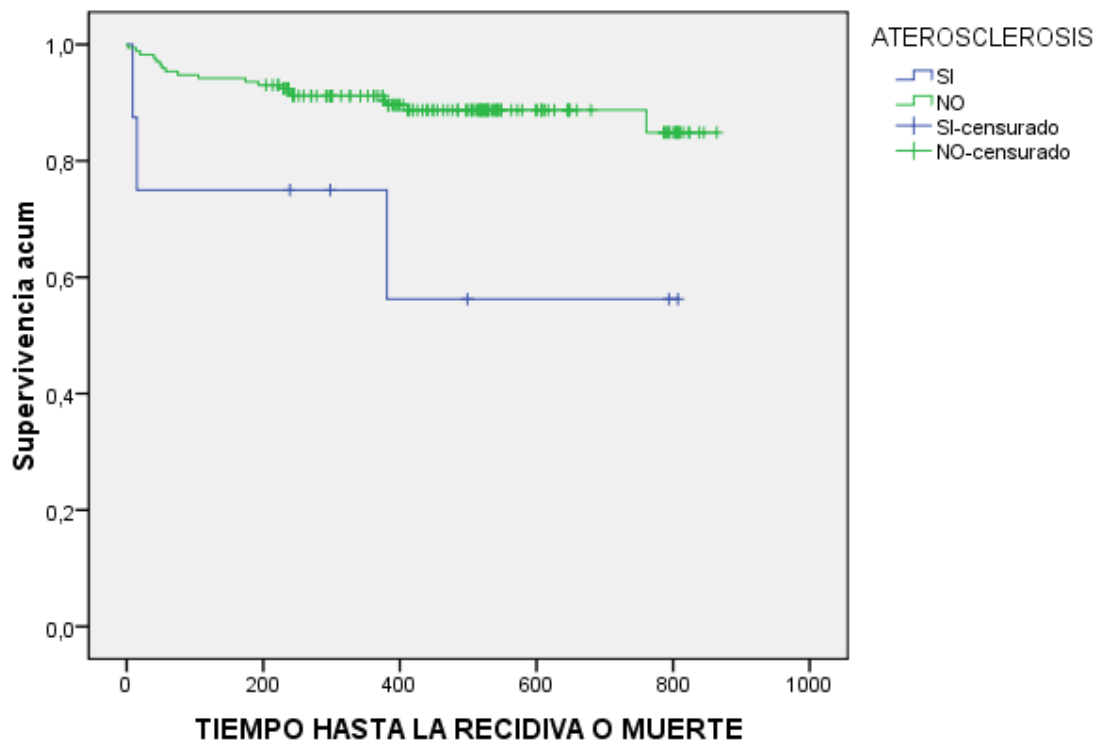
Hemos visto que los individuos que padecen aterosclerosis presentan una menor supervivencia ( $p = 0.016$ ). Igual que en el caso anterior puede existir un factor de comorbilidad que predisponga a una menor supervivencia. En relación a esto último existen evidencias que indican cómo puede existir un mayor riesgo de padecer CRC en individuos con aterosclerosis (236). En este estudio se muestra la asociación existente entre la inflamación producida en esta enfermedad y la génesis del CRC. Nosotros pensamos que tal vez el estrés oxidativo que se produce de forma generalizada en la aterosclerosis induzca un mayor estrés oxidativo en la mucosa intestinal que lleve a la aparición de cambios displásicos y el subsiguiente cáncer. Para confirmar esta hipótesis harían falta nuevos estudios en la mucosa intestinal de sujetos con aterosclerosis.

### Funciones de supervivencia



**Gráfico 30.** Supervivencia en función del padecimiento de enfermedades de sistema nervioso.

### Funciones de supervivencia



**Gráfico 31.** Supervivencia en función de aterosclerosis



Otra enfermedad que puede estar influyendo en los datos de supervivencia es la DM ya que aquellos pacientes que padecen esta dolencia obtienen menor supervivencia en el estudio ( $p=0.034$ ), algo que coincide con lo publicado por otros autores (237,238). Otros estudios señalan que la supervivencia en pacientes diabéticos con CRC es mayor en los tratados con metformina (algo que no hemos considerado en nuestro estudio) (239,240). Todos estos estudios señalan que el descenso en la supervivencia es independiente de otros factores, lo que sugiere un mecanismo conjunto entre DM y CRC. En esta línea se ha comprobado en estudios anteriores que los individuos con DM tienen un mayor riesgo de padecer CRC (241,242). El mecanismo no está claro pero podría deberse a un aumento de los AGEs que se producen en la DM y cuyo Receptos (RAGE) se ha implicado en la génesis de la aterosclerosis y la microangiopatía diabética. Esta interacción AGE-RAGE induce el factor de crecimiento beta y se ha demostrado que aumenta la migración y el crecimiento de células del melanoma. Pues bien, este estudio señala que este puede ser el mecanismo por el que en estos pacientes sea más fácil desarrollar CRC. Hay que tener en cuenta que los AGE también son un metabolito que se produce como consecuencia del estrés oxidativo por lo que podría ser que los sujetos con un balance oxidativo mayor tuvieran mayor tendencia a desarrollar DM (sobre todo de tipo 2) y a la vez CRC.

### Funciones de supervivencia

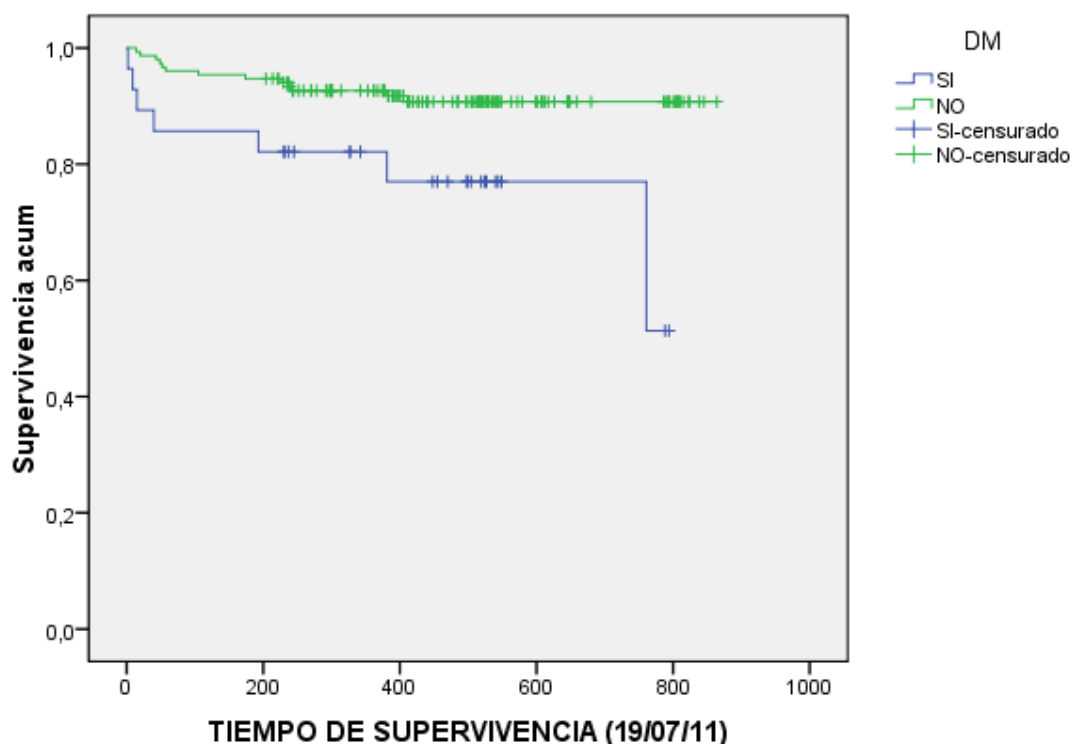
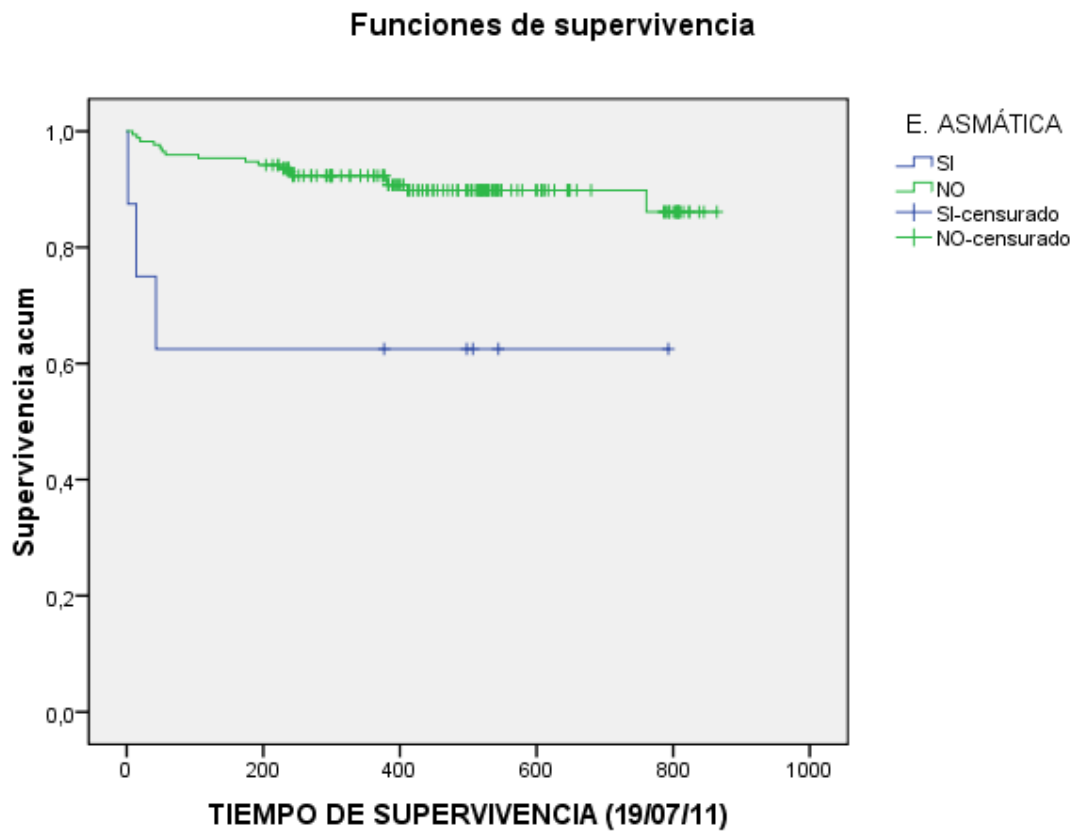


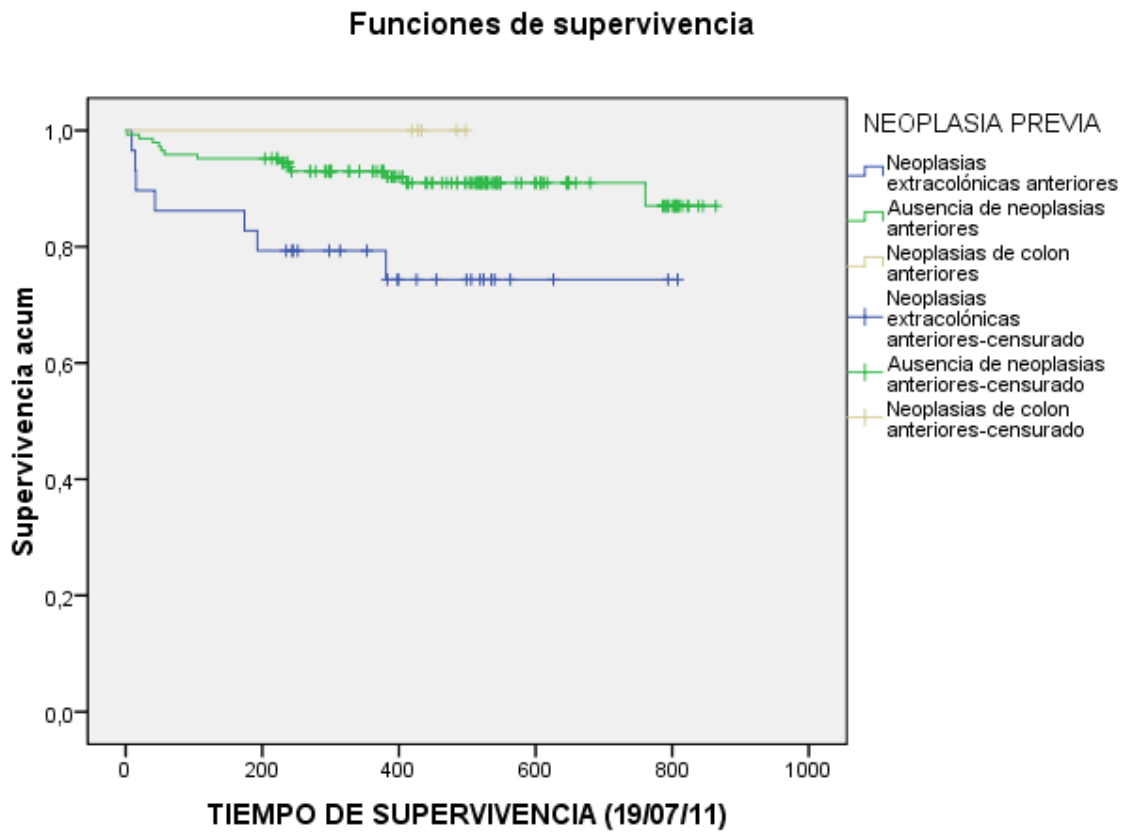
Gráfico 32. Supervivencia en función de DM

En relación a los individuos que padecen asma vemos como existe una disminución de la supervivencia ( $p < 0.001$ ), lo que contrasta con otros estudios que indican la existencia de una relación inversa entre la mortalidad y la historia de enfermedades alérgicas (incluida el asma) (243). Nosotros pensamos en cambio que los individuos con asma tienen un aumento del balance oxidativo (244) lo que podría constituir un mecanismo común para el asma y el CRC, al igual que ocurre en la DM o en la aterosclerosis como previamente hemos comentado (245). No obstante serían necesarios nuevos estudios para corroborar esta hipótesis, ya que existen trabajos que opinan lo contrario (246).



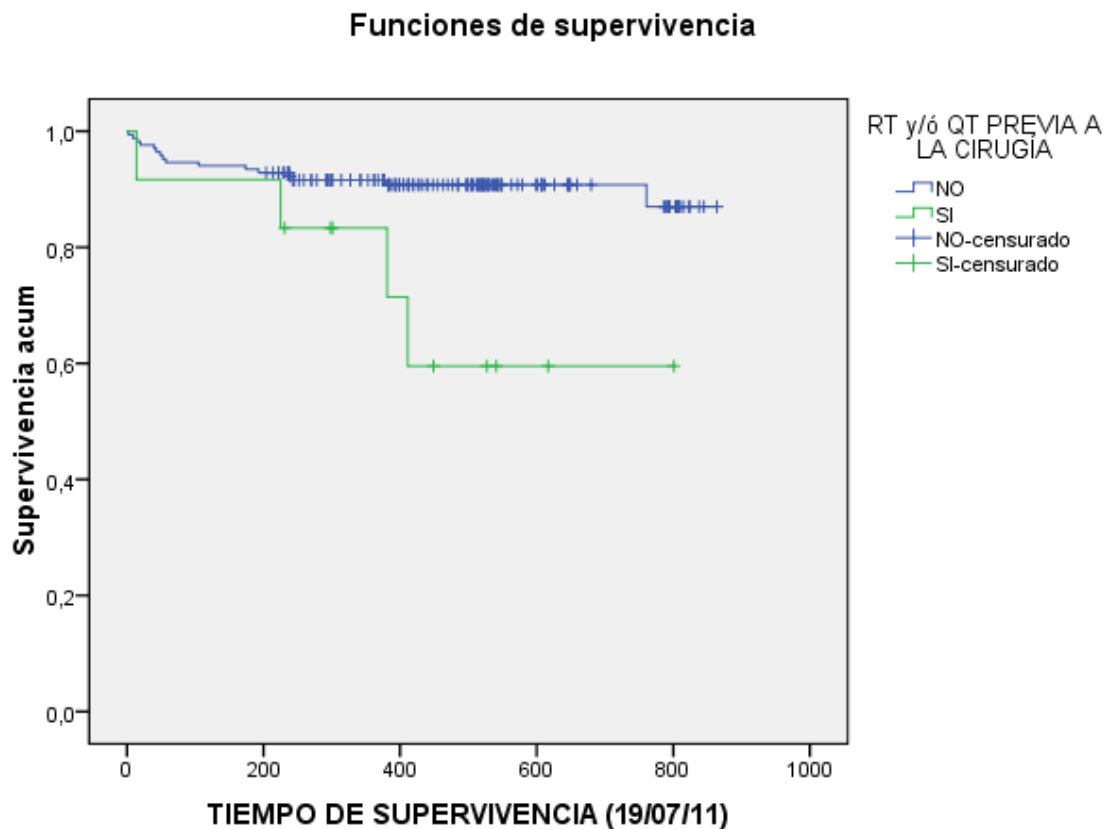
**Gráfico 33.** Supervivencia en función de enfermedad asmática

Adicionalmente, hemos comprobado que los individuos con una neoplasia extracolónica previa al CRC tienen menor supervivencia ( $p=0.007$ ) que los que tienen una neoplasia de colon previa o los que tienen ausencia de neoplasias anteriores. Esto podría indicar que estos individuos con neoplasias previas y que no constituyen una metástasis a nivel intestinal tienen factores ya sea genéticos o de modo de vida que faciliten la aparición del cáncer. Puede ser que estos factores conlleven un aumento del estrés oxidativo que a su vez favorezca la aparición de la enfermedad.



**Gráfico 34.** Supervivencia en función de la existencia de neoplasia previa

Como podemos comprobar la supervivencia es menor en los sujetos sometidos a QT y/ó RT ( $p=0.034$ ). Esto no quiere decir que el tratamiento coadyuvante reduzca la supervivencia. Hay que tener en cuenta que los pacientes tratados con estas terapias tienen en su mayor parte carcinomas no resecables y por lo tanto la comparación no es válida con el resto de pacientes del estudio. Es decir que el tratamiento coadyuvante aumenta la supervivencia de estos pacientes frente a no recibir tratamiento. Pero, no obstante, a pesar de recibir tratamiento coadyuvante la supervivencia sigue siendo inferior a la de los pacientes con carcinomas resecables que no necesitan este tratamiento tal y como comentan Hacker U. et al. (247).



**Gráfico 35.** Supervivencia en función de tratamiento adyuvante previo a la cirugía

En la siguiente tabla se muestran los resultados de supervivencia de las variables relacionadas con la alimentación de los pacientes.

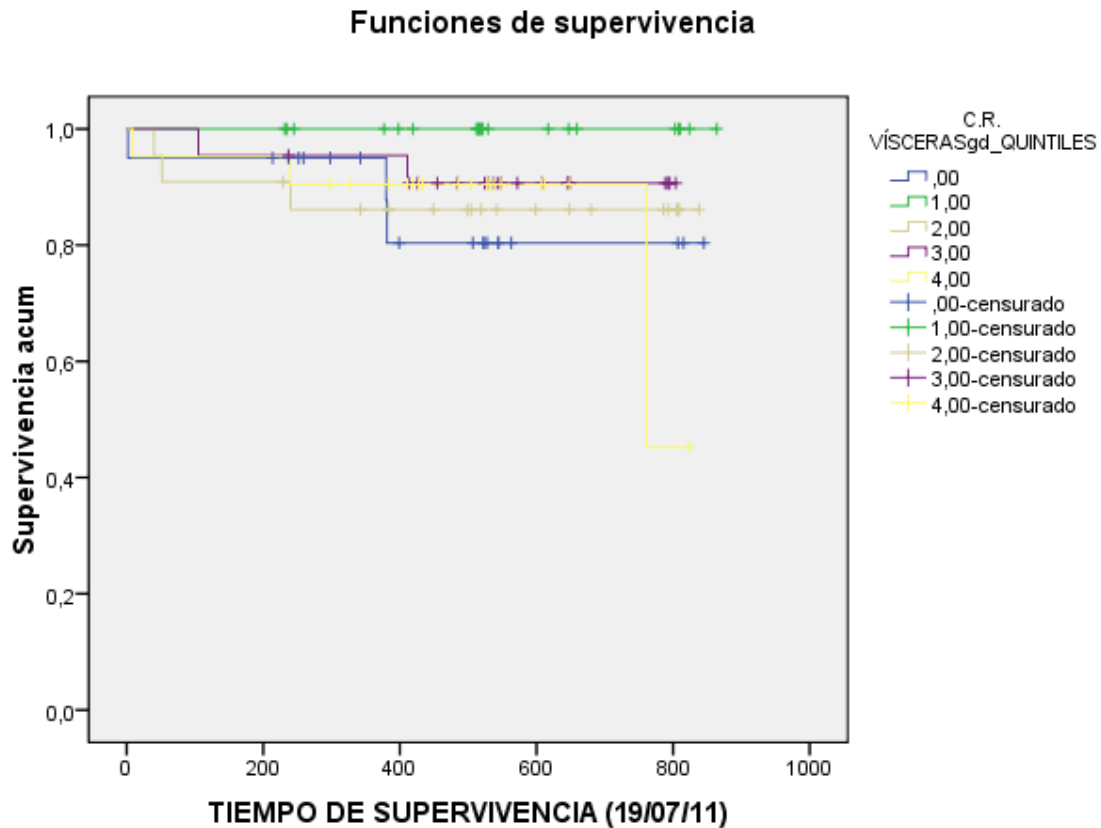
OBS		<6,00	6,00-8,00	8,00-9,20	9,20-11,00	>11,00	
	Media de supervivencia (IC 95%)	761,07 (710,21-811,93)	804,69 (715,94-893,45)	751,25 (641-861,50)	722,93 (602,14-843,74)		0,35
	Porcentaje de supervivencia	95,20%	89,50%	91,7%	81,3%	100%	
FRUTAS		<187,54	187,54-272,22	272,22-370,65	370,65-460,68	>460,68	
	Media de supervivencia (IC 95%)	792,10 (748,43-835,78)	718,18 (625,14-810,64)	736,58 (622,70-850,46)	792,045 (696,87-887,22)	786,75 (732,18-841,33)	0,661
	Porcentaje de supervivencia	95,20%	85,70%	86,40%	90,90%	90,5%	
VEGETALES		<209,18	209,18-316,37	316,37-402,94	402,94-574,86	>574,86	
	Media de supervivencia (IC 95%)	688,72 (568,73-808,72)	835,69 (781,96-889,42)	747,86 (652,10-843,63)	772,14 (705,37-838,90)	800,87 (732,32-869,42)	0,329
	Porcentaje de supervivencia	81,00%	95,20%	86,4%	95,5%	90,5%	
ALCOHOL		<0,00	0,00-0,03	0,03-7,31	7,31-22,79	>22,79	
	Media de supervivencia (IC 95%)	761,728 (652,89-870,56)	732,71 (637,42-828,01)	788,13 (722,04-854,22)		735,51 (637,41-833,60)	0,510
	Porcentaje de supervivencia	87,00%	90,50%	90,90%	100%	81,00%	
CARNE ROJA		<36,58	36,58-53,79	53,79-74,64	74,64-100,88	>100,88	
	Media de supervivencia (IC 95%)	729,30 (610,96-847,65)		789,64 (691,37-887,91)	788,12 (721,67-854,57)	695,67 (587,16-804,18)	0,370
	Porcentaje de supervivencia	85,00%	100%	90,90%	90,90%	81,0%	
VÍSCERAS		<0,00	0,00-0,00	0,00-0,90	0,90-7,33	>7,33	
	Media de supervivencia (IC 95%)		840,52 (808,36-872,69)		736,76 (503,62-786,05)	792,97 (752,48-833,47)	0,017
	Porcentaje de supervivencia		96,80%		81,50%	76,50%	
CARNE ROJA MÁS VÍSCERAS		<38,58	38,58-55,29	55,29-78,60	78,60-107,68	>107,68	
	Media de supervivencia (IC 95%)	734,96 (621,29-848,64)		737,38 (630,96-843,82)	753,47 (684,33-822,61)	728,38 (634,70-822,06)	0,467
	Porcentaje de supervivencia	85,00%	100%	86,40%	90,90%	85,70%	
CARNE PROCESADA		<0,00	0,00-1,67	1,67-3,33	3,33-14,29	>14,29	
	Media de supervivencia (IC 95%)	712,58 (602,90-822,26)	773,05 (723,60-822,51)		803,86 (765,08-842,65)	738,94 (616,71-861,16)	0,148
	Porcentaje de supervivencia	80,00%	93,30%	100%	96,80%	81,80%	
PESCADO		<21,98	21,98-34,61	34,61-52,70	52,70-102,86	>102,86	
	Media de supervivencia (IC 95%)	706,81 (593,30-820,32)	759,97 (676,74-843,21)	790,47 (693,26-887,67)	776,96 (734,30-819,62)	782,30 (704,55-860,05)	0,671
	Porcentaje de supervivencia	85,70%	87,00%	90,00%	91,30%	95,00%	
E. GRASAS		<89,90	89,90-102,74	102,74-234,30	234,30-359,60	>359,60	
	Media de supervivencia (IC 95%)	724,85 (628,86-820,83)	564,70 (495,74-633,67)	752,09 (674,37-829,81)	829,28 (763,15-895,42)	786,87 (728,29-845,44)	0,880
	Porcentaje de supervivencia	88,50%	88,20%	91,70%	95,00%	85,00%	

E. TOTAL		<1370,75	1370,75-1791,07	1791,07-2233,24	2233,24-2674,22	>2674,22	0.557
	Media de supervivencia (IC 95%)	610,33 (543,76-676,91)	748,90 (660,37-837,44)		738,77 (633,48-844,06)	754,52 (667,89-841,16)	
	Porcentaje de supervivencia	90,50%	90,50%	100%	86,40%	81,00%	
E. NO GRASAS		<1242,90	1242,90-1612,99	1612,99-1938,94	1938,94-2343,70	>2343,70	0.901
	Media de supervivencia (IC 95%)	609,07 (541,40-676,73)	748,90 (660,37-837,44)	834,23 (777,31-891,17)	740,54 (648,76-832,33)	754,52 (667,89-841,16)	
	Porcentaje de supervivencia	90,50%	90,50%	95,50%	90,90%	81,00%	
FIBRA TOTAL		<19,50	19,50-23,85	23,85-29,09	29,09-37,04	>37,04	0.930
	Media de supervivencia (IC 95%)	749 (661,00-837)	802,86 (718,22-887,10)	777,10 (720,07-834,14)	753,84 (657,29-850,40)	745,91 (651,79-840,04)	
	Porcentaje de supervivencia	90,50%	90,90%	95,20%	86,40%	85,70%	
GRASA TOTAL		<44,11	44,11-61,94	61,94-86,21	86,21-113,10	>113,10	0.070
	Media de supervivencia (IC 95%)		687,74 (550,28-825,19)	774,61 (710,60-838,62)	771,40 (683,62-859,19)	792,74 (734,96-850,51)	
	Porcentaje de supervivencia	100%	76,20%	95,70%	90,50%	85,70%	
AGP TOTAL		<7,71	7,71-10,22	10,22-16,24	16,24-21,77	>21,77	0.753
	Media de supervivencia (IC 95%)	627,71 (567,87-687,57)	770,89 (671,24-870,54)	787,24 (716,92-857,55)	704,43 (609,39-799,48)	782,44 (699,56-865,32)	
	Porcentaje de supervivencia	95,20%	86,40%	95,20%	81,00%	90,90%	
HIERRO TOTAL		<11,13	11,13-14,88	14,88-17,25	17,25-21,50	>21,50	0.109
	Media de supervivencia (IC 95%)	725,80 (631,16-820,43)		550,31 (462,58-638,03)	765,41 (659,77-871,05)	837,36 (823,09-851,63)	
	Porcentaje de supervivencia	87,00%	100%	80,00%	86,40%	95,20%	
VC TOTAL		<150,03	150,03-250,84	250,84-336,14	336,14-432,53	>432,53	0.400
	Media de supervivencia (IC 95%)	758,68 (685,84-831,52)	719,33 (608,10-830,56)		752,04 (674,99-829,10)	729,47 (617,59-841,35)	
	Porcentaje de supervivencia	90,50%	58,70%	100%	90,90%	81,00%	
β-CAROTENOS TOTALES		<2454,78	2454,78-4171,72	4171,72-5508,95	5508,95-7359,09	>7359,09	0.442
	Media de supervivencia (IC 95%)	709,79 (598,57-821,02)	772,03 (704,45-839,61)	764,34 (659,53-869,16)	731,86 (643,41-820,31)		
	Porcentaje de supervivencia	85,70%	90,50%	86,40%	86,40%	100%	
V. E. TOTAL		<4,01	4,01-5,27	5,27-7,70	7,70-10,71	>10,71	0.271
	Media de supervivencia (IC 95%)	689,42 (576,93-801,91)	821,25 (739,58-902,92)		742,97 (655,61-830,33)	768,24 (681,10-854,48)	
	Porcentaje de supervivencia	81,80%	95,00%	100%	86,40%	85,70%	
V.D. TOTAL		<1,68	1,68-4,83	4,83-6,27	6,27-10,17	>10,17	0.228
	Media de supervivencia (IC 95%)	768,22 (675,26-861,17)	712,92 (597,14-828,69)	739,43 (647,65-831,21)	831 (805,95-856,05)	786 (715,15-856,85)	
	Porcentaje de supervivencia	90,50%	77,30%	90,50%	95,20%	95,50%	
A. RICOS EN LUTEINA		<11,34	11,34-35,71	35,71-44,29	44,29-75,43	>75,43	0.228
	Media de supervivencia (IC 95%)	731,12 (611,62-850,61)	730,39 (649,93-810,84)	758,12 (667,27-848,98)	755,95 (685,17-826,73)		
	Porcentaje de supervivencia	81,00%	82,10%	93,80%	95,00%	100%	
A. RIIOS EN LICOPENO		<32,86	32,86-48,21	48,21-65,43	65,43-102,24	>102,24	0.733
	Media de supervivencia (IC 95%)	771,86 (698,90-844,81)	835,63 (781,32-889,95)	739,51 (647,37-831,66)	742,90 (644,82-840,98)	752,09 (658,56-845,63)	

	Porcentaje de supervivencia	95,20%	95,70%	85,70%	81,00%	90,50%	
VA TOTAL		<746,92	746,92-1135,27	1135,27-1564,49	1564,49-2109,29	>2109,29	
	Media de supervivencia (IC 95%)	748,68 (660,15-837,18)	825,33 (751,37-899,29)	783,98 (712,55-855,41)	771,13 (687,20-854,45)	735,40 (635,28-835,51)	0.788
	Porcentaje de supervivencia	90,50%	95,20%	90,50%	88,90%	84,00%	

**Tabla 34.-** Resultados de supervivencia de variables relacionadas con la alimentación. Se muestran quintiles, media de supervivencia con intervalo de confianza al 95% (entre paréntesis) y porcentaje de supervivencia, excepto para los casos en los que la supervivencia es del 100%.  
p valor: Significación estadística mediante técnicas de Kaplan Meier. Positiva si  $p < 0.005$

Como podemos observar solamente la ingesta de vísceras se relaciona de forma estadísticamente significativa con la supervivencia ( $p=0.017$ ). En cualquier caso, hay que tener en cuenta el escaso tiempo transcurrido el momento del análisis y el escaso de número de pacientes por grupo. También tenemos que considerar el hecho de que un cuestionario de frecuencias alimentarias no es un método objetivo y que está sujeto a numerosas variables subjetivas del paciente tal y como comentan Goodman et al. (26,89).



**Gráfico 36.** Supervivencia en función de la cantidad ingerida de vísceras

En lo referente a la ingesta de vísceras se puede observar que los pacientes que ingieren mayor cantidad de vísceras alcanzan una menor supervivencia de manera estadísticamente significativa ( $p=0.017$ ). Con respecto a este hecho tenemos que decir que no hemos encontrado estudios previos referentes a la disminución de la supervivencia con la ingesta de vísceras en la literatura científica, por lo que pudiera constituir una medida importante en la prevención del CRC en un futuro.

En la siguiente tabla se muestran los resultados de supervivencia relacionados con los polimorfismos de ApoD.

APOD1		C/C	C/T	T/T	0,473
	Media de supervivencia (IC 95%)	783,86 (745,44-822,28)	688,19 (591,60-784,77)		
	Porcentaje de supervivencia	89,10%	84,40%	100%	
APOD3		A/A	A/G	G/G	0,745
	Media de supervivencia (IC 95%)	754,67 (696,00-813,34)	762,88 (709,58-816,78)	767,74 (703,38-832,09)	
	Porcentaje de supervivencia	92,50%	86,70%	89,60%	

**Tabla 35.-** Resultados de supervivencia ApoD. Se muestran medias de supervivencia con intervalo de confianza al 95% (entre paréntesis) y porcentaje de supervivencia, excepto para los casos en los que la supervivencia es del 100%.

p valor: Significación estadística mediante técnicas de Kaplan Meier. Positiva si  $p<0.005$

Como podemos observar ninguno de estos polimorfismos se asocia con una mayor supervivencia en nuestro estudio. Debemos comentar que no hay estudios previos que indiquen lo contrario. No obstante hay que ser cautos y esperar a las revisiones anuales de supervivencia.



### ***5.6.1 VALORACIÓN GLOBAL DE LOS RESULTADOS REFERENTES A LOS ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA***

Como se ha comentado ampliamente en el apartado anterior, parecen existir ciertas variables que condicionan la supervivencia en los enfermos con CRC incluidos en nuestro estudio. Como hemos mencionado la mayoría de los resultados presentados coinciden con estudios previos aunque en otras ocasiones hemos presentado resultados novedosos como en el caso de la MPO.

Podemos decir que aquellos sujetos con estados oxidativos más elevados tienen una menor supervivencia, al igual que aquellos cuyos niveles de marcadores inflamatorios permanecen elevados. Por ello pensamos que, tanto inflamación como oxidación juegan un papel importante dentro de esta enfermedad. Lo mismo sucede con los niveles de HDL ya que los individuos con niveles más altos parecen tener una mayor supervivencia. Los individuos que realizan ejercicio de forma habitual también parecen vivir más. Todo esto parece indicar que aquellos sujetos que mantienen un estilo de vida saludable consiguen incrementar la supervivencia. Por ello es preciso realizar esfuerzos en estos aspectos para conseguir incrementar la supervivencia.

Por otra parte, parece ser que determinadas enfermedades intercurrentes también interfieren en la enfermedad disminuyendo la supervivencia. Estas enfermedades pueden actuar como factores de confusión a la hora de valorar si la mortalidad es debida al CRC o influyen también otras causas de comorbilidad.

## **5.7 PERSPECTIVAS FUTURAS**

A la vista de los resultados obtenidos en un futuro podríamos seguir estudiando esta enfermedad en las siguientes líneas de investigación.

Seguir estudiando el comportamiento de los niveles de MPO en suero en el contexto de esta enfermedad ya que este constituye el primer estudio a este respecto. En este sentido tenemos previsto realizar estudios que nos permiten valorar la MPO como un posible marcador tumoral. A estos efectos diseñaremos un estudio en el que mediremos esta proteína en diferentes momentos dentro de los mismos individuos para estudiar su comportamiento y valorar su utilidad como marcador de recidivas y de eficacia de tratamientos.

Podríamos estudiar el efecto de suplementos antioxidantes en un grupo de pacientes con pólipos y seguir su evolución, comparándolo con un grupo en el que no se administran. Lo mismo podríamos realizar con un tratamiento a base de estatinas ya que parece que disminuye la oxidación en el tumor.

Tenemos previsto realizar estudios de oxidación en mucosa sana de pacientes que acudan a realizarse una colonoscopia por otros motivos y resulte no tener hallazgos patológicos, algo que no se ha realizado en ningún estudio previo y que nos daría una idea de los niveles de oxidación en un tejido intestinal sano.

Estudiar la oxidación en la mucosa intestinal de pacientes afectados de aterosclerosis, ya que, estudios previos ya comentados indican como la aterosclerosis puede generar un estado hiperoxidativo que predisponga al cáncer de colon. Lo mismo se podría realizar con enfermos diabéticos.

En resumen, orientamos nuestras líneas futuras a estudiar cómo se encuentra la oxidación en la mucosa de pacientes sanos a efectos de CRC y de pólipos intestinales, pero con alguna patología que podría resultar asociada al CRC. De esta manera, podríamos orientar medidas preventivas dirigidas a estos grupos concretos de población para la prevención del cáncer de colon.

## ***CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES***

## **6. CONCLUSIONES**

### **6.1 CONSECUCCIÓN DE OBJETIVOS**

#### **6.1.1 OBJETIVO I**

Como hemos podido comprobar los niveles de oxidación aumentan de forma global en cada estadio de la fase tumoral desde la aparición de un pólipo hasta el estadio IV en relación con la población control, algo que se puede resumir en los resultados de la variable OBSM1.

Según los resultados obtenidos podemos afirmar que todos los individuos del estudio, a excepción de los controles, presentan niveles elevados de oxidación. Estos niveles elevados pueden ser identificados por los altos niveles de LDL oxidada con respecto al control. Según nuestros resultados, es posible que, estos individuos con altos niveles de oxidación en sangre tengan una probabilidad aumentada de padecer pólipos. Una vez que aparece el pólipo es posible que una dieta baja en antioxidantes como los  $\beta$ -carotenos provoque la aparición de displasia en el pólipo, ya que los niveles de este antioxidante se encuentran marcadamente disminuidos en los enfermos con pólipos displásicos y siguientes estadios. Seguidamente, tal vez el abandono de una dieta saludable y de un estilo de vida saludable unido a otros cofactores precipite la aparición del cáncer. Lo que de momento podemos afirmar es que el estado pro-oxidante permanece presente en los sujetos con pólipos sin displasia, es decir, en el comienzo del proceso tumoral. Estos sujetos ya han inclinado la balanza hacia la oxidación y posteriormente parece ser que la perpetuación de este estado dará origen al CRC.

Este estado pro-oxidante está bien definido por la elevación de LDL ox desde la fase de pólipos y a continuación también por el incremento progresivo de MPO. Los antioxidantes que mejor definen el estado antioxidante a lo largo de todo el estudio son los  $\beta$ -carotenos ya que no se ven modificados sus niveles en plasma como consecuencia de la reacción de fase aguda. Aunque tal vez lo que realmente defina mejor el estado de oxidación de los pacientes son las variables OBSM1 y OBSM2 ya que nos dan una visión global del estado oxidativo de los pacientes a través de todo el estudio. Estas

variables disminuyen progresivamente de forma significativa a medida que avanza el estadio y se relacionan bien con otras variables que miden oxidación como el TBARS en tejido u OBS en el caso de la alimentación.

Podemos decir que los niveles de HDL se correlacionan de forma positiva con los niveles de antioxidantes de manera que esta lipoproteína, además de funcionar como antioxidante natural, nos sirve como marcador de un estilo de vida saludable ya que también está aumentada en aquellos individuos que realizan ejercicio de forma habitual ó aislada. La inflamación, medida mediante los valores de PCR, se corresponde bien con los parámetros pro-oxidantes y se correlaciona de forma inversa con los antioxidantes por lo que comprobamos que oxidación e inflamación son fenómenos que permanecen ligados.

No obstante, tenemos que decir que las enfermedades intercurrentes son más frecuentes en los grupos de pacientes con CRC y en estas enfermedades intercurrentes habitualmente están elevados los marcadores de oxidación por lo que pudieran actuar como factor de confusión.

Como hemos comentado a lo largo del estudio este es el primer trabajo en el que se estudia la MPO en suero de pacientes con CRC. Los resultados muestran como la MPO funciona como un buen marcador de oxidación en esta enfermedad, encontrándose elevada en los enfermos con CRC de forma progresiva. Además, los niveles de MPO resultan independientes de la edad y el sexo por lo que pueden ser debidos exclusivamente a la enfermedad.

### **6.1.2 OBJETIVO II**

En el tejido de los pacientes con CRC hemos estudiado la oxidación mediante diferentes parámetros.

En cuanto a los lípidos peroxidados en el tejido tumoral hemos obtenido un aumento de sus niveles conforme avanza el estadio del tumor. Los valores en tejido sano periadyacente a la lesión parecen ascender también en el estadio IV aunque no de

forma significativa. Este aumento puede ser debido a la contaminación de la zona tumoral. De todas formas si comparamos el tejido tumoral con respecto del sano parece que la peroxidación lipídica está aumentada en nuestro estudio. No obstante no hemos podido resolver la controversia existente entre los diferentes autores que han estudiado este evento ya que en algún caso la diferencia no era tan clara. Tal vez tenga algo que ver el hecho de que los enfermos con Insuficiencia Renal tengan niveles más elevados de lípidos peroxidados o que los pacientes tratados con estatinas los tengan más disminuidos. También hay que mencionar que los pacientes con AF de cáncer tienen niveles más elevados de lípidos peroxidados en tejido lo que podría ser consecuencia de una predisposición genética a una mayor oxidación o podría ser consecuencia de determinados hábitos de vida y alimentarios arraigados en una misma familia. Otro hecho que hemos comprobado es que los enfermos tratados con QT o RT tienen niveles más elevados de lípidos peroxidados en el tumor. En otros trabajos no se hace referencia a estas cuatro circunstancias y tal vez estos autores tendrían que revisar estos aspectos para poder aunar criterios. Resulta relevante que los pacientes que se encuentran en tratamiento con estatinas tengan niveles menores de lípidos peroxidados que aquellos no tratados. Este tratamiento podría constituir un elemento preventivo de la oxidación en la mucosa y por tanto de la aparición del CRC o bien podría constituir un tratamiento coadyuvante a la cirugía para evitar recidivas de la enfermedad.

Con respecto a la ApoD en tejido podemos decir que sus niveles disminuyen conforme aumenta el estadio tumoral aunque no de forma estadísticamente significativa. Esta proteína es un antioxidante que induce la apoptosis en las células dañadas y parece ser, según estudios previos, que en las fases avanzadas del tumor su gen se encuentra metilado y no se expresa en cantidad suficiente y el tumor es capaz de evadir este mecanismo protector. Sin tener en cuenta el estadio tumoral ApoD se correlaciona inversamente con OBSM1 y OBSM2 por lo que parece que se expresa cuanto mayor es la oxidación en suero, lo que demuestra su papel protector.

En conjunto parece ser que la oxidación en el tejido de los pacientes parece aumentar al hacerlo el estadio tumoral y parece tener una buena correlación con los niveles de oxidación en sangre.

### **6.1.3 OBJETIVO III**

Dentro del estudio del estilo de vida de los pacientes parece ser que el ejercicio juega un papel fundamental manteniendo unos niveles de oxidación más bajos que los sujetos sedentarios. De todas maneras no hay consenso en la comunidad científica sobre el mecanismo, o si bien el ejercicio es un mero marcador de un estilo de vida saludable más amplio que incluya más hábitos. Nosotros apoyamos esta última afirmación ya que hemos encontrado una buena correlación entre ejercicio, antioxidantes ingeridos y niveles de antioxidación en plasma. Los sujetos sedentarios por el contrario consumen menos antioxidantes y tienen marcadores de oxidación elevados en suero.

Con respecto a la alimentación hemos podido constatar que los individuos afectados de cáncer consumen menos cantidad de alimentos, tal vez como causa de su enfermedad. No obstante, podemos decir que los antioxidantes ingeridos tienen buena correlación con sus niveles en plasma excepto aquellos que disminuyen como consecuencia de un proceso de fase aguda (vitamina A, vitamina E, licopeno y luteína). Sin embargo, sí guardan buena correlación con la variable OBSM1 por lo que los antioxidantes ingeridos se ven reflejados en plasma. Hay que considerar el hecho de que las vísceras son consumidas en mayor cantidad por los individuos fallecidos y también por los tratados con QT ó RT, por lo que podemos pensar que el consumo de este tipo de alimentos conlleva tumores más agresivos. Eliminar este tipo de alimentación podría ser una buena medida preventiva para el CRC, aunque hacen falta más estudios.

Parece ser que los individuos con enfermedades intercurrentes consumen una dieta más saludable y con menos grasas. Sin embargo, estos individuos no aumentan la cantidad de alimentos antioxidantes, sólo restringen los grasos. Tal vez una buena medida preventiva sería inducir el aumento del consumo de alimentos ricos en antioxidantes.

Tenemos que comentar que la variables OBS se correlaciona bien con las variables creadas específicamente en este estudio OBSM1 y OBSM2, lo que indica una buena correlación entre las variables de oxidación, ya sean estudiadas en un cuestionario de frecuencias o en el plasma de los pacientes.

#### **6.1.4 OBJETIVO IV**

Como ya hemos comentado en el capítulo de resultados no hemos obtenido ninguna conclusión del análisis de los polimorfismos de la APO D en relación con el CRC.

Solamente podemos comentar que aquellos sujetos con genotipo G/G para el polimorfismo APOD 3 tienen niveles más elevados de APOD en el tejido perilesional. Esto podría indicar una mayor expresión de la proteína en estos individuos lo que podría protegerles de los efectos nocivos de la oxidación.

#### **6.1.5 OBJETIVO V**

En general, podemos considerar que aquellos individuos con niveles de oxidación más elevados tienen una supervivencia menor. También tienen una supervivencia menor aquellos individuos que realizan menos ejercicio. Esto indica que un estilo de vida saludable con una alimentación rica en antioxidantes aumenta la supervivencia en esta enfermedad.

Aquellos sujetos que han sido sometidos a QT o RT tienen una supervivencia menor, tal vez por tratarse de tumores más agresivos. También tienen una supervivencia menor aquellos pacientes con enfermedades intercurrentes, lo que podría interferir como factor de confusión.

En definitiva podemos decir que un nivel elevado de antioxidantes en suero y un estilo de vida saludable aumentan la supervivencia en CRC.



## **6.2 CONSIDERACIONES RESPECTO A LOS OBJETIVOS**

En resumen podemos extraer la conclusión de que tanto los enfermos con cáncer de colon como aquellos que padecen pólipos (potenciales candidatos a padecer CRC) tienen niveles de oxidación elevados. Además estos niveles son más elevados cuanto más avanzados se encuentran en el proceso tumoral. Estos niveles elevados se comprueban tanto por un aumento de las sustancias pro-oxidantes como por una disminución de las sustancias antioxidantes en suero. Así mismo los enfermos con cáncer presentan unos niveles más elevados de oxidación en tejido cuanto más avanzado sea el estadio de la enfermedad.

También debemos decir que los procesos oxidativos se relacionan mejor con el estadio de la AJCC que aúna criterios clínicos e histológicos que con la clasificación histológica pura de la diferenciación tumoral.

En definitiva, todo nos hace pensar que existen determinados factores, ya sean genéticos o ambientales que aumentan el estrés oxidativo que da lugar a pólipos intestinales. Si el sujeto consume menos antioxidantes (niveles menores en suero), especialmente  $\beta$ -carotenos, los pólipos se transformarían en displásicos y si a esto se une un abandono de una dieta saludable y sedentarismo aparecería la degeneración carcinomatosa, en la que seguiría aumentando el estrés oxidativo, perpetuando de esta manera el proceso. El estrés oxidativo produciría mutaciones en las células que escaparían a los mecanismos de control y de defensa, tales como la APO D, propiciando la diseminación del tumor y la muerte del individuo.

Lo importante de este estudio es que destacamos que el proceso de oxidación comienza en la fase de pólipo y que los individuos con pólipo displásicos tienen menores niveles en sangre de antioxidantes lo que podría predisponer a un mayor estrés oxidativo y por tanto a mayores mutaciones que pueden degenerar en cáncer.

Si la secuencia fuera como la hemos descrito, podríamos beneficiarnos de terapias preventivas en esta enfermedad. Serían recomendables suplementos antioxidantes en los pacientes con pólipos para prevenir la displasia y el cáncer. Así

mismo sería recomendable una dieta con alimentos ricos en antioxidantes y una vida en la que se realice ejercicio de forma habitual.

### **6.3 CONCLUSIONES FINALES**

1.- Los niveles globales de oxidación en plasma aumentan progresivamente en cada fase del proceso tumoral desde la aparición de un pólipo intestinal hasta el último estadio de la enfermedad.

2.- Todos los individuos del estudio, excepto los controles, presentan niveles elevados de LDL ox en plasma y por tanto niveles elevados de oxidación.

3.- Los niveles de MPO en plasma aumentan de forma progresiva en el suero de pacientes con CRC de forma independiente a la edad y al sexo funcionando como un buen marcador de oxidación para esta enfermedad.

4.- Los individuos con mayores niveles de oxidación en plasma presentan una menor supervivencia dentro de esta enfermedad.

5.- Los niveles de  $\beta$ -carotenos en plasma están marcadamente disminuidos en los pacientes que presentan pólipos con displasia leve y permanecen así en las fases sucesivas de la enfermedad.

6.- Los niveles de oxidación medidos mediante la determinación de lípidos peroxidados en el tejido de los pacientes con CRC se elevan a medida que se incrementa el estadio de la enfermedad siendo especialmente elevados en el estadio IV.

7.- Los niveles de oxidación en tejido son más reducidos en aquellos pacientes tratados con estatinas.

8.- Los niveles de oxidación en tejido son más elevados en aquellos pacientes con antecedentes familiares de cáncer colorrectal lo cual demuestra una susceptibilidad genética a una mayor oxidación ó unos hábitos alimenticios y de estilo de vida arraigados en el seno de la misma familia o ambas posibilidades al mismo tiempo.

9.- Los sujetos que realizan ejercicio consumen mayor cantidad de alimentos ricos en antioxidantes, muestran niveles elevados de antioxidantes en plasma y presentan menores niveles de oxidación, al contrario que los sujetos sedentarios.

10.- Los individuos con un estilo de vida saludable presentan una mayor supervivencia en el contexto de esta enfermedad.

11.- El consumo de vísceras se ha visto aumentado de forma estadísticamente significativa en los individuos fallecidos y en aquellos tratados con QT y/o RT por lo que se relaciona con tumores más agresivos.

12.- ApoD se expresa en tejido en mayor cantidad en los individuos con mayores niveles de oxidación en suero mostrando su carácter protector.

13.- Los individuos con genotipo G/G para el polimorfismo ApoD3 (RS1568565) expresan mayor cantidad de proteína en el tejido perilesional.

14.- Las variables modificadas OBSM1 y OBSM2, para medir niveles de oxidación en este estudio de forma objetiva, han funcionado de forma correcta y son válidas para ser utilizadas en otros trabajos.

## ***BIBLIOGRAFÍA***

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Leung EYL, Crozier JEM, Talwar D, O'Reilly DSJ, McKee RF, Horgan PG, et al. Vitamin antioxidants, lipid peroxidation, tumour stage, the systemic inflammatory response and survival in patients with colorectal cancer. *Int. J. Cancer*. 2008 nov 15;123(10):2460–4.
2. Zhaorigetu S, Sasaki M, Watanabe H, Kato N. Supplemental silk protein, sericin, suppresses colon tumorigenesis in 1,2-dimethylhydrazine-treated mice by reducing oxidative stress and cell proliferation. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 2001 oct;65(10):2181–6.
3. Kállay E, Bareis P, Bajna E, Kriwanek S, Bonner E, Toyokuni S, et al. Vitamin D receptor activity and prevention of colonic hyperproliferation and oxidative stress. *Food Chem. Toxicol*. 2002 ago;40(8):1191–6.
4. J M. *Cáncer colorrectal*. Elsevier España; 2007.
5. Alonso A, Moreno S, Valiente A, Artigas M, Pérez-Juana A, Ramos Arroyo MA. [Genetic mechanisms in the hereditary predisposition to colorectal cancer]. *An Sist Sanit Navar*. 2006 abr;29(1):59–76.
6. Kim MS, Lee J, Sidransky D. DNA methylation markers in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2010 mar;29(1):181–206.
7. Cunningham D, Atkin W, Lenz H-J, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, et al. Colorectal cancer. *Lancet*. 2010 mar 20;375(9719):1030–47.
8. Uña E, Crespo J, Bustamante R. Issues in colorectal cancer survivors. *The Challenge of Colorectal Cancer: A Review Book*.
9. Molina R, Filella X, Augé JM, Escudero JM. *Utilidad Clínica de los Marcadores Tumorales [Estado actual y perspectivas de futuro III]*. Roche Diagnostics S.L.; 2011.
10. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010 jun;138(6):2073–2087.e3.
11. Jaspersion KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*. 2010 jun;138(6):2044–58.
12. Skrzycki M, Majewska M, Podsiad M, Czczot H. Expression and activity of superoxide dismutase isoenzymes in colorectal cancer. *Acta Biochim. Pol*. 2009;56(4):663–70.
13. Ballinger AB, Anggiansah C. Colorectal cancer. *BMJ*. 2007 oct 6;335(7622):715–8.
14. Terman A, Brunk UT. Oxidative stress, accumulation of biological «garbage», and aging. *Antioxid. Redox Signal*. 2006 feb;8(1-2):197–204.

15. Ames BN. Measuring oxidative damage in humans: relation to cancer and ageing. *IARC Sci. Publ.* 1988;(89):407–16.
16. McCall MR, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radic. Biol. Med.* 1999 abr;26(7-8):1034–53.
17. Tribble DL, Aw TY, Jones DP. The pathophysiological significance of lipid peroxidation in oxidative cell injury. *Hepatology.* 1987 abr;7(2):377–86.
18. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.* 1995 dic;41(12 Pt 2):1819–28.
19. Chiarpotto E, Scavazza A, Leonarduzzi G, Camandola S, Biasi F, Teggia PM, et al. Oxidative damage and transforming growth factor beta 1 expression in pretumoral and tumoral lesions of human intestine. *Free Radic. Biol. Med.* 1997;22(5):889–94.
20. Conner EM, Grisham MB. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition.* 1996 abr;12(4):274–7.
21. Olinski R, Jaruga P, Zastawny TH. Oxidative DNA base modifications as factors in carcinogenesis. *Acta Biochim. Pol.* 1998;45(2):561–72.
22. Ohshima H, Tatemichi M, Sawa T. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003 sep 1;417(1):3–11.
23. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2003 abr;3(4):276–85.
24. Agostinelli E, Vedova LD, Belli F, Condello M, Arancia G, Seiler N. Sensitization of human colon adenocarcinoma cells (LoVo) to reactive oxygen species by a lysosomotropic compound. *Int. J. Oncol.* 2006 oct;29(4):947–55.
25. Van Hoydonck PGA, Temme EHM, Schouten EG. A dietary oxidative balance score of vitamin C, beta-carotene and iron intakes and mortality risk in male smoking Belgians. *J. Nutr.* 2002 abr;132(4):756–61.
26. Goodman M, Bostick RM, Gross M, Thyagarajan B, Dash C, Flanders WD. Combined measure of pro- and anti-oxidant exposures in relation to prostate cancer and colorectal adenoma risk: an update. *Ann Epidemiol.* 2010 dic;20(12):955–7.
27. Suzuki K, Ito Y, Wakai K, Kawado M, Hashimoto S, Toyoshima H, et al. Serum oxidized low-density lipoprotein levels and risk of colorectal cancer: a case-control study nested in the Japan Collaborative Cohort Study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2004 nov;13(11 Pt 1):1781–7.
28. Carr AC, McCall MR, Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000 jul;20(7):1716–23.

29. Hazen SL, Zhang R, Shen Z, Wu W, Podrez EA, MacPherson JC, et al. Formation of nitric oxide-derived oxidants by myeloperoxidase in monocytes: pathways for monocyte-mediated protein nitration and lipid peroxidation In vivo. *Circ. Res.* 1999 nov 12;85(10):950–8.
30. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc. Biol.* 2005 may;77(5):598–625.
31. Scheffer PG, van der Zwan LP, Schindhelm RK, Vermue HPA, Teerlink T. Myeloperoxidase concentrations in EDTA-plasma of healthy subjects are discordant with concentrations in heparin-plasma and serum. *Clin. Biochem.* 2009 sep;42(13-14):1490–2.
32. Brennan M-L, Penn MS, Van Lente F, Nambi V, Shishehbor MH, Aviles RJ, et al. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N. Engl. J. Med.* 2003 oct 23;349(17):1595–604.
33. Garrity-Park M, Loftus EV Jr, Sandborn WJ, Smyrk TC. Myeloperoxidase immunohistochemistry as a measure of disease activity in ulcerative colitis: Association with ulcerative colitis-colorectal cancer, tumor necrosis factor polymorphism and RUNX3 methylation. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2011 mar 18 [citado 2011 sep 3]; Available a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21425209>
34. Roncucci L, Mora E, Mariani F, Bursi S, Pezzi A, Rossi G, et al. Myeloperoxidase-positive cell infiltration in colorectal carcinogenesis as indicator of colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2008 sep;17(9):2291–7.
35. Rainis T, Maor I, Lanir A, Shnizer S, Lavy A. Enhanced oxidative stress and leucocyte activation in neoplastic tissues of the colon. *Dig. Dis. Sci.* 2007 feb;52(2):526–30.
36. Czeczot H, Scibior-Bentkowska D, Skrzycki M, Majewska M, Podsiad M. [Lipid peroxidation level in gastrointestinal tract tumors]. *Pol. Merkur. Lekarski.* 2010 nov;29(173):309–14.
37. Hendrickse CW, Kelly RW, Radley S, Donovan IA, Keighley MR, Neoptolemos JP. Lipid peroxidation and prostaglandins in colorectal cancer. *Br J Surg.* 1994 ago;81(8):1219–23.
38. Ozdemirler G, Pabuçcuoglu H, Bulut T, Bugra D, Uysal M, Toker G. Increased lipoperoxide levels and antioxidant system in colorectal cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1998;124(10):555–9.
39. Skrzydlewska E, Sulkowski S, Koda M, Zalewski B, Kanczuga-Koda L, Sulkowska M. Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 2005 ene 21;11(3):403–6.
40. Julius U, Drel VR, Grässler J, Obrosova IG. Nitrosylated proteins in monocytes as a new marker of oxidative-nitrosative stress in diabetic subjects with macroangiopathy. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* 2009 feb;117(2):72–7.



41. Olson JA. Benefits and liabilities of vitamin A and carotenoids. *J. Nutr.* 1996 abr;126(4 Suppl):1208S–12S.
42. Niles RM. Signaling pathways in retinoid chemoprevention and treatment of cancer. *Mutat. Res.* 2004 nov 2;555(1-2):81–96.
43. Eisinger AL, Nadauld LD, Shelton DN, Prescott SM, Stafforini DM, Jones DA. Retinoic acid inhibits beta-catenin through suppression of Cox-2: a role for truncated adenomatous polyposis coli. *J. Biol. Chem.* 2007 oct 5;282(40):29394–400.
44. Dillard AC, Lane MA. Retinol decreases beta-catenin protein levels in retinoic acid-resistant colon cancer cell lines. *Mol. Carcinog.* 2007 abr;46(4):315–29.
45. Park EY, Wilder ET, Lane MA. Retinol inhibits the invasion of retinoic acid-resistant colon cancer cells in vitro and decreases matrix metalloproteinase mRNA, protein, and activity levels. *Nutr Cancer.* 2007;57(1):66–77.
46. Freemantle SJ, Spinella MJ, Dmitrovsky E. Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance. *Oncogene.* 2003 oct 20;22(47):7305–15.
47. Melichar B, Krcmová L, Kalábová H, Holecková P, Kasparová M, Plíšek J, et al. Serum retinol, alpha-tocopherol and systemic inflammatory response in metastatic colorectal carcinoma patients treated with combination chemotherapy and cetuximab. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 2010;56(4):222–6.
48. Belitz H-D, Grosch W, Schieberle P. *Food Chemistry*. 3rd ed. Springer; 2004.
49. Pan M-H, Lai C-S, Wu J-C, Ho C-T. Molecular mechanisms for chemoprevention of colorectal cancer by natural dietary compounds. *Mol Nutr Food Res.* 2011 ene;55(1):32–45.
50. Palozza P, Serini S, Trombino S, Lauriola L, Ranelletti FO, Calviello G. Dual role of beta-carotene in combination with cigarette smoke aqueous extract on the formation of mutagenic lipid peroxidation products in lung membranes: dependence on pO<sub>2</sub>. *Carcinogenesis.* 2006 dic;27(12):2383–91.
51. Stahl W, Sies H. Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans. *J. Nutr.* 1992 nov;122(11):2161–6.
52. Tang F-Y, Cho H-J, Pai M-H, Chen Y-H. Concomitant supplementation of lycopene and eicosapentaenoic acid inhibits the proliferation of human colon cancer cells. *J. Nutr. Biochem.* 2009 jun;20(6):426–34.
53. Park S-Y, Nomura AMY, Murphy SP, Wilkens LR, Henderson BE, Kolonel LN. Carotenoid intake and colorectal cancer risk: the multiethnic cohort study. *J Epidemiol.* 2009;19(2):63–71.

54. Slattery ML, Wolff RK, Herrick J, Caan BJ, Samowitz W. Tumor markers and rectal cancer: support for an inflammation-related pathway. *Int. J. Cancer*. 2009 oct 1;125(7):1698–704.
55. Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*. W. H. Freeman; 2008.
56. Henry JB. *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*. W.B. Saunders; 2001.
57. MacDonald N. Cancer cachexia and targeting chronic inflammation: a unified approach to cancer treatment and palliative/supportive care. *J Support Oncol*. 2007 abr;5(4):157–162; discussion 164–166, 183.
58. DeNardo DG, Johansson M, Coussens LM. Immune cells as mediators of solid tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2008 mar;27(1):11–8.
59. Tlsty TD, Coussens LM. Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu Rev Pathol*. 2006;1:119–50.
60. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med*. 1999 feb 11;340(6):448–54.
61. McMillan DC, Elahi MM, Sattar N, Angerson WJ, Johnstone J, McArdle CS. Measurement of the systemic inflammatory response predicts cancer-specific and non-cancer survival in patients with cancer. *Nutr Cancer*. 2001;41(1-2):64–9.
62. Hogan AM, Collins D, Baird AW, Winter DC. Estrogen and gastrointestinal malignancy. *Mol. Cell. Endocrinol*. 2009 ago 13;307(1-2):19–24.
63. Giovannucci E. Metabolic syndrome, hyperinsulinemia, and colon cancer: a review. *Am. J. Clin. Nutr*. 2007 sep;86(3):s836–842.
64. van Duijnhoven FJB, Bueno-De-Mesquita HB, Calligaro M, Jenab M, Pischon T, Jansen EHJM, et al. Blood lipid and lipoprotein concentrations and colorectal cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Gut*. 2011 ago;60(8):1094–102.
65. Esteve E, Ricart W, Fernández-Real JM. Dyslipidemia and inflammation: an evolutionary conserved mechanism. *Clin Nutr*. 2005 feb;24(1):16–31.
66. Avramoglu RK, Basciano H, Adeli K. Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states. *Clin. Chim. Acta*. 2006 jun;368(1-2):1–19.
67. Kontush A, de Faria EC, Chantepie S, Chapman MJ. A normotriglyceridemic, low HDL-cholesterol phenotype is characterised by elevated oxidative stress and HDL particles with attenuated antioxidative activity. *Atherosclerosis*. 2005 oct;182(2):277–85.
68. Vekic J, Kotur-Stevuljevic J, Jelic-Ivanovic Z, Spasic S, Spasojevic-Kalimanovska V, Topic A, et al. Association of oxidative stress and PON1 with

- LDL and HDL particle size in middle-aged subjects. *Eur. J. Clin. Invest.* 2007 sep;37(9):715–23.
69. Kim S, Keku TO, Martin C, Galanko J, Woosley JT, Schroeder JC, et al. Circulating levels of inflammatory cytokines and risk of colorectal adenomas. *Cancer Res.* 2008 ene 1;68(1):323–8.
  70. van Exel E, Gussekloo J, de Craen AJM, Frölich M, Bootsma-Van Der Wiel A, Westendorp RGJ. Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes: the Leiden 85-Plus Study. *Diabetes.* 2002 abr;51(4):1088–92.
  71. Napoli C, de Nigris F, Palinski W. Multiple role of reactive oxygen species in the arterial wall. *J. Cell. Biochem.* 2001;82(4):674–82.
  72. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.* 2004 nov;266(1-2):37–56.
  73. Poynter JN, Gruber SB, Higgins PDR, Almog R, Bonner JD, Rennert HS, et al. Statins and the risk of colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 2005 may 26;352(21):2184–92.
  74. Cole BF, Logan RF, Halabi S, Benamouzig R, Sandler RS, Grainge MJ, et al. Aspirin for the chemoprevention of colorectal adenomas: meta-analysis of the randomized trials. *J. Natl. Cancer Inst.* 2009 feb 18;101(4):256–66.
  75. Pendyala S, Neff LM, Suárez-Fariñas M, Holt PR. Diet-induced weight loss reduces colorectal inflammation: implications for colorectal carcinogenesis. *Am. J. Clin. Nutr.* 2011 feb;93(2):234–42.
  76. Gunter MJ, Leitzmann MF. Obesity and colorectal cancer: epidemiology, mechanisms and candidate genes. *J. Nutr. Biochem.* 2006 mar;17(3):145–56.
  77. Alexander DD, Cushing CA. Red meat and colorectal cancer: a critical summary of prospective epidemiologic studies. *Obes Rev.* 2011 may;12(5):e472–493.
  78. Hopkins MH, Fedirko V, Jones DP, Terry PD, Bostick RM. Antioxidant micronutrients and biomarkers of oxidative stress and inflammation in colorectal adenoma patients: results from a randomized, controlled clinical trial. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2010 mar;19(3):850–8.
  79. Galli C, Marangoni F. Recent advances in the biology of n-6 fatty acids. *Nutrition.* 1997 dic;13(11-12):978–85.
  80. Velthuis-te Wierik EJ, van den Berg H, Weststrate JA, van het Hof KH, de Graaf C. Consumption of reduced-fat products: effects on parameters of anti-oxidative capacity. *Eur J Clin Nutr.* 1996 abr;50(4):214–9.
  81. Swain JH, Alekel DL, Dent SB, Peterson CT, Reddy MB. Iron indexes and total antioxidant status in response to soy protein intake in perimenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* 2002 jul;76(1):165–71.

82. Heber D, Lu Q-Y. Overview of mechanisms of action of lycopene. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 2002 nov;227(10):920–3.
83. Slattery ML, Boucher KM, Caan BJ, Potter JD, Ma KN. Eating patterns and risk of colon cancer. *Am. J. Epidemiol.* 1998 jul 1;148(1):4–16.
84. Fung T, Hu FB, Fuchs C, Giovannucci E, Hunter DJ, Stampfer MJ, et al. Major dietary patterns and the risk of colorectal cancer in women. *Arch. Intern. Med.* 2003 feb 10;163(3):309–14.
85. Kesse E, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC. Dietary patterns and risk of colorectal tumors: a cohort of French women of the National Education System (E3N). *Am. J. Epidemiol.* 2006 dic 1;164(11):1085–93.
86. Kim MK, Sasaki S, Otani T, Tsugane S. Dietary patterns and subsequent colorectal cancer risk by subsite: a prospective cohort study. *Int. J. Cancer.* 2005 jul 10;115(5):790–8.
87. Rouillier P, Senesse P, Cottet V, Valléau A, Faivre J, Boutron-Ruault M-C. Dietary patterns and the adenomacarcinoma sequence of colorectal cancer. *Eur J Nutr.* 2005 ago;44(5):311–8.
88. Terry P, Hu FB, Hansen H, Wolk A. Prospective study of major dietary patterns and colorectal cancer risk in women. *Am. J. Epidemiol.* 2001 dic 15;154(12):1143–9.
89. Goodman M, Bostick RM, Dash C, Terry P, Flanders WD, Mandel J. A summary measure of pro- and anti-oxidant exposures and risk of incident, sporadic, colorectal adenomas. *Cancer Causes Control.* 2008 dic;19(10):1051–64.
90. Barbaric M, Brooks E, Moore L, Cheifetz O. Effects of physical activity on cancer survival: a systematic review. *Physiother Can.* 2010;62(1):25–34.
91. Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.* 1996 ago 15;318 ( Pt 1):1–14.
92. Flower DR, North AC, Sansom CE. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000 oct 18;1482(1-2):9–24.
93. Ganfornina MD, Sánchez D, Pagano A, Tonachini L, Descalzi-Cancedda F, Martínez S. Molecular characterization and developmental expression pattern of the chicken apolipoprotein D gene: implications for the evolution of vertebrate lipocalins. *Dev. Dyn.* 2005 ene;232(1):191–9.
94. Sánchez D, Ganfornina MD, Martínez S. Expression pattern of the lipocalin apolipoprotein D during mouse embryogenesis. *Mech. Dev.* 2002 ene;110(1-2):225–9.
95. Rassart E, Bedirian A, Do Carmo S, Guinard O, Sirois J, Terrisse L, et al. Apolipoprotein D. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000 oct 18;1482(1-2):185–98.

96. Navarro-Incio AM, Tolivia-Fernández J. [The involvement of apolipoprotein D in pathologies affecting the nervous system]. *Rev Neurol.* 2004 jun 16;38(12):1166–75.
97. Leung WCY, Lawrie A, Demaries S, Massaeli H, Burry A, Yablonsky S, et al. Apolipoprotein D and platelet-derived growth factor-BB synergism mediates vascular smooth muscle cell migration. *Circ. Res.* 2004 jul 23;95(2):179–86.
98. Thomas EA, George RC, Sutcliffe JG. Apolipoprotein D modulates arachidonic acid signaling in cultured cells: implications for psychiatric disorders. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 2003 dic;69(6):421–7.
99. Ganfornina MD, Gutiérrez G, Bastiani M, Sánchez D. A phylogenetic analysis of the lipocalin protein family. *Mol. Biol. Evol.* 2000 ene;17(1):114–26.
100. Helisalmi S, Hiltunen M, Vepsäläinen S, Iivonen S, Corder EH, Lehtovirta M, et al. Genetic variation in apolipoprotein D and Alzheimer's disease. *J. Neurol.* 2004 ago;251(8):951–7.
101. Sarjeant JM, Lawrie A, Kinnear C, Yablonsky S, Leung W, Massaeli H, et al. Apolipoprotein D inhibits platelet-derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferation by preventing translocation of phosphorylated extracellular signal regulated kinase 1/2 to the nucleus. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003 dic;23(12):2172–7.
102. Breustedt DA, Schönfeld DL, Skerra A. Comparative ligand-binding analysis of ten human lipocalins. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006 feb;1764(2):161–73.
103. Do Carmo S, Séguin D, Milne R, Rassart E. Modulation of apolipoprotein D and apolipoprotein E mRNA expression by growth arrest and identification of key elements in the promoter. *J. Biol. Chem.* 2002 feb 15;277(7):5514–23.
104. Díaz E, Ge Y, Yang YH, Loh KC, Serafini TA, Okazaki Y, et al. Molecular analysis of gene expression in the developing pontocerebellar projection system. *Neuron.* 2002 oct 24;36(3):417–34.
105. Lieuallen K, Pennacchio LA, Park M, Myers RM, Lennon GG. Cystatin B-deficient mice have increased expression of apoptosis and glial activation genes. *Hum. Mol. Genet.* 2001 sep 1;10(18):1867–71.
106. Suresh S, Yan Z, Patel RC, Patel YC, Patel SC. Cellular cholesterol storage in the Niemann-Pick disease type C mouse is associated with increased expression and defective processing of apolipoprotein D. *J. Neurochem.* 1998 ene;70(1):242–51.
107. Ong W-Y, Hu C-Y, Patel SC. Apolipoprotein D in the Niemann-Pick type C disease mouse brain: an ultrastructural immunocytochemical analysis. *J. Neurocytol.* 2002 feb;31(2):121–9.
108. Yoshida K, Cleaveland ES, Nagle JW, French S, Yaswen L, Ohshima T, et al. Molecular cloning of the mouse apolipoprotein D gene and its upregulated expression in Niemann-Pick disease type C mouse model. *DNA Cell Biol.* 1996 oct;15(10):873–82.

109. Terrisse L, Poirier J, Bertrand P, Merched A, Visvikis S, Siest G, et al. Increased levels of apolipoprotein D in cerebrospinal fluid and hippocampus of Alzheimer's patients. *J. Neurochem.* 1998 oct;71(4):1643–50.
110. Kalman J, McConathy W, Araoz C, Kasa P, Lacko AG. Apolipoprotein D in the aging brain and in Alzheimer's dementia. *Neurol. Res.* 2000 jun;22(4):330–6.
111. Belloir B, Kövari E, Surini-Demiri M, Savioz A. Altered apolipoprotein D expression in the brain of patients with Alzheimer disease. *J. Neurosci. Res.* 2001 abr 1;64(1):61–9.
112. Glöckner F, Ohm TG. Hippocampal apolipoprotein D level depends on Braak stage and APOE genotype. *Neuroscience.* 2003;122(1):103–10.
113. Navarro A, Del Valle E, Astudillo A, González del Rey C, Tolivia J. Immunohistochemical study of distribution of apolipoproteins E and D in human cerebral beta amyloid deposits. *Exp. Neurol.* 2003 dic;184(2):697–704.
114. Thomas EA, Dean B, Scarr E, Copolov D, Sutcliffe JG. Differences in neuroanatomical sites of apoD elevation discriminate between schizophrenia and bipolar disorder. *Mol. Psychiatry.* 2003 feb;8(2):167–75.
115. Mahadik SP, Khan MM, Evans DR, Parikh VV. Elevated plasma level of apolipoprotein D in schizophrenia and its treatment and outcome. *Schizophr. Res.* 2002 nov 1;58(1):55–62.
116. Reindl M, Knipping G, Wicher I, Dilitz E, Egg R, Deisenhammer F, et al. Increased intrathecal production of apolipoprotein D in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 2001 oct 1;119(2):327–32.
117. Hunter S, Young A, Olson J, Brat DJ, Bowers G, Wilcox JN, et al. Differential expression between pilocytic and anaplastic astrocytomas: identification of apolipoprotein D as a marker for low-grade, non-infiltrating primary CNS neoplasms. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2002 mar;61(3):275–81.
118. Dandoy-Dron F, Benboudjema L, Guillo F, Jaegly A, Jasmin C, Dormont D, et al. Enhanced levels of scrapie responsive gene mRNA in BSE-infected mouse brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2000 mar 10;76(1):173–9.
119. Labrada L, Liang XH, Zheng W, Johnston C, Levine B. Age-dependent resistance to lethal alphavirus encephalitis in mice: analysis of gene expression in the central nervous system and identification of a novel interferon-inducible protective gene, mouse ISG12. *J. Virol.* 2002 nov;76(22):11688–703.
120. Thomas EA, Danielson PE, Nelson PA, Pribyl TM, Hilbush BS, Hasel KW, et al. Clozapine increases apolipoprotein D expression in rodent brain: towards a mechanism for neuroleptic pharmacotherapy. *J. Neurochem.* 2001 feb;76(3):789–96.
121. Boyles JK, Notterpek LM, Anderson LJ. Accumulation of apolipoproteins in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve. Identification of

- apolipoprotein D, apolipoprotein A-IV, apolipoprotein E, and apolipoprotein A-I. *J. Biol. Chem.* 1990 oct 15;265(29):17805–15.
122. Spreyer P, Schaal H, Kuhn G, Rothe T, Unterbeck A, Olek K, et al. Regeneration-associated high level expression of apolipoprotein D mRNA in endoneurial fibroblasts of peripheral nerve. *EMBO J.* 1990 ago;9(8):2479–84.
  123. Terrisse L, Séguin D, Bertrand P, Poirier J, Milne R, Rassart E. Modulation of apolipoprotein D and apolipoprotein E expression in rat hippocampus after entorhinal cortex lesion. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1999 jun 18;70(1):26–35.
  124. Ong WY, He Y, Suresh S, Patel SC. Differential expression of apolipoprotein D and apolipoprotein E in the kainic acid-lesioned rat hippocampus. *Neuroscience.* 1997 jul;79(2):359–67.
  125. del Valle E, Navarro A, Astudillo A, Tolivia J. Apolipoprotein D expression in human brain reactive astrocytes. *J. Histochem. Cytochem.* 2003 oct;51(10):1285–90.
  126. Eddleston M, Mucke L. Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience.* 1993 may;54(1):15–36.
  127. Chen Y, Jia L, Wei C, Wang F, Lv H, Jia J. Association between polymorphisms in the apolipoprotein D gene and sporadic Alzheimer's disease. *Brain Res.* 2008 oct 3;1233:196–202.
  128. Ganfornina MD, Do Carmo S, Lora JM, Torres-Schumann S, Vogel M, Allhorn M, et al. Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress. *Aging Cell.* 2008 ago;7(4):506–15.
  129. Sanchez D, López-Arias B, Torroja L, Canal I, Wang X, Bastiani MJ, et al. Loss of glial lazarrillo, a homolog of apolipoprotein D, reduces lifespan and stress resistance in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 2006 abr 4;16(7):680–6.
  130. Walker DW, Muffat J, Rundel C, Benzer S. Overexpression of a *Drosophila* homolog of apolipoprotein D leads to increased stress resistance and extended lifespan. *Curr. Biol.* 2006 abr 4;16(7):674–9.
  131. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins & Cotran Patología humana con CD e acceso a Student Consult. Elsevier España; 2005.
  132. Wu Z-Y, Wan J, Zhao G, Peng L, Du J-L, Yao Y, et al. Risk factors for local recurrence of middle and lower rectal carcinoma after curative resection. *World J. Gastroenterol.* 2008 ago 14;14(30):4805–9.
  133. Miller SR, Tartter PI, Papatostas AE, Slater G, Aufses AH Jr. Serum cholesterol and human colon cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 1981 ago;67(2):297–300.
  134. Perugini, Bagnati, Cau, Bordone, Zoppis, Paffoni, et al. DISTRIBUTION OF LIPID-SOLUBLE ANTIOXIDANTS IN LIPOPROTEINS FROM HEALTHY SUBJECTS. I. CORRELATION WITH PLASMA ANTIOXIDANT LEVELS

- AND COMPOSITION OF LIPOPROTEINS. *Pharmacol. Res.* 2000 ene;41(1):53–63.
135. Alfadda AA, Sallam RM, Chishti MA, Moustafa AS, Fatma S, Alomaim WS, et al. Differential patterns of serum concentration and adipose tissue expression of chemerin in obesity: Adipose depot specificity and gender dimorphism. *Molecules and cells* [Internet]. 2012 abr 27 [citado 2012 may 2]; Available a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22544171>
  136. Albrink MJ, Krauss RM, Lindgrem FT, von der Groeben J, Pan S, Wood PD. Intercorrelations among plasma high density lipoprotein, obesity and triglycerides in a normal population. *Lipids.* 1980 sep;15(9):668–76.
  137. Banfi G, Colombini A, Lombardi G, Lubkowska A. Metabolic markers in sports medicine. *Adv Clin Chem.* 2012;56:1–54.
  138. Alhassan S, Reese KA, Mahurin J, Plaisance EP, Hilson BD, Garner JC, et al. Blood lipid responses to plant stanol ester supplementation and aerobic exercise training. *Metab. Clin. Exp.* 2006 abr;55(4):541–9.
  139. Barter P. HDL-C: role as a risk modifier. *Atheroscler Suppl.* 2011 nov;12(3):267–70.
  140. Mackness B, Mackness M. The antioxidant properties of high-density lipoproteins in atherosclerosis. *Panminerva Med.* 2012 jun;54(2):83–90.
  141. Keane WF, Tomassini JE, Neff DR. Lipid abnormalities in patients with chronic kidney disease. *Contrib Nephrol.* 2011;171:135–42.
  142. Cakmak A, Zeyrek D, Atas A, Selek S, Erel O. Oxidative status and paraoxonase activity in children with asthma. *Clin Invest Med.* 2009;32(5):E327–334.
  143. Farbstein D, Levy AP. HDL dysfunction in diabetes: causes and possible treatments. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2012 mar;10(3):353–61.
  144. Domingues J, Esteves A, Santos A, Carrageta M. [Arterial hypertension associated with hyperlipoproteinemia]. *Rev Port Cardiol.* 1990 ene;9(1):65–8.
  145. De Gennes JL, Dairou F, Gardette J, Truffert J. [Sex hormones and metabolism of lipoproteins]. *Ann. Endocrinol. (Paris).* 1983 mar;44(1):59–65.
  146. Garg RK, Arora RC, Agarwal N. High density lipoprotein. *J Assoc Physicians India.* 1991 mar;39(3):269–71.
  147. Masi CM, Hawkey LC, Cacioppo JT. Serum 2-methoxyestradiol, an estrogen metabolite, is positively associated with serum HDL-C in a population-based sample. *Lipids.* 2012 ene;47(1):35–8.
  148. Matsumoto M, Tatsumi H, Murai A. [Lipid metabolism and aging]. *Rinsho Byori.* 1990 may;38(5):530–3.



149. Koike Y, Miki C, Okugawa Y, Yokoe T, Toiyama Y, Tanaka K, et al. Preoperative C-reactive protein as a prognostic and therapeutic marker for colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 2008 dic 1;98(7):540–4.
150. Masoodi I, Kochhar R, Dutta U, Vaishnavi C, Prasad KK, Vaiphei K, et al. Fecal lactoferrin, myeloperoxidase and serum C-reactive are effective biomarkers in the assessment of disease activity and severity in patients with idiopathic ulcerative colitis. *J. Gastroenterol. Hepatol*. 2009 nov;24(11):1768–74.
151. Tang WHW, Shrestha K, Troughton RW, Borowski AG, Klein AL. Integrating plasma high-sensitivity C-reactive protein and myeloperoxidase for risk prediction in chronic systolic heart failure. *Congest Heart Fail*. 2011 jun;17(3):105–9.
152. Melichar B, Kalábová H, Krcmová L, Kasparová M, Malířová E, Melicharová K, et al. Serum homocysteine, cholesterol, retinol, alpha-tocopherol, glycosylated hemoglobin and inflammatory response during therapy with bevacizumab, oxaliplatin, 5-fluorouracil and leucovorin. *Anticancer Res*. 2009 nov;29(11):4813–20.
153. Il'yasova D, Ivanova A, Morrow JD, Cesari M, Pahor M. Correlation between two markers of inflammation, serum C-reactive protein and interleukin 6, and indices of oxidative stress in patients with high risk of cardiovascular disease. *Biomarkers*. 2008 feb;13(1):41–51.
154. Allin KH, Bojesen SE, Nordestgaard BG. Baseline C-reactive protein is associated with incident cancer and survival in patients with cancer. *J. Clin. Oncol*. 2009 may 1;27(13):2217–24.
155. Groblewska M, Mroczko B, Wereszczyńska-Siemiatkowska U, Kedra B, Lukaszewicz M, Baniukiewicz A, et al. Serum interleukin 6 (IL-6) and C-reactive protein (CRP) levels in colorectal adenoma and cancer patients. *Clin. Chem. Lab. Med*. 2008;46(10):1423–8.
156. McMillan DC, Talwar D, Sattar N, Underwood M, O'Reilly DSJ, McArdle C. The relationship between reduced vitamin antioxidant concentrations and the systemic inflammatory response in patients with common solid tumours. *Clin Nutr*. 2002 abr;21(2):161–4.
157. Wakai K, Suzuki K, Ito Y, Kojima M, Tamakoshi K, Watanabe Y, et al. Serum carotenoids, retinol, and tocopherols, and colorectal cancer risk in a Japanese cohort: effect modification by sex for carotenoids. *Nutr Cancer*. 2005;51(1):13–24.
158. Ramakrishna V, Jaiikhani R. Oxidative stress in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) patients. *Acta Diabetol*. 2008 mar;45(1):41–6.
159. Hozawa A, Jacobs DR Jr, Steffes MW, Gross MD, Steffen LM, Lee D-H. Associations of serum carotenoid concentrations with the development of diabetes and with insulin concentration: interaction with smoking: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Am. J. Epidemiol*. 2006 may 15;163(10):929–37.

160. Parslow RA, Sachdev P, Salonikas C, Lux O, Jorm AF, Naidoo D. Associations between plasma antioxidants and hypertension in a community-based sample of 415 Australians aged 60-64. *J Hum Hypertens*. 2005 mar;19(3):219–26.
161. Ito Y, Suzuki K, Ishii J, Hishida H, Tamakoshi A, Hamajima N, et al. A population-based follow-up study on mortality from cancer or cardiovascular disease and serum carotenoids, retinol and tocopherols in Japanese inhabitants. *Asian Pac. J. Cancer Prev*. 2006 dic;7(4):533–46.
162. Kitamura Y, Tanaka K, Kiyohara C, Hirohata T, Tomita Y, Ishibashi M, et al. Relationship of alcohol use, physical activity and dietary habits with serum carotenoids, retinol and alpha-tocopherol among male Japanese smokers. *Int J Epidemiol*. 1997 abr;26(2):307–14.
163. Ito Y, Sasaki R, Minohara M, Otani M, Aoki K. Quantitation of serum carotenoid concentrations in healthy inhabitants by high-performance liquid chromatography. *Clin. Chim. Acta*. 1987 nov 16;169(2-3):197–207.
164. Klipstein-Grobusch K, Launer LJ, Geleijnse JM, Boeing H, Hofman A, Witteman JC. Serum carotenoids and atherosclerosis. The Rotterdam Study. *Atherosclerosis*. 2000 ene;148(1):49–56.
165. Otani T, Iwasaki M, Ikeda S, Kozu T, Saito H, Mutoh M, et al. Serum triglycerides and colorectal adenoma in a case-control study among cancer screening examinees (Japan). *Cancer Causes Control*. 2006 dic;17(10):1245–52.
166. Tabuchi M, Kitayama J, Nagawa H. Hypertriglyceridemia is positively correlated with the development of colorectal tubular adenoma in Japanese men. *World J. Gastroenterol*. 2006 feb 28;12(8):1261–4.
167. Bird CL, Ingles SA, Frankl HD, Lee ER, Longnecker MP, Haile RW. Serum lipids and adenomas of the left colon and rectum. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 1996 ago;5(8):607–12.
168. Chung YW, Han DS, Park YK, Son BK, Paik CH, Lee HL, et al. Association of obesity, serum glucose and lipids with the risk of advanced colorectal adenoma and cancer: a case-control study in Korea. *Dig Liver Dis*. 2006 sep;38(9):668–72.
169. Hopkins PN, Williams RR. A simplified approach to lipoprotein kinetics and factors affecting serum cholesterol and triglyceride concentrations. *Am. J. Clin. Nutr*. 1981 nov;34(11):2560–90.
170. Van Gaal LF, Zhang A, Steijaert MM, De Leeuw IH. Human obesity: from lipid abnormalities to lipid oxidation. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord*. 1995 sep;19 Suppl 3:S21–26.
171. Hata Y, Nakajima K. Life-style and serum lipids and lipoproteins. *J. Atheroscler. Thromb*. 2000;7(4):177–97.
172. Wanner C, Quaschnig T. Dyslipidemia and renal disease: pathogenesis and clinical consequences. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens*. 2001 mar;10(2):195–201.

173. Geurian K, Pinson JB, Weart CW. The triglyceride connection in atherosclerosis. *Ann Pharmacother.* 1992 sep;26(9):1109–17.
174. Dursun E, Ozben T, Süleymanlar G, Dursun B, Yakupoglu G. Effect of hemodialysis on the oxidative stress and antioxidants. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2002 oct;40(10):1009–13.
175. Annuk M, Fellström B, Akerblom O, Zilmer K, Vihalemm T, Zilmer M. Oxidative stress markers in pre-uremic patients. *Clin. Nephrol.* 2001 oct;56(4):308–14.
176. Gotoh M, Nagase S, Aoyagi K, Hirayama A, Takemura K, Ueda A, et al. Thiobarbituric acid reactive substances are increased in the subcutaneous fat tissue of patients with end-stage renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1997 abr;12(4):713–7.
177. Broncel M, Koter-Michalak M, Chojnowska-Jeziarska J. [The effect of statins on lipids peroxidation and activities of antioxidants enzymes in patients with dyslipidemia]. *Prz. Lek.* 2006;63(9):738–42.
178. Thallinger C, Urbauer E, Lackner E, Graselli U, Kostner K, Wolzt M, et al. The ability of statins to protect low density lipoprotein from oxidation in hypercholesterolemic patients. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2005 dic;43(12):551–7.
179. Nakashima A, Ohtawa M, Masuda N, Morikawa H, Bando T. [Antioxidative effects of fluvastatin, and its major metabolites]. *Yakugaku Zasshi.* 1999 ene;119(1):93–9.
180. Ng K, Ogino S, Meyerhardt JA, Chan JA, Chan AT, Niedzwiecki D, et al. Relationship between statin use and colon cancer recurrence and survival: results from CALGB 89803. *J. Natl. Cancer Inst.* 2011 oct 19;103(20):1540–51.
181. Crohns M, Saarelainen S, Kankaanranta H, Moilanen E, Alho H, Kellokumpu-Lehtinen P. Local and systemic oxidant/antioxidant status before and during lung cancer radiotherapy. *Free Radic. Res.* 2009 jul;43(7):646–57.
182. Li F, Sonveaux P, Rabbani ZN, Liu S, Yan B, Huang Q, et al. Regulation of HIF-1 $\alpha$  stability through S-nitrosylation. *Mol. Cell.* 2007 abr 13;26(1):63–74.
183. Dall’Agnol M, Bernstein C, Bernstein H, Garewal H, Payne CM. Identification of S-nitrosylated proteins after chronic exposure of colon epithelial cells to deoxycholate. *Proteomics.* 2006 mar;6(5):1654–62.
184. Ogawa K, Utsunomiya T, Mimori K, Yamashita K, Okamoto M, Tanaka F, et al. Genomic screens for genes upregulated by demethylation in colorectal cancer: possible usefulness for clinical application. *Int. J. Oncol.* 2005 ago;27(2):417–26.
185. López-Boado YS, Klaus M, Dawson MI, López-Otín C. Retinoic acid-induced expression of apolipoprotein D and concomitant growth arrest in human breast cancer cells are mediated through a retinoic acid receptor RAR $\alpha$ -dependent signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 1996 dic 13;271(50):32105–11.

186. López-Boado YS, Tolivia J, López-Otín C. Apolipoprotein D gene induction by retinoic acid is concomitant with growth arrest and cell differentiation in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 1994 oct 28;269(43):26871–8.
187. Dunlop MG, Tenesa A, Farrington SM, Ballereau S, Brewster DH, Kossler T, et al. Cumulative impact of common genetic variants and other risk factors on colorectal cancer risk in 42 103 individuals. *Gut* [Internet]. 2012 abr 5 [citado 2012 abr 20]; Available a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22490517>
188. Bains M, Munir F, Yarker J, Bowley D, Thomas A, Armitage N, et al. The impact of colorectal cancer and self-efficacy beliefs on work ability and employment status: a longitudinal study. *European Journal of Cancer Care* [Internet]. 2012 feb 9 [citado 2012 abr 20]; Available a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22320237>
189. Pham NM, Mizoue T, Tanaka K, Tsuji I, Tamakoshi A, Matsuo K, et al. Physical activity and colorectal cancer risk: an evaluation based on a systematic review of epidemiologic evidence among the Japanese population. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 2012 ene;42(1):2–13.
190. Carmeli E, Bachar A, Barchad S. Biochemical assessments of total antioxidant status in active and nonactive female adults with intellectual disability. *Res Sports Med.* 2007 jun;15(2):93–101.
191. Ozcelik O, Ozkan Y, Karatas F, Kelestimur H. Exercise training as an adjunct to orlistat therapy reduces oxidative stress in obese subjects. *Tohoku J. Exp. Med.* 2005 ago;206(4):313–8.
192. Machefer G, Groussard C, Rannou-Bekono F, Zouhal H, Faure H, Vincent S, et al. Extreme running competition decreases blood antioxidant defense capacity. *J Am Coll Nutr.* 2004 ago;23(4):358–64.
193. Goto S, Naito H, Kaneko T, Chung HY, Radák Z. Hormetic effects of regular exercise in aging: correlation with oxidative stress. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2007 oct;32(5):948–53.
194. Nadziakiewicz P, Knapik P, Ziora D, Nowak D. Moderate exercise decreases nitric oxide exhalation in patients with stable coronary artery disease. *J. Physiol. Pharmacol.* 2006 sep;57 Suppl 4:213–21.
195. Chiang-Salgado MT, Casanueva-Escobar V, Cid-Cea X, González-Rubilar U, Olate-Mellado P, Nickel-Paredes F, et al. [Cardiovascular risk factors in Chilean university students]. *Salud Publica Mex.* 1999 dic;41(6):444–51.
196. Carreón Govea VC, Rivera Cisneros AE, Díaz Cisneros FJ, García González MR, Cabrera Alcaraz ME, Ramos González LA. [Maximum oxygen consumption and serum lipids in diabetics, controls, and athletes]. *Rev. Invest. Clin.* 1996 feb;48(1):5–12.
197. Kane MA, Folias AE, Wang C, Napoli JL. Ethanol elevates physiological all-trans-retinoic acid levels in select loci through altering retinoid metabolism in

- multiple loci: a potential mechanism of ethanol toxicity. *FASEB J.* 2010 mar;24(3):823–32.
198. Odermatt A. The Western-style diet: a major risk factor for impaired kidney function and chronic kidney disease. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2011 nov;301(5):F919–931.
  199. Morimoto Y, Conroy SM, Pagano IS, Franke AA, Stanczyk FZ, Maskarinec G. Influence of diet on nipple aspirate fluid production and estrogen levels. *Food Funct.* 2011 nov;2(11):665–70.
  200. Young LR, Kurzer MS, Thomas W, Redmon JB, Raatz SK. Effect of dietary fat and omega-3 fatty acids on urinary eicosanoids and sex hormone concentrations in postmenopausal women: a randomized controlled feeding trial. *Nutr Cancer.* 2011;63(6):930–9.
  201. Aubertin-Leheudre M, Hämäläinen E, Adlercreutz H. Diets and hormonal levels in postmenopausal women with or without breast cancer. *Nutr Cancer.* 2011;63(4):514–24.
  202. Cummings SR, Tice JA, Bauer S, Browner WS, Cuzick J, Ziv E, et al. Prevention of breast cancer in postmenopausal women: approaches to estimating and reducing risk. *J. Natl. Cancer Inst.* 2009 mar 18;101(6):384–98.
  203. McEneny J, McPherson P, Spence M, Bradley U, Blair S, McKinley M, et al. Does a diet high or low in fat influence the oxidation potential of VLDL, LDL and HDL subfractions? *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD* [Internet]. 2012 mar 8 [citado 2012 abr 26]; Available a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22405535>
  204. Azzini E, Polito A, Fumagalli A, Intorre F, Venneria E, Durazzo A, et al. Mediterranean Diet Effect: an Italian picture. *Nutr J.* 2011;10:125.
  205. Ben Slama F, Jebali N, Chemli R, Ben Rayana C, Achour A, Najjar MF, et al. Dietary fiber in the diets of urban Tunisian women: association of fiber intake with BMI, waist circumference and blood chemistry: preliminary study. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2011 nov;35(11):750–4.
  206. Giacosa A, Rondanelli M. The right fiber for the right disease: an update on the psyllium seed husk and the metabolic syndrome. *J. Clin. Gastroenterol.* 2010 sep;44 Suppl 1:S58–60.
  207. Ruiz-Roso B, Quintela JC, de la Fuente E, Haya J, Pérez-Olleros L. Insoluble carob fiber rich in polyphenols lowers total and LDL cholesterol in hypercholesterolemic subjects. *Plant Foods Hum Nutr.* 2010 mar;65(1):50–6.
  208. Wallström P, Wirfält E, Lahmann PH, Gullberg B, Janzon L, Berglund G. Serum concentrations of beta-carotene and alpha-tocopherol are associated with diet, smoking, and general and central adiposity. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001 abr;73(4):777–85.

209. Okita M, Hayashi M, Sasagawa T, Takagi K, Suzuki K, Kinoyama S, et al. Effect of a moderately energy-restricted diet on obese patients with fatty liver. *Nutrition*. 2001 ago;17(7-8):542–7.
210. Freudenheim JL, Graham S, Marshall JR, Haughey BP, Wilkinson G. A case-control study of diet and rectal cancer in western New York. *Am. J. Epidemiol*. 1990 abr;131(4):612–24.
211. Cross AJ, Gunter MJ, Wood RJ, Pietinen P, Taylor PR, Virtamo J, et al. Iron and colorectal cancer risk in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study. *Int. J. Cancer*. 2006 jun 15;118(12):3147–52.
212. Erhardt JG, Lim SS, Bode JC, Bode C. A diet rich in fat and poor in dietary fiber increases the in vitro formation of reactive oxygen species in human feces. *J. Nutr*. 1997 may;127(5):706–9.
213. Khajehdehi P, Taheri S. Effect of oral calcitriol pulse therapy on the lipid, calcium, and glucose homeostasis of hemodialysis-patients: its safety in a combination with oral calcium carbonate. *J Ren Nutr*. 2003 abr;13(2):78–83.
214. Kechrid Z, Hamdi M, Nazıroğlu M, Flores-Arce M. Vitamin D Supplementation Modulates Blood and Tissue Zinc, Liver Glutathione and Blood Biochemical Parameters in Diabetic Rats on a Zinc-Deficient Diet. *Biological Trace Element Research* [Internet]. 2012 mar 14 [citado 2012 abr 26]; Available a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22410949>
215. Gruber M, Chappell R, Millen A, LaRowe T, Moeller SM, Iannaccone A, et al. Correlates of serum lutein + zeaxanthin: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *J. Nutr*. 2004 sep;134(9):2387–94.
216. Devaraj S, Autret BC, Jialal I. Reduced-calorie orange juice beverage with plant sterols lowers C-reactive protein concentrations and improves the lipid profile in human volunteers. *Am. J. Clin. Nutr*. 2006 oct;84(4):756–61.
217. Teixeira V, Valente H, Casal S, Pereira L, Marques F, Moreira P. Antioxidant status, oxidative stress, and damage in elite kayakers after 1 year of training and competition in 2 seasons. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2009 ago;34(4):716–24.
218. Yeon J-Y, Kim H-S, Sung M-K. Diets rich in fruits and vegetables suppress blood biomarkers of metabolic stress in overweight women. *Preventive Medicine* [Internet]. 2011 dic 29 [citado 2012 abr 26]; Available a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22226662>
219. Cengiz O, Kocer B, Sürmeli S, Santicky M-J, Soran A. Are pretreatment serum albumin and cholesterol levels prognostic tools in patients with colorectal carcinoma? *Med. Sci. Monit*. 2006 jun;12(6):CR240–247.
220. van de Poll MCG, Klaver YLB, Lemmens VEPP, Leenders BJM, Nienhuijs SW, de Hingh IHJT. C-reactive protein concentration is associated with prognosis in patients suffering from peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. *Int J Colorectal Dis*. 2011 ago;26(8):1067–73.

221. Kocsis J, Mészáros T, Madaras B, Tóth EK, Kamondi S, Gál P, et al. High levels of acute phase proteins and soluble 70 kDa heat shock proteins are independent and additive risk factors for mortality in colorectal cancer. *Cell Stress Chaperones*. 2011 ene;16(1):49–55.
222. Kwon KA, Kim SH, Oh SY, Lee S, Han J-Y, Kim KH, et al. Clinical significance of preoperative serum vascular endothelial growth factor, interleukin-6, and C-reactive protein level in colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2010;10:203.
223. Zacharakis M, Xynos ID, Lazaris A, Smaro T, Kosmas C, Dokou A, et al. Predictors of survival in stage IV metastatic colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2010 feb;30(2):653–60.
224. Yang X-Q, Chen C, Wang F-B, Peng C-W, Li Y. Preoperative serum carcinoembryonic antigen, carbohydrate antigen19-9 and carbohydrate antigen 125 as prognostic factors for recurrence-free survival in colorectal cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev*. 2011;12(5):1251–6.
225. Basbug M, Arikanoglu Z, Bulbuller N, Cetinkaya Z, Aygen E, Akbulut S, et al. Prognostic value of preoperative CEA and CA 19-9 levels in patients with colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*. 2011 abr;58(106):400–5.
226. Hsu C-W, King T-M, Wang H-T, Wang J-H. Factors that influence survival in unresectable metastatic or locally advanced colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2011 dic;26(12):1559–66.
227. Al-Sarraf M, Baker L, Talley RW, Kithier K, Vaitkevicius VK. The value of serial carcinoembryonic antigen (CEA) in predicting response rate and survival of patients with gastrointestinal cancer treated with chemotherapy. *Cancer*. 1979 oct;44(4):1222–5.
228. Lewi H, Blumgart LH, Carter DC, Gillis CR, Hole D, Ratcliffe JG, et al. Pre-operative carcino-embryonic antigen and survival in patients with colorectal cancer. *Br J Surg*. 1984 mar;71(3):206–8.
229. Bjelakovic G, Nagorni A, Nikolova D, Simonetti RG, Bjelakovic M, Gluud C. Meta-analysis: antioxidant supplements for primary and secondary prevention of colorectal adenoma. *Aliment. Pharmacol. Ther*. 2006 jul 15;24(2):281–91.
230. Enderlin F, Gloor F. Colorectal cancer: the relationship of staging to survival. A cancer registry study of 800 cases in St. Gallen-Appenzell. *Soz Praventivmed*. 1986;31(2):85–8.
231. Schmitz-Moormann P, Himmelmann GW, Baum U, Nilles M. Morphological predictors of survival in colorectal carcinoma: univariate and multivariate analysis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 1987;113(6):586–92.
232. Jass JR. The pathological grading and staging of rectal cancer. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl*. 1988;149:21–38.

233. Roncucci L, Fante R, Losi L, Di Gregorio C, Micheli A, Benatti P, et al. Survival for colon and rectal cancer in a population-based cancer registry. *Eur. J. Cancer.* 1996 feb;32A(2):295–302.
234. Baade PD, Meng X, Youl PH, Aitken JF, Dunn J, Chambers SK. The impact of body mass index and physical activity on mortality among patients with colorectal cancer in Queensland, Australia. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2011 jul;20(7):1410–20.
235. Morikawa T, Kuchiba A, Yamauchi M, Meyerhardt JA, Shima K, Nosho K, et al. Association of CTNNB1 (beta-catenin) alterations, body mass index, and physical activity with survival in patients with colorectal cancer. *JAMA.* 2011 abr 27;305(16):1685–94.
236. Prizment AE, Anderson KE, Visvanathan K, Folsom AR. Association of inflammatory markers with colorectal cancer incidence in the atherosclerosis risk in communities study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2011 feb;20(2):297–307.
237. van de Poll-Franse LV, Haak HR, Coebergh JWW, Janssen-Heijnen MLG, Lemmens VEPP. Disease-specific mortality among stage I-III colorectal cancer patients with diabetes: a large population-based analysis. *Diabetologia* [Internet]. 2012 abr 24 [citado 2012 abr 30]; Available a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22526616>
238. Dehal AN, Newton CC, Jacobs EJ, Patel AV, Gapstur SM, Campbell PT. Impact of diabetes mellitus and insulin use on survival after colorectal cancer diagnosis: the Cancer Prevention Study-II Nutrition Cohort. *J. Clin. Oncol.* 2012 ene 1;30(1):53–9.
239. Garrett CR, Hassabo HM, Bhadkamkar NA, Wen S, Baladandayuthapani V, Kee BK, et al. Survival advantage observed with the use of metformin in patients with type II diabetes and colorectal cancer. *Br. J. Cancer.* 2012 abr 10;106(8):1374–8.
240. Noto H, Goto A, Tsujimoto T, Noda M. Cancer Risk in Diabetic Patients Treated with Metformin: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS ONE.* 2012;7(3):e33411.
241. Yamagishi S, Nakamura K, Inoue H, Kikuchi S, Takeuchi M. Possible participation of advanced glycation end products in the pathogenesis of colorectal cancer in diabetic patients. *Med. Hypotheses.* 2005;64(6):1208–10.
242. Luo W, Cao Y, Liao C, Gao F. Diabetes mellitus and the incidence and mortality of colorectal cancer: A meta-analysis of twenty four cohort studies. *Colorectal Dis* [Internet]. 2011 nov 5 [citado 2012 abr 30]; Available a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22053841>
243. Turner MC, Chen Y, Krewski D, Ghadirian P, Thun MJ, Calle EE. Cancer mortality among US men and women with asthma and hay fever. *Am. J. Epidemiol.* 2005 ago 1;162(3):212–21.



244. Auerbach A, Hernandez ML. The effect of environmental oxidative stress on airway inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2012 abr;12(2):133–9.
245. Wang H, Rothenbacher D, Löw M, Stegmaier C, Brenner H, Diepgen TL. Atopic diseases, immunoglobulin E and risk of cancer of the prostate, breast, lung and colorectum. *Int. J. Cancer*. 2006 ago 1;119(3):695–701.
246. Prizment AE, Folsom AR, Cerhan JR, Flood A, Ross JA, Anderson KE. History of allergy and reduced incidence of colorectal cancer, Iowa Women's Health Study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 2007 nov;16(11):2357–62.
247. Hacker U, Hallek M, Kubicka S. [Multimodality therapy of colorectal cancer]. *Internist (Berl)*. 2010 nov;51(11):1366–73.

***ANEXO I***

## ANEXO I

### I. LÁCTEOS

		CANTIDAD	NUNCA	AÑO	MES	SEMANA	DÍA
1	Leche entera	1 taza, 200cc					
2	Leche desnatada ¿enriquecido? ¿con qué?	1 taza, 200cc					
3	Leche semidesnatada	1 taza, 200cc					
4	Leche condensada	1 cucharada					
5	Nata o crema de leche	½ taza					
6	Batidos de leche	1 vaso 200cc					
7	Yogur entero ¿enriquecido? ¿con qué?	1, 125g					
8	Yogur desnatado ¿enriquecido? ¿con qué?	1, 125g					
9	Petit suisse	1, 100g					
10	Requesón o cuajada	½ taza					
11	Queso en porciones o cremoso	50g					
12	Queso semicurado o curado (Manchego, bola, Emmental,..)	50 g					
13	Queso fresco o blanco (burgos, cabra,...)	50 g					
14	Natillas, flan, pudin	1 taza, 200cc					
15	Helado	1 cucurucho					

## **II. HUEVOS, CARNES, PESCADOS**

(Un plato o ración de 110g, excepto cuando se indique)

		CANTIDAD	NUNCA	AÑO	MES	SEMANA	DÍA
1	Huevos de gallina	1					
2	Pollo o pavo con piel	1 ración					
3	Pollo o pavo con piel	1 ración					
4	Carne de ternera o vaca negra (añojo muy magro, espaldilla, filetes de lomo, babilla, falda, costillas delanteras, redondo, solomillo, paletilla)	1 ración					
5	Carne de ternera o vaca grasa (filetes de pecho, papada,...)	1 ración					
6	Carne de cerdo magra (lomo, cuartos trasero,...)	1 ración					
7	Carne de cerdo grasa (costilleja, costillas traseras,...)	1 ración					
8	Carne de cordero	1 ración					
9	Conejo o liebre	1 ración					
10	Hígado (ternera, cerdo, pollo)	1 ración					
11	Otras vísceras (sesos, molleas, corazón,...)	1 ración					
12	Jamón serrano, jamón cocido, paletilla	50g					
13	Carnes procesadas (salchichón, chorizo, morcilla,	50g					

	mortadela, salchichas,...)						
14	Patés, foi-gras	25g					
15	Hamburguesas	1 (50g)					
16	Tocino, bacon	2 lonchas, 50g					
17	Pescado blanco: mero, lenguado, besugo, merluza, pescadilla,...	1 ración					
18	Pescado azul: sardinas, atún, bonito, caballa, salmón,...	1 ración de 130 g					
19	Pescados ahumados: salmón, trucha,...	1 ración de 60g en seco					
20	Pescados salados: bacalao, salazones,...	1 ración de 60g en seco					
21	Ostras, almejas, mejillones y similares	½ docena					
22	Calamares y plpo	1 ración de 200g					
23	Crustáceos, gambas, langostinos	4 o 5 piezas (200g)					

### III. VEGETALES

(Un plato o ración de 250g, excepto cuando se indique)

		CANTIDAD	NUNCA	AÑO	MES	SEMANA	DÍA
1	Acelgas, espinacas	1 ración					
2	Col, coles de Bruselas, coliflor, brócoles, repollo	1 ración					
3	Endivias, lechuga, escarola	1 ración					
4	Tomate crudo	1 (150g)					
5	Zanahoria, calabaza	1 ración					
6	Judías verdes	1 ración					
7	Berenjenas, calabacines, pepinos	1 ración					
8	Pimientos, cebolla	150g					
9	Remolacha, nabos	1 ración					
10	Espárragos	1 ración					
11	Gazpacho andaluz	1 taza (200cc)					
12	Patatas fritas	1 ración de 150g					
13	Patatas cocidas, asadas	1 ración de 150g					
14	Setas, níscalos, champiñones	1 ración de 90g					

#### IV. FRUTAS

		CANTIDAD	NUNCA	AÑO	MES	SEMANA	DÍA
1	Naranja, pomelo, Kivi, mandarina (2 piezas).	1 pieza					
2	Plátano	1 pieza					
3	Manzana o pera	1 pieza					
4	Fresas o fresones	6 unidades, 1 plato de postre					
5	Cerezas, picotas	1 plato de postre					
6	Melocotón, albaricoque, nectarina	1 pieza					
7	Piña	2 rodajas					
8	Higos, brevas	1 pieza					
9	Sandía, melón	Una raja de 200g					
10	Uvas	1 racimo					
11	Aceitunas	10 unidades					
12	Fruta en almíbar	2 unidades					
13	Frutas conservadas en su jugo	2 unidades					
14	Almendras, nueces, avellanas	50g					
15	Cacahuetes, anacardos, pistachos, pipas de girasol	50g					
16	Dátiles, higos secos, uvas, pasas, ciruelas, pasas	150 g					

**V. LEGUMBRES**

(Un plato o ración de 60g en crudo)

		CANTIDAD	NUNCA	AÑO	MES	SEMANA	DÍA
1	Lentejas	1 ración					
2	Garbanzos	1 ración					
3	Alubias (pintas, blancas o negras)	1 ración					
4	Guisantes	1 ración					
5	Soja y derivados (brotes, tofu,...)	1 ración					



## VI. CEREALES

		CANTIDAD	NUNCA	AÑO	MES	SEMANA	DÍA
1	Pan blanco	3 rebanadas (60g)					
2	Pan integral	3 rebanadas (60g)					
3	Pan blanco de molde ¿enriquecido? ¿con qué?	3 rebanadas (60g)					
4	Pan integral de molde ¿enriquecido? ¿con qué?	3 rebanadas (60g)					
5	Cereales de desayuno	30g en seco					
6	Arroz blanco	60g en seco					
7	Pasta: espagueti, macarrones, fideos,... ¿con huevo?	60g en seco					
8	Pizza	1 ración de 200g					
9	Maíz cocido y desgranado						

## **VII. GRASAS Y ACEITES**

(Una cucharada)

		CANTIDAD	NUNCA	AÑO	MES	SEMANA	DÍA
1	Aceite de oliva	1 cucharada					
2	Aceite de girasol ¿enriquecido con vitamina E?	1 cucharada					
3	Aceite de maiz	1 cucharada					
4	Aceite de soja	1 cucharada					
5	Mezcla de los anteriores	1 cucharada					
6	Margarina ¿Recuerda la marca? ¿Flora, Flora Pro-activ, Artúa, Tulipán,...?	1 cucharada					
7	Mantequilla	1 cucharada					
8	Manteca	1 cucharada					

### VIII. DULCES Y PASTELES

		CANTIDAD	NUNCA	AÑO	MES	SEMANA	DÍA
1	Galletas tipo María	4 a 6 unidades (50g)					
2	Galletas de chocolate	4 unidades (50g)					
3	Croissant, ensaimada, donuts	1 (50g)					
4	Magdalenas	1 a 2 unidades (50g)					
5	Pasteles	1 (50g)					
6	Churros, porras y similares	1 ración de 100g					
7	Chocolate, bombones	30g					
8	Chocolate en polvo	1 cucharada					
9	Chocolatinas y bollos con chocolate						
10	Turrón	1/8 de barra, 40g					
11	Pastas, mazapán, mantecados	1 ración de 90g					

### IX. BEBIDAS

		CANTIDAD	NUNCA	AÑO	MES	SEMANA	DÍA
1	Vino blanco, tinto, rosado	1 vaso de 100cc					
2	Vino dulce	1 copa de 50cc					
3	Cerveza	1 jarra de 330cc					
4	Licores o anisetes	1 copa de 50cc					
5	Destilados: whisky, ginebra, coñac,...	1 copa de 50cc					
6	Bebidas carbonatadas bajas en calorías	1 botellín de 200cc					
7	Bebidas carbonatadas con azúcar	1 botellín de 200cc					
8	Zumo de naranja natural	1 vaso de 200cc					
9	Zumos naturales de otras frutas	1 vaso de 200cc					
10	Zumos de frutas envasadas	1 vaso de 200cc					
11	Horchata	1 vaso de 200cc					
12	Café descafeinado	1 taza de 50cc					
13	Café	1 taza de 50cc					

### **X. PRECOCINADOS O PREELABORADOS**

		CANTIDAD	NUNCA	AÑO	MES	SEMANA	DÍA
1	Croquetas	3 unidades					
2	Palitos de merluza, pescado empanado	3 unidades					
3	Buñuelos	3 unidades					
4	San Jacobo	1 unidad					
5	Sopas y cremas de sobre	1 plato o sobre					
6	Empanadillas	3 unidades					
7	Otros (especificar)						

### **XI. MISCELANEOS**

		CANTIDAD	NUNCA	AÑO	MES	SEMANA	DÍA
1	Mostaza	1 cucharadita de postre					
2	Mayonesa	1 cucharadita de postre					
3	Salsa de tomate	½ taza					
4	Picante (pimientos, tabasco,...)						
5	Sal	Una pizca					
6	Mermeladas	1 cucharadita					
7	Azúcar	1 cucharadita					
8	Miel	1 cucharadita					
9	Especias: albahaca, clavo, orégano, tomillo, romero, cebolla picada, comino, curry,... ¿fresco o en polvo?						

## **XII. VITAMINAS**

1. Durante el año pasado ha tomado usted vitaminas o minerales

- Vitaminas:

- Minerales:

- Ambos:

2. Indique la marca de las vitaminas y/o minerales que ha tomado.

3. Indique durante cuanto tiempo ha tomado vitaminas y/o minerales y con qué frecuencia.