

Universidad de la República
Licenciatura en Biología Humana

Informe final de Pasantía de Grado

Título: Cultivo y análisis citogenético de muestras de cáncer colorrectal en el Uruguay.

Estudiante: Búrix Hégard MECHOSO CASTRO

Tutora: Prof. Em. Dra. Elia NUNES

Orientadora: Prof. Adj. Dra Faride UTURBEY

Lugar de realización: Instituto de Genética Médica-Hospital Italiano

Resumen:

El cáncer colorrectal (CCR) ha sido uno de los principales modelos de estudios genéticos de tumorigénesis por la facilidad de la obtención de muestras y la correlación epidemiológica, histopatológica y genética. Los avances en citogenética y biología molecular han impactado fuertemente en su diagnóstico, terapéutica, pronóstico y sobrevida.

Se planteó hacer estudios citogenéticos de CCR en 30 pacientes con adenocarcinomas esporádicos sin tratamiento previo.

Se realizaron cultivos primarios de CCR cuyas preparaciones citogenéticas fueron sometidas a bandedo cromosómico y análisis microscópico. La información obtenida permitió valorar los perfiles cromosómicos de pacientes uruguayos y compararlos con datos internacionales y correlacionarlos con su sobrevida.

Los tumores presentaron anomalías clonales tanto estructurales como numéricas. Excepto el cromosoma 2 todos los cromosomas estuvieron involucrados en ganancias como pérdidas clonales. Se detectaron 38 bandas cromosómicas involucradas en reordenamientos estructurales clonales en la mayoría de los pares. Las anomalías más frecuentes en estas bandas fueron isocromosomas de 8q10, 17q10 y 10q10, translocaciones a nivel de 13q12 y 19p13, deleciones de 1p34 y 3q23. Las pérdidas parciales se localizaron mayormente en 1p, 3q, 8p y 17p. Se aplicó técnica citomolecular-FISH en un caso para su redefinición. Se observaron asociaciones teloméricas (tas) que no fueron sometidas a un análisis cuantitativo exhaustivo. Los hallazgos cromosómicos con los datos a nivel internacional no mostraron diferencias significativas descriptivas ni con la aplicación de test no paramétricos ($p > 0.05$). Las variables clínico-patológicas y los cariotipos hallados muestran una distribución global respecto a los tiempos de sobrevida con perfiles similares a los encontrados habitualmente en análisis hechos mediante el método de Kaplan-Meier para CCR. Los reordenamientos recurrentes en la serie analizada llevaron a considerar posibles genes candidatos, oncogenes y genes supresores de tumores, que podrían estar involucrados en el desarrollo del CCR. Las tas elevadas hacen plantear este fenómeno de inestabilidad cromosómica como un elemento más de la progresión tumoral. La mayoría de los CCRs analizados revelaron cariotipos aneuploides y reordenamientos complejos, hecho de inestimable valor para comprender la progresión tumoral y discernir a nivel molecular. Su posible aplicación en el área clínico-asistencial seguramente ayudará en la comprensión de la correlación genotipo-fenotipo.

Palabras claves: cultivo de tumores - reordenamientos cromosómicos – cáncer colorrectal - curvas de sobrevida – inestabilidad genómica -

1. INTRODUCCIÓN

CÁNCER COLORRECTAL: EPIDEMIOLOGÍA, DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO

El CCR es uno de los tumores más comunes en los países desarrollados; aunque su incidencia es muy variable en todo el mundo, es la neoplasia más frecuente del tubo digestivo (Cohen y cols. 1989; Ferlay y cols., 2015). En los Estados Unidos, el cáncer colorrectal es la tercera causa principal de muertes relacionadas con el cáncer en las mujeres y los hombres (American Cancer Society, 2019). En el Uruguay el CCR es una de las principales causas de muerte, ocupando el segundo lugar con un 12.86 % del total luego del cáncer de pulmón (Vasallo y Barrios, 1999), lo que hace que una octava parte de la población del país esté muriendo por esta enfermedad; superado únicamente por las enfermedades cardiovasculares (OPS, 1994), lo que continúa siendo un verdadero problema de salud pública (OPS, 2017). En este contexto, encontramos que los tumores digestivos (especialmente los colorrectales), ocupan en cuanto a mortalidad, el segundo lugar en mujeres y tercero en hombres, con porcentajes de 14.65 y 11.44 respectivamente (Barrios y cols., 2015). Referente a la incidencia el CCR ocupa el tercer lugar en hombres (38.01 %) y el segundo lugar en mujeres (27.65 %) (Barrios y Garau, 2017). Esta neoplasia aparece con mayor frecuencia entre la quinta y la séptima décadas de la vida. En un pequeño porcentaje de casos, el diagnóstico se efectúa en edades inferiores a los 40 años, habitualmente en el contexto de formas hereditarias. En relación a su localización, el 23% de estas neoplasias afectan al recto, el 10% a la unión recto-sigmoidea, el 25% al sigmoideas, el 6% al colon descendente, el 13% al colon transversal, el 8% al colon ascendente y el 15% al ciego. El cáncer de recto es más frecuente en varones, mientras que el de colon derecho afecta más frecuentemente a las mujeres.

Existen múltiples evidencias que apoyan la participación de factores tanto genéticos como ambientales en la patogenia del CCR. Mediante estudios de ligamiento genético ha sido posible identificar el gen APC (adenomatous polyposis coli), situado en el brazo largo del cromosoma 5, como el responsable de la poliposis colónica familiar. De manera similar, ha sido posible determinar algunos de los genes responsables del CCR hereditario no ligado a la poliposis (HNPCC). Esta entidad, anteriormente denominada síndrome de Lynch, presenta un patrón hereditario autosómico dominante y se caracteriza por el desarrollo precoz (habitualmente antes de los 50 años de edad) de un carcinoma colorrectal, de predominio en el colon derecho, y una elevada tendencia a presentar lesiones sincrónicas o metacrónicas, así como neoplasias de otro origen (endometrio, estómago, páncreas, sistema urinario, ovario, vías biliares, intestino delgado). Cuando se asocia a neoplasias extraintestinales se denomina síndrome de Lynch tipo II o síndrome de cáncer familiar para diferenciarlo del síndrome de Lynch tipo I en el cual la alteración neoplásica se halla limitada al intestino grueso. Histológicamente se caracteriza por la presencia de abundante moco y un bajo grado de diferenciación celular. El diagnóstico de esta forma de cáncer hereditario se establece a partir de la historia familiar y su definición se basa en los criterios establecidos inicialmente en la reunión de Ámsterdam (Vasen y cols., 1991) y con una amplia proyección actual (Umar y cols., 2004; DA Silva y cols., 2016; Dominguez-Valentin y cols., 2019).

Desde un punto de vista molecular, esta entidad se caracteriza por la existencia de múltiples mutaciones somáticas que afectan de manera preferente a fragmentos repetidos de ADN (microsatélites) distribuidos a lo largo del genoma. Este fenómeno, denominado inestabilidad de microsatélites, traduce la acumulación de errores en la replicación del ADN, los cuales son consecuencia de mutaciones en los genes responsables de su reparación. La identificación de mutaciones germinales en estos genes –MSH2, MLH1, PMS1, PMS2, MSH6– ha permitido definir la base genética de esta enfermedad (Duval y Hamelin; 2003; Gologan y Sepulveda; 2005; Poulogiannis y cols., 2010; Yamamoto y Imai; 2015; De' Angelis y cols., 2018). En lo que respecta al CCR esporádico, diversos estudios han establecido algunas de las alteraciones génicas que acontecen a lo largo de la secuencia adenoma-carcinoma (Leslie y cols., 2002). En este modelo secuencial, el desarrollo neoplásico reflejaría la activación de determinados oncogenes (K-RAS) y la inhibición de diversos genes supresores de tumor (APC, DCC, TP53), siendo la acumulación de alteraciones, independientemente del orden en que se han adquirido, la responsable del proceso de transformación. Por otra parte, en estos pacientes es habitual hallar la presencia de antecedentes familiares de esta neoplasia. Este subgrupo, al que se tiende a denominar CCR familiar para así distinguirlo de las formas inequívocamente hereditarias, representa el 25-50% del total de casos de cáncer de colon y recto (Lynch y cols., 2004; Evrard y cols., 2019; Pellat y cols., 2019). En la actualidad no se conoce el mecanismo responsable de esta agregación familiar, aunque probablemente constituye un trastorno genético complejo o multifactorial. En él, la carga genética (mutaciones o polimorfismos) definiría la susceptibilidad para la transformación neoplásica, mientras que los factores ambientales modularían dicha susceptibilidad para determinar qué individuos finalmente desarrollarán la enfermedad. En los países occidentales, el riesgo global de desarrollar CCR a lo largo de la vida es del 5%.

Sin embargo, existen diversos grupos que presentan un riesgo incrementado debido a características epidemiológicas y patogénicas propias:

1. CCR hereditario no ligado a poliposis (HNPCC). Dado que se trata de una enfermedad hereditaria con un patrón autosómico dominante, aproximadamente el 50% de los hijos de individuos afectados desarrollarán esta neoplasia. En ausencia de diagnóstico molecular, este grupo viene definido por los criterios de Ámsterdam.

2. Poliposis cólica familiar. Se trata de una enfermedad hereditaria autosómica dominante, definida por la presencia de múltiples pólipos adenomatosos a lo largo del intestino grueso. En aquellos individuos que desarrollan esta enfermedad, el riesgo de presentar CCR a los 50 años de edad es superior al 90%.

3. Antecedentes familiares de CCR. Si se excluyen las formas hereditarias mencionadas anteriormente, los individuos con antecedentes familiares de CCR presentan un riesgo de padecer esta enfermedad entre 2 y 6 veces superior al de la población general, en función del número de familiares afectados, el grado de parentesco y la edad de diagnóstico de la neoplasia.

4. Antecedentes familiares de adenoma colónico. El riesgo de CCR aumenta cuando existen antecedentes familiares de pólipos adenomatosos colónicos, especialmente si el diagnóstico de éstos se efectuó antes de los 60 años.

5. Enfermedad inflamatoria del intestino. Los individuos afectados de colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn de localización colónica presentan un riesgo incrementado de CCR. Este riesgo aumenta en función de la extensión y la duración de la enfermedad.

6. Antecedente personal de CCR. El diagnóstico de CCR comporta un mayor riesgo de presentar una segunda neoplasia en esta localización, ya sea de manera sincrónica o a lo largo del seguimiento (metacrónica).

7. Antecedente personal de adenoma colónico. En la actualidad está bien establecido que el adenoma colónico constituye una lesión premaligna. La probabilidad de transformación carcinomatosa aumenta en relación al tamaño de la lesión y a la proporción del componente veloso.

8. Antecedente personal de otras neoplasias. Diversas neoplasias, entre ellas las de endometrio y ovario, constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de una segunda neoplasia de localización colorrectal.

9. Edad. En individuos sin otros factores predisponentes, el riesgo de padecer CCR antes de los 40 años es bajo. A partir de esta edad, el riesgo aumenta progresivamente, duplicándose la incidencia con cada década y alcanzando un máximo entre los 75 y los 80 años.

Alrededor del 95% de los cánceres colorrectales son adenocarcinomas. En la unión anorrectal es posible hallar carcinomas de células escamosas o carcinomas originados a partir del epitelio de transición (carcinoma cloacogénico). Desde el punto de vista macroscópico puede distinguirse entre los adenocarcinomas de forma polipoide, más frecuentes en el colon ascendente, y los de forma anular o estenosante, que predominan en el colon izquierdo. La extensión del tumor a través de la pared intestinal y a órganos vecinos, de interés pronóstico evidente, fue clasificada en diversos estadios por Dukes en 1935, siendo revisada por Dukes y Bussey (1958) y posteriormente modificada por Astler y Coller (1954) (Deans y cols., 1992).

Las vías de diseminación más frecuentes del CCR son:

1. Diseminación linfática, que suele ocurrir progresivamente según un orden anatómico ascendente en los ganglios que acompañan a los vasos colónicos. Alrededor del 40% de los casos presentan afección ganglionar en el momento del diagnóstico.
2. Diseminación sanguínea, a través de los vasos de la pared colorrectal y, mediante el drenaje venoso portal, al hígado, que es el órgano más frecuentemente afectado por metástasis en el cáncer de colon. Los tumores del tercio inferior del recto drenan en la cava inferior, por lo cual pueden causar metástasis pulmonares, óseas, cerebrales, etc., en ausencia de metástasis hepáticas.
3. Diseminación por contigüidad, que puede determinar invasión y/o fistulización de órganos vecinos como asas intestinales, vejiga urinaria, vagina, etc.
4. Siembra peritoneal, poco frecuente pero de muy mal pronóstico.

El CCR no suele dar síntomas hasta fases avanzadas. Ello condiciona que la mayoría de pacientes presenten tumores que han invadido toda la pared intestinal y/o han afectado los ganglios regionales. La tasa de supervivencia a 5 años de personas con estadio localizado de CCR es del 90 %. Alrededor del 39 % de los pacientes reciben el diagnóstico en este estadio temprano. Si el cáncer se ha diseminado hacia los tejidos o los órganos circundantes o los ganglios linfáticos regionales, la tasa de supervivencia a 5 años es del 71 %. Si el cáncer se ha diseminado a partes distantes del cuerpo, la tasa de supervivencia a 5 años es del 14 %. Sin embargo, en los pacientes que tienen solo 1 tumor o algunos tumores que se han diseminado desde el colon o el recto hacia los pulmones o el hígado, la extirpación quirúrgica de estos tumores puede eliminar el cáncer, lo cual mejora considerablemente la tasa de supervivencia a 5 años para estos pacientes (ASCO, 2019). Otros factores adicionales que comportan un peor pronóstico son: edad (diagnóstico antes de los 40 años o después de los 70 años), sexo (varones), presencia de complicaciones relacionadas con el tumor (perforación, obstrucción) o enfermedades asociadas, estado general del paciente, tamaño del tumor, afección de órganos adyacentes, grado de diferenciación, invasión vascular, linfática o perineural, concentración de CEA (Antígeno Carcino Embrionario) en el momento del diagnóstico y presencia de aneuploidía y de deleciones en TP53 y DCC. No obstante, es importante señalar que existen resultados contradictorios en relación a todos estos factores predictivos y que, a menudo, su valor pronóstico depende del propio estadio tumoral (Cohen y cols., 1993; Gallois y cols., 2018).

CONSIDERACIONES GENERALES DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS EN CCR

A pesar de la utilización de marcadores histológicos y tumorales, el manejo de los pacientes con esta enfermedad aún es difícil y su pronóstico es de certeza variable. El análisis de anomalías genéticas adquiridas constituye un prometedor camino de búsqueda de información no solamente acerca de los eventos de la tumorigénesis en general sino también de la agresividad inherente a cada una de las neoplasias en particular.

La detección de tales cambios corresponde al menos a tres niveles de resolución:

- 1) Celular, por los clásicos métodos citológicos o medidas del ADN total por citometría de flujo.
- 2) Citogenético, por el análisis microscópico de los cromosomas metafásicos.
- 3) Génico o de la estructura primaria del ADN, utilizando técnicas de genética molecular.

De la interacción del conocimiento molecular y de la correlación histopatológica y epidemiológica se ha elaborado un modelo de carcinogénesis colorrectal en donde por primera vez el desarrollo de la secuencia de eventos en estadios múltiples ha sido redefinido en términos moleculares (Fearon y Vogelstein, 1990). Los científicos siguen buscando las causas y las formas de prevenir el CCR, mejores maneras para detectarlo temprano (cuando es más fácil de tratar), así como las formas de mejorar los tratamientos (Deckker y cols., 2019).

Un tumor o neoplasia es la manifestación final de un conjunto de errores a nivel genético y/o epigenéticos que inciden a nivel celular y especialmente en el sistema inmunológico (Chen y Melman; 2017; Thorsson y cols., 2018) otorgando a la célula patológica una ventaja de crecimiento selectivo sobre las normales. La gravedad de la enfermedad neoplásica impulsó a numerosos grupos de investigación a encontrar los fundamentos de una teoría capaz de explicar el mecanismo de la carcinogénesis (Sigston y Williams, 2017). A nivel tumoral los elementos genéticos alterados se relacionan con la regulación del crecimiento; pueden estimularlo, en el caso de los oncogenes o inhibirlo, para lo cual intervienen los antioncogenes o genes supresores de tumor. Los cambios genéticos incluyen cualquiera de las formas de mutación conocidas, las puntuales, como las transiciones (cambio de una base nitrogenada por otra) y las transversiones (reemplazo de una purina por una pirimidina y viceversa) o aquellas que puedan afectar largos fragmentos del genoma. Las deleciones que implican la eliminación de uno o más nucleótidos sucesivos pueden ser causa del corrimiento del marco de lectura así como los rearrreglos citogenéticos en los cuales un segmento cromosómico se escinde y reubica en otra posición. La amplificación de genes conduce a la aparición de un número elevado de copias del mismo gen. Todas estas formas de mutación podrían coexistir en una sola célula tumoral y su número se incrementaría con el tiempo, proceso que podría verse favorecido por una disminución de la capacidad de reparación de errores de la célula transformada debido a cambios en su ciclo de proliferación. Estos daños otorgarían a la célula una ventaja de crecimiento selectivo sobre las normales lo que conduciría a un desbalance progresivo de los sistemas de control del ciclo celular en su conjunto (Geurts van Kessel, 2014).

CICLO CELULAR. SU PARTICIPACIÓN EN EL DESARROLLO NEOPLÁSICO

La proliferación celular es la base del desarrollo del organismo humano a partir del cigoto según un modelo de divisiones celulares en el que cada tipo celular se divide cuando y cuanto debe. Simultáneamente, es también la raíz del primero de los procesos que origina un cáncer: el crecimiento descontrolado de un grupo de células. La serie de procesos (a veces también el período que abarca) por los que una célula da lugar a dos células hijas se denomina ciclo celular y consta de cuatro fases: G1, S, G2 y M. En su conjunto, y aunque hay variaciones, el ciclo completo comprende aproximadamente 24 horas (Masagué, 2004) como se ilustra en la Figura 1.1.

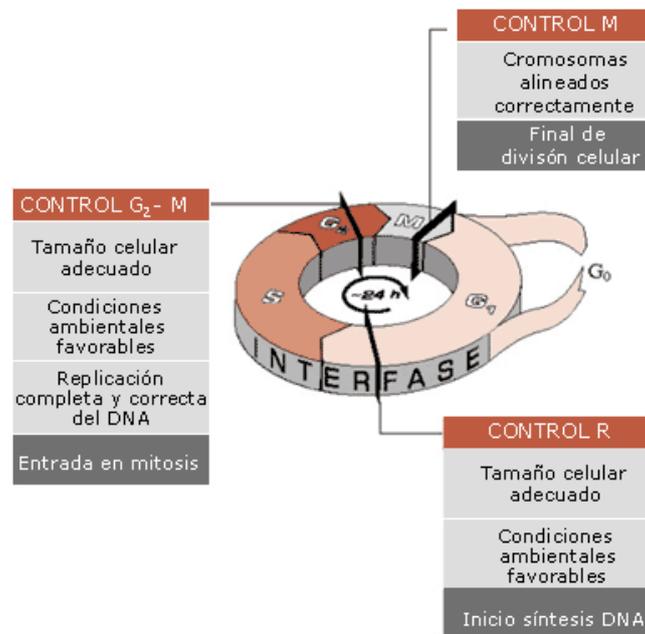


Figura 1.1 Ciclo celular y puntos de restricción (modificado de Rajagopalan y Lengauer, 2004).

La fase G₁ (del inglés ‘Gap’ o intervalo) es el período de 6-12 h que sigue a una división celular y es previo a la síntesis o replicación del ADN. Durante este tiempo, la célula dobla su tamaño y masa debido a la continua síntesis de todos sus componentes como resultado de la expresión de los genes que codifican las proteínas responsables de su fenotipo particular. Hay células que pueden detener su progresión hacia la división en este estadio y permanecer durante días, meses o años en estado de reposo sin aumento de masa, en lo que se ha denominado fase G₀. En la fase G₁ existe un punto de control llamado el punto de restricción R en el que la célula comprueba que ha generado la masa necesaria para continuar el ciclo y comenzar la síntesis de ADN y, asimismo, que las condiciones ambientales son favorables: presencia de nutrientes, sales y temperatura adecuadas; y de factores que induzcan crecimiento. Es el punto de control más importante. La fase S (de ‘Síntesis’ del ADN) corresponde al tiempo (6-8 h) durante el cual se replica el material hereditario. Cada cromosoma pasa a tener dos cromátidas, es decir, dos moléculas de ADN de cadena doble, que son copia una de la otra. El período comprendido entre la finalización de la replicación del ADN y el inicio de la división celulares la fase G₂ (3-4 h). Durante ella, las células se preparan para la escisión en dos células hijas. En esta fase existe un segundo punto de control G₂-M, en el que la célula debe comprobar dos condiciones antes de dividirse: 1) que la masa celular se ha duplicado a fin de poder dar origen a dos células hijas y 2) que la replicación del ADN se ha completado y que sólo lo ha efectuado una vez. Finalmente, las células entran en la fase de mitosis M (1 h) propiamente dicha. El ADN se condensa enormemente constituyéndose en los cromosomas haciéndose visibles al microscopio óptico como entidades individuales, y los microtúbulos se organizan a partir de dos cuerpos polares que se sitúan en ambos extremos de la célula y forman el huso acromático que va a servir como guía a los cromosomas. En primer lugar, desaparece la membrana nuclear (profase). A continuación, los cromosomas se unen por los cinetocoros, unas estructuras asociadas a sus centrosomas, a los microtúbulos en la zona media celular formando la placa ecuatorial (metafase). En este momento existe otro punto de control M, que sólo permite seguir adelante si todos los

cromosomas están alineados sobre el huso. Si esto es así, las cromátidas hermanas se separan dirigiéndose cada una hacia un polo de la célula (anafase). Cuando llegan a los extremos (telofase), la célula comienza a escindirse (citocinesis) por la zona media dando lugar a dos células hijas (Hameroff, 2004). La membrana nuclear vuelve a formarse y los cromosomas a decondensarse, originándose dos células hijas idénticas, en principio, a la progenitora. La existencia de puntos de control del ciclo celular es clave ya que permiten que todo el proceso tenga lugar cuando la célula está correctamente preparada comprobando (puntos de control R, G2-M y M) que existen las condiciones necesarias para iniciar una nueva fase (Kastan y Bartek, 2004). Asimismo, sirven de freno durante el ciclo, asegurando que una fase no se inicia antes de que la anterior haya finalizado, y hacen factible el control del ciclo por señales externas. Existen controles negativos de la proliferación, potencialmente muy importantes para la prevención del cáncer, que se activan para frenar el ciclo cuando se ha dañado la integridad del genoma y evitar así la aparición de células con potencial neoplásico. Muchos carcinógenos químicos y radiaciones actúan dañando el ADN o el sistema de microtúbulos necesario para la mitosis. Sin embargo, también causas internas pueden ocasionar alteraciones en el ADN, como los procesos de reordenamientos genéticos que tienen lugar durante el desarrollo, o los procesos de apoptosis o muerte celular programada, cuando las células tienen un ADN parcialmente degradado por acción de nucleasas que producen cortes en la molécula, o cuando las células están envejeciendo y se acortan los extremos de sus cromosomas o telómeros (Pathak y cols., 1988; De Lange y cols., 1990) provocando su inestabilidad (Plentz y cols., 2005). Estos controles, que coinciden con los puntos de control R y G2-M del ciclo, son críticos para evitar la inestabilidad genética que pueda llevar a la aparición de cáncer.

PROCESO TUMORAL COLORRECTAL: EL CÁNCER COMO PROCESO EVOLUTIVO

MUTACIÓN Y SELECCIÓN

El concepto de progresión tumoral fue descrito por Foulds en 1954 y reconsiderado por Rubin 40 años más tarde (Foulds, 1954; Rubin, 1994). Foulds definió la progresión como la adquisición en múltiples pasos (proceso multistep) de cambios que conferirían características malignas a las células y, si bien se ha avanzado mucho en el conocimiento del cáncer, sobretodo a nivel molecular, el concepto de progresión multistep aún sigue vigente (Heppner y Miller, 1998; Bordonaro, 2019). El cáncer se considera una enfermedad causada por la acumulación de múltiples alteraciones genéticas, las cuales se van adquiriendo progresivamente a lo largo de la vida de los individuos, lo que hace que la probabilidad de desarrollar cáncer aumente exponencialmente con la edad (Muñoz, 1997). La adquisición de alteraciones genéticas se rige por los principios de mutación y selección que gobiernan la evolución de todos los organismos, por lo cual se sostiene que el cáncer es un proceso evolutivo (Hellman, 1997; Purushotham y Sullivan, 2010). La forma más simple de explicar este concepto es la ilustrada en la Figura 1.2. Las células pueden sufrir mutaciones debido a la exposición a carcinógenos o bien por errores en los procesos de replicación, reparación o división del ADN. Estas mutaciones somáticas son heredadas por las células hijas. La mayoría son irrelevantes para la

vida de la célula, pueden ser deletéreas debido a la pérdida de un gen crítico para la viabilidad celular o bien son blanco por las modificaciones que expresan de mecanismos de vigilancia inmunológica que las eliminan. Puede ocurrir, ocasionalmente, que alguna de estas mutaciones confiera una ventaja selectiva a las células descendientes de manera que, proliferen más que las células normales o bien tengan una muerte celular reducida. De esta manera, este grupo de células predominará por encima del resto (expansión clonal). A continuación puede ocurrir otra mutación en alguna de estas células que, de nuevo, le proporcione una ventaja adicional a ella y su progenie. Así, por rondas sucesivas de mutación y selección, esta clona en expansión podrá adquirir progresivamente las características de invasión, angiogénesis y metástasis que caracterizan a los tumores (Boland y Ricardiello, 1999; Calabrese y cols., 2004; Liggett y DeGregori, 2017).

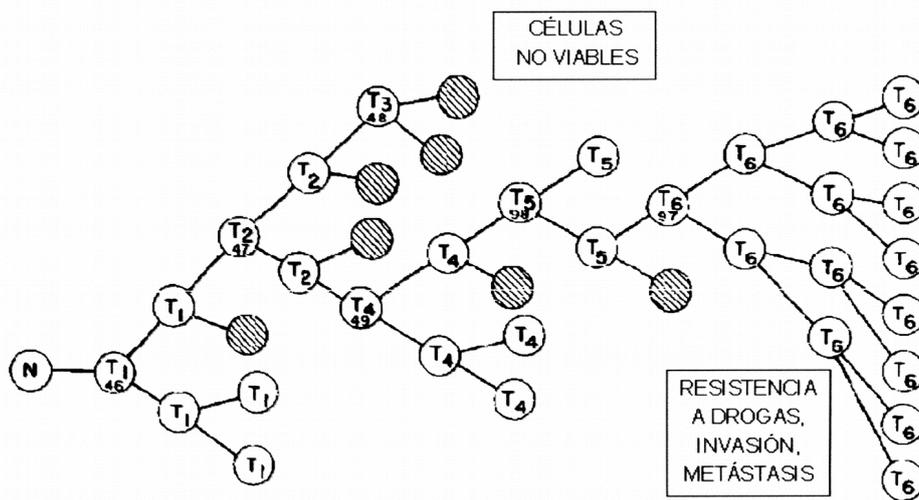


Figura 1.2. Modelo de progresión tumoral como proceso evolutivo (modificado de Nowell, 1976)

Dado que la causa del cáncer es la acumulación de alteraciones genéticas, en los últimos decenios se han realizado grandes esfuerzos por identificar los genes responsables de estas alteraciones. Dichos genes normalmente se clasifican en dos tipos: oncogenes y genes supresores de tumores. Los oncogenes promueven el crecimiento celular y los genes supresores de tumor lo inhiben. Los oncogenes codifican para elementos de las cascadas de transmisión de señales, que van desde los estímulos de crecimiento fuera de la célula hasta la transcripción de genes dentro del núcleo. Por este motivo, para que promuevan el desarrollo del tumor las mutaciones en estos genes tienen que ser de ganancia de función o activadoras. En cambio los genes supresores de tumor codifican para proteínas que actúan como barreras para la proliferación celular y controlan el mantenimiento de la estructura del ADN. Las mutaciones en estos genes son de pérdida de función o inactivadoras y, salvo excepciones, se tienen que producir en los dos alelos del gen (Ross, 2000; Levine y Puzio-Kuter, 2010; Zielińska y Katanaev, 2019). Los estudios de pérdida de heterocigosidad (Loss of Heterozygosity, LOH) permiten identificar zonas del genoma en las que se producen pérdidas alélicas y, por tanto, son susceptibles de contener genes supresores de tumores. En estos genes ya se ha dado la pérdida de un alelo y es esperable, siguiendo la hipótesis de Knudson (1971) que la segunda copia del gen también se encuentre mutada. Es decir, el hecho de que en un tumor la mayoría de las células hayan perdido el alelo de un gen sugiere que esa alteración ha sido seleccionada porque da una ventaja selectiva a las células. Por tanto

es lógico suponer la existencia en esa zona de un gen supresor que ha perdido su función por deleción de un alelo y por mutación del otro. El primer modelo de progresión tumoral en el que se consiguió integrar el concepto de progresión multistep con la identificación de alteraciones genéticas concretas fue el propuesto por el grupo de Vogelstein para el CCR, en 1988 (Vogelstein y cols., 1988). Gracias a la disponibilidad de tumores en diferentes momentos de progresión y al análisis de las alteraciones genéticas en cada etapa fue posible establecer una secuencia de alteraciones que se asociaba con las diferentes etapas del proceso tumorigénico.

EL MODELO DE VOGELSTEIN

Diversos estudios sugieren que los cánceres colorrectales surgen de adenomas, los cuales son clonales, es decir, se han originado a partir de una sola célula. Esto es consistente con la hipótesis de que una mutación somática determina que unas pocas células de las criptas intestinales inicien el proceso neoplásico por expansión clonal (Fearon y Jones, 1992). Los adenomas gradualmente progresan aumentando en tamaño y displasia, hasta que dan origen a carcinomas y luego a metástasis. El proceso global se estima que dura décadas (Fearon y Vogelstein, 1990). Aunque es un proceso continuo, para facilitar la elaboración del modelo se fraccionó en las siguientes etapas: epitelio normal, adenoma temprano, intermedio y tardío, carcinoma y metástasis. Los autores determinaron la presencia de cuatro alteraciones genéticas diferentes (LOH en 5q, 17p, 18q y mutación en K-RAS) en muestras de varios pacientes. El razonamiento seguido para asociar las alteraciones a las diferentes etapas y la secuencia ordenada del proceso se muestran en la Figura 1.3.

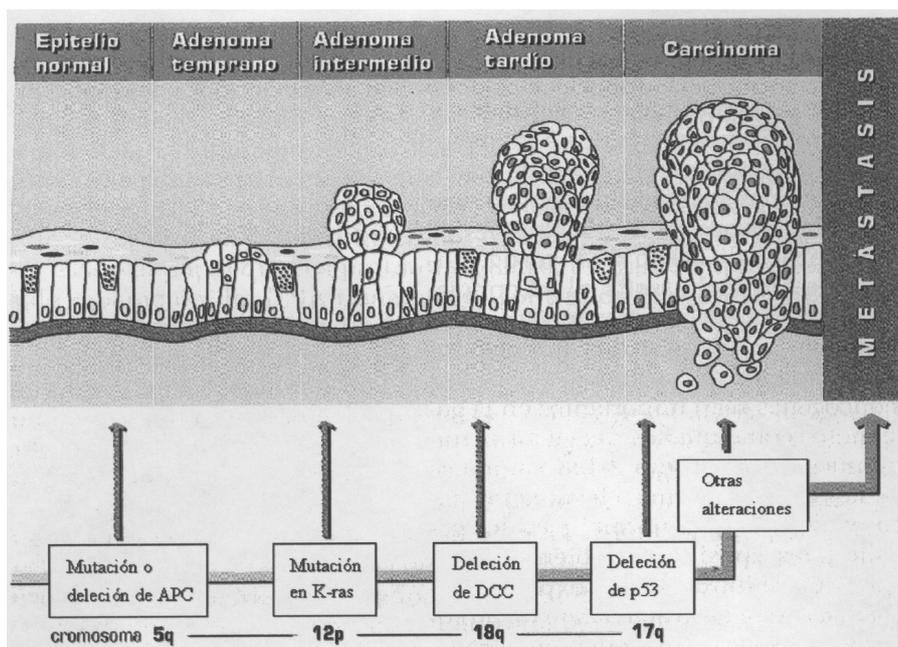


Figura 1.3. Modelo integrado de progresión del carcinoma colorrectal de Fearon y Vogelstein (modificado de Muñoz, 1997).

Según Fearon y Vogelstein (1990), las características principales de este modelo son:

- 1) Los tumores colorrectales se originan como resultado de mutaciones de oncogenes y genes supresores de tumor, predominando los últimos;
- 2) Se requiere al menos mutaciones en cuatro o cinco genes para la formación de un tumor;
- 3) Aunque las alteraciones genéticas ocurren en una secuencia preferente, es la acumulación total de cambios, más que su orden, lo que determina las propiedades biológicas del tumor.

Casi treinta años después, el modelo de Vogelstein se sigue considerando válido para ilustrar el concepto multistep de la progresión tumoral (características 1 y 3), pero es necesario hacer algunas puntualizaciones. En primer lugar, hay que tener en cuenta que la secuencia de alteraciones propuesta es el resultado de un análisis estadístico en el que las alteraciones de tumores de diferentes pacientes se agrupan para formar un único modelo del proceso. Por tanto no implica que en un mismo individuo deban darse todas las alteraciones genéticas y, menos aún, en el orden descrito. De hecho, ninguna alteración se observó en todos los tumores analizados y menos del 10 % de los carcinomas mostraron las cuatro alteraciones de forma simultánea (Shackney y Shankey, 1997). En segundo lugar, el modelo propone la existencia de una vía única de progresión, aunque actualmente se conocen como mínimo dos vías alternativas (Lengauer y cols., 1997) y algunas investigaciones aportan otras (Derks y cols., 2008).

Por último, el modelo sugiere la necesidad de al menos cuatro o cinco mutaciones para originar un tumor, pero no analiza la tasa de aparición de mutaciones ni propone ningún mecanismo que explique su acumulación. Sin embargo, los tumores poseen una característica fundamental que es clave: la inestabilidad genómica. Este concepto es fundamental para explicar la progresión tumoral y sienta las bases para entender las vías concretas de progresión que actúan en el CCR. En conclusión, una versión actualizada del modelo de Vogelstein debería proponer la disrupción de determinadas vías moleculares (más que la activación/inactivación de genes específicos) como requisitos necesarios para conferir a la célula características neoplásicas (Tang y cols., 2004; Beggs y Hodgson, 2008; Morán y cols., 2010; Bogaert y Prenen; 2014).

ALTERACIONES MOLECULARES MÁS FRECUENTES EN EL CÁNCER COLORRECTAL

En los últimos 30 años ha avanzado mucho el conocimiento de los genes implicados en la progresión del tumor colorrectal. Si bien se han descrito muchos genes nuevos, los cuatro enumerados inicialmente como los más importantes siguen conservando un papel prioritario. Las revisiones hechas (Laurent-Puig, 1999; Arends, 2000; Lievre y Laurent-Puig, 2004; Markowitz y Bertagnolli, 2009; Juárez-Vázquez y Rosales-Reynoso; 2014; Tiwari y cols., 2018; Tsai y cols., 2018;) subrayan la gran complejidad de sus funciones y el elevado grado de interacción entre ellas.

Se exponen brevemente las características de los elementos genéticos principales:

APC: localizado en 5q21-q22; se encuentra mutado en un 60 % de los cánceres colorrectales. Codifica para una proteína citoplasmática multifuncional que interacciona con varias proteínas que están implicadas en la cascada de transducción de señal Wntless-Wnt. Entre ellas se encuentra la β -catenina que se asocia con factores de transcripción de la familia Tcf. En el tejido normal APC induce la degradación de β -catenina, lo que estimula la actividad de los Tcf. El resultado final de esta activación resulta ser un aumento de la expresión de la oncoproteína c-myc (Teh y cols., 1999). Además la β -catenina se asocia a la porción intracelular de cadherina, una proteína transmembrana. La porción extracelular se une a otra cadherina que protruye de otra célula vecina, estableciendo así una unión intercelular. De esta manera APC simultáneamente influencia las propiedades adhesivas de la célula y su proliferación, lo que explica que las pérdidas de este gen permita a las células epiteliales del colon iniciar una proliferación descontrolada (Boland, 1997; Hankey y cols., 2018; Ren y cols., 2019).

K-RAS: aproximadamente el 40 % de los carcinomas colorrectales presentan mutación en K-RAS, ubicado a nivel de 12p21-1. K-RAS, como los otros genes de la familia ras, codifica para una proteína de transducción de señal que se encuentra en la cara interna de la membrana celular. En su estado inactivo k-ras une GDP. Pero la estimulación del receptor al que está asociada cambia GDP por GTP y se activa, iniciando la cascada de señales intracelulares. La hidrólisis de GTP a GDP inactiva a k-ras de nuevo, completando el ciclo (Boland, 1997). El producto mutado de k-ras es menos sensible a la acción de hidrólisis y por tanto mantiene un estado prolongado de activación. Como k-ras está implicada en la vía EGFr-ras-RAF-ERK-JUN/FOS, la cual generalmente conduce señales estimuladoras, el mutante hiperactivo de k-ras induce la proliferación celular. Además k-ras hiperactivada puede fosforilar pro-caspasa 9, inhibiendo la apoptosis inducida por el citocromo-c (Arends, 2000; Goel y cols., 2015; Nussinov y cols., 2016; Levi y cols., 2018; Kastrisiou y cols., 2019).

DCC, SMAD2, SMAD4 (18q21-q23): las pérdidas alélicas de 18q ocurren en más de un 70% de los cánceres colorrectales (Vogelstein y cols., 1988). El primer gen supresor de tumor que se pensó que estaba involucrado en las deleciones de 18q fue DCC (Deleted in Colorectal Cancer). DCC codifica un receptor para netrina-1, una proteína transmembrana implicada en la guía de axones. La relevancia de este producto génico en la tumorigénesis del CCR no es clara y, además, los resultados respecto a las alteraciones de DCC en tumores colorrectales son contradictorios (Laurent-Puig, 1999). Paralelamente dos genes supresores de tumores se descubrieron en 18q: SMAD2 y SMAD4. La prevalencia de mutaciones en CCR es aproximadamente del 25 % en el caso de SMAD4 y menos de un 10 % para SMAD2. Ambos genes codifican proteínas que son componentes de la vía de transducción de señal del TGF β y se regulan por fosforilación. Transducen la señal de activación desde la superficie celular hasta el núcleo, a donde se translocan y regulan las respuestas transcripcionales interactuando específicamente con proteínas de unión al ADN. Como las señales del TGF β normalmente resultan en inhibición del ciclo celular y diferenciación

celular parece lógico pensar que defectos en estos genes jueguen un papel importante en la tumorigénesis (Laurent-Puig, 1999; Arends, 2000; Michel y cols., 2001; Lievre y Laurent-Puig, 2004; Mehlen y Goldschneider, 2005; Popat y Houlston, 2005; Laurent-Puig y cols., 2010; Mehlen y Tauszig-Delamasure; 2014).

TP53: localizado a nivel de 17p13.1, es el gen más frecuentemente mutado en el cáncer. Se estima que aproximadamente el 37 % de todos los cánceres tienen mutaciones en este gen, siendo la prevalencia para CCR del 50 % (Greenblatt y cols., 1994; Calistri, 2005). La principal función de p53 consiste en proteger a las células del daño genómico, lo cual le ha valido el atributo de 'guardián del genoma'. Para realizar esa función p53 ejerce dos tipos de controles: negativo (inhibición) sobre el ciclo celular y positivo (activación) sobre la apoptosis. p53 es un factor de transcripción que en células normales se expresa a bajos niveles y tiene una vida media de 15 minutos. Si se produce daño genómico aumenta la cantidad de p53 debido a una prolongación de su vida media. Como consecuencia se incrementa la expresión de la proteína p21 la cual inhibe la actividad de los complejos ciclina-CDK durante la fase G1 del ciclo celular. p21 también bloquea la replicación mediante la inhibición de la PCNA (Protein Cell Nuclear Antigen) que es una unidad de la ADN polimerasa. De esta manera se evita la división de la célula hasta que el daño en el ADN haya sido reparado y así se impide la generación de células hijas con mutaciones. Si el daño en el ADN es excesivo e imposible de reparar entonces p53 induce apoptosis (muerte celular programada). Los mecanismos que usa aún no están claros pero posiblemente existan varias vías que puedan ser dependientes o independientes de transcripción. Se ha propuesto que niveles elevados de p53 causan la inducción de BAX (activador de apoptosis) y la represión paralela de BCL-2 (inhibidor de apoptosis) (Muñoz, 1997). Por otra parte p53 también se encarga de activar la transcripción del gen MDM2, cuya proteína se une a p53 y promueve su destrucción, actuando como un sistema de regulación negativa (Picksley y Lane, 1993). Las mutaciones más importantes que se encuentran en TP53 son de cambio de sentido (missense), las cuales producen proteínas anormales que tienen alteradas algunas de sus capacidades, como la unión al ADN, y también mutaciones sin sentido (nonsense) y deleciones que producen una proteína truncada o ausencia de proteína. Muchas de las mutaciones missense hacen que la proteína sea más estable (aunque inactiva) lo que aumenta su concentración, de manera que puede ser detectada por técnicas inmunohistoquímicas. Sin embargo, la asociación entre inmunohistoquímica y mutaciones en TP53 es variable y no todas las mutaciones resultan en estabilización de la proteína, ni toda la proteína estabilizada refleja una mutación del gen (Wilson, 1997). Por otra parte, múltiples experimentos demuestran que las mutaciones en TP53 se asocian con aneuploidía lo cual es consistente con la idea de que la inactivación de p53 facilita la adquisición de nuevas mutaciones y la progresión hacia la aneuploidía (Livingstone y cols., 1992; Agapova y cols., 1996; Mekeel y cols., 1997; Laurent-Puig, 1999). Dado que los cambios genéticos impulsan la progresión de adenoma a carcinoma y probablemente influyen en la susceptibilidad individual y la respuesta al tratamiento, la mutación del gen p53 es un evento clave en la carcinogénesis de muchos tipos diferentes de tumores. Cómo la función adecuada de los genes reguladores del ciclo celular contribuye al mantenimiento de la estabilidad del genoma y cómo su mutación en el cáncer vincula obligatoriamente la proliferación y la inestabilidad cromosómica lo

ha transformado en una fuente constante de revisión hasta el presente (Binefa y cols., 2014; Li y cols., 2015; Puerta-García y cols., 2015; Kobayashi y cols., 2017; Tsimigras y cols., 2018; Deepa y cols., 2019).

HALLAZGOS CITOGENÉTICOS EN TUMORES SÓLIDOS

Un tema clave es el concerniente a la secuencia de eventos que ocurren entre el daño cromosómico inicial y la adquisición del comportamiento maligno por la célula y sus descendientes; el crecimiento clonal parece ser el resultado de una evolución de cambios secuenciales (Nowell, 1976; Janiszewska y Polyak, 2015; Krzywinski, 2016). Lo que hoy sabemos sobre el desarrollo de los tumores es fruto de la convergencia de varias líneas de investigación, la más antigua de las cuales todavía se basa en la cuidadosa observación de las células presuntamente transformadas al microscopio. Theodor Boveri trabajando en Würzburg, Alemania, hizo una serie de observaciones en las que basó sus ideas acerca del origen y naturaleza del cáncer, apareciendo la conclusión de su trabajo en una monografía publicada en 1914. Boveri concluyó de tales observaciones que las células malignas portaban cromosomas anormales y que cualquier hecho que originase este tipo de alteraciones podría causar el cáncer (Boveri, 1914; Wolf, 1974; Holland y Cleveland, 2009; Duesberg, 2014; Hirpara y cols., 2018).

En las últimas décadas se ha acumulado una gran cantidad de información citogenética de una amplia variedad de desórdenes neoplásicos. Hacia principios de los años noventa se habían investigado aproximadamente quince mil casos de neoplasmas con técnicas de bandeado cromosómico, de los cuales 68 % correspondían a leucemias, 11 % eran linfomas y 21 % pertenecía a tumores sólidos, en su mayoría provenientes de mama, pulmón, próstata, colon y ovario. Se podría pensar entonces que deberíamos conocer mucho más de los aspectos citogenéticos y moleculares de estas patologías más frecuentes, pero de hecho en esta área la emergencia del conocimiento ha sido mucho más lenta. (Mitelman et al. 1990; Duensing y Duensing, 2010; Vitre y Cleveland, 2012; Bastians, 2015; Cosenza y Krämer, 2016; De Wolf y Kops, 2017). La razón de la modestia del conocimiento de la citogenética en el diagnóstico y el pronóstico de los tumores sólidos se encuentra en parte en la aparición de problemas técnicos (Cooley y Wilson, 2013). A partir de los años ochenta se desarrollan nuevos métodos para el análisis citogenético de tumores sólidos (Kusyk y cols. 1979; Wan, 2014). Como consecuencia de ello, desde 1983 hasta 1990, el incremento de tumores sólidos investigados fue de quinientos a tres mil (Mandahl, 1992), aumentando sensiblemente en los siguientes 20 años (Nanjangud y cols., 2011) alcanzando actualmente a unos setenta mil casos publicados en la base de datos de Mitelman (2019).

Una serie de problemas analíticos disminuyen el valor de los datos disponibles:

- 1) La calidad de los cromosomas en los tumores sólidos, en particular los de origen epitelial, es a menudo sub-óptima, por lo que muchos de los casos publicados están cariotipados parcialmente;
- 2) En contraste con los tumores hematológicos, que tienen pocos cambios citogenéticos, los tumores sólidos ya tienen al momento del diagnóstico una gran cantidad de aberraciones

adquiridas durante la progresión tumoral. La diferenciación entre cambios esenciales patogénicamente primarios y aberraciones evolutivamente secundarias es, por regla, más difícil en tumores sólidos que en tumores de origen hematológico. En consecuencia, se requiere la caracterización citogenética de un mayor número de tumores para establecer la relevancia de las anomalías tanto tempranas como las relacionadas a la progresión tumoral así como establecer cuáles son recurrentes y/o específicas;

- 3) Un creciente número de tumores epiteliales, en particular carcinomas de la cavidad oral (Jin y col, 1990; Jin y col, 1993), colon (Bardi y col, 1995a), piel (Mertens y col, 1991) y mama (Pandis y col, 1995) parecen estar caracterizados por heterogeneidad cariotípica clonal lo que dificulta su análisis y la interpretación (Gorunova y cols., 1995; Grade y cols., 2015).

Esta situación determina la importancia de complementar los datos citogenéticos con técnicas moleculares y citomoleculares, a fin de lograr una mejor caracterización de estos tumores.

CITOGÉNÉTICA DE LA PROGRESIÓN DEL FENOTIPO TUMORAL COLORRECTAL

El modelo de tumores del intestino grueso ofrece posibilidades únicas para evaluar todos los estadios de la carcinogénesis ya que las lesiones benignas precursoras, los adenomas, también pueden ser identificados y muestreados con facilidad. A final del siglo pasado más de 100 de tales adenomas con aberraciones cromosómicas ya habían sido informados (Mitelman, 1994). Los primeros estudios (Mitelman y cols., 1974; Reichmann y cols., 1985) parecían indicar que la ganancia de cromosomas totales eran las aberraciones predominantes. Estudios posteriores (Coutourier-Turpin y cols., 1992; Bardi y cols., 1993a; Griffin y cols., 1993; Longy y cols., 1993; Bomme y cols., 1994; Muleris y cols., 1994) han permitido una mejor definición de las características cariotípicas de los tumores colorrectales benignos y ha sufrido de un considerable refinamiento. Los trabajos de Bardi y cols. (1993b) y Bomme y cols. (1994), así como también de estudios no publicados, han determinado que más del 80% de los pólipos de intestino grueso portan anomalías cromosómicas clonales. Otros investigadores han informado porcentajes menores de adenomas anormales: 30% (Griffin y cols., 1993) y 50% (Longy y cols., 1993; Muleris y cols., 1994). Si bien en todas las series la mayoría de los pólipos presentó anomalías del cariotipo [90% en la experiencia de Bardi y cols. (1997)] habitualmente se observan pocas anomalías citogenéticas con cariotipos pseudodiploides o cercanos a la diploidía. En el resto de los casos, se han descrito células triploides o con cariotipos cercanos a la triploidía con importantes cambios a nivel cromosómico, a menudo anomalías que son recurrentes en adenomas colorrectales. Al presente no podemos identificar un patrón cariotípico simple que sea capaz de distinguir inequívocamente entre tumores colorrectales malignos y benignos (Simon y cols., 2015)

ANÁLISIS CROMOSÓMICOS DE LOS ADENOMAS COLORRECTALES

La anomalía cromosómica más frecuente en los pólipos colorrectales es la trisomía del par 7 (+7) hallada en aproximadamente 40% de todos los casos informados, en general como la única alteración (Mitelman, 1994). Aunque la relevancia patogénica de esta neoplasia del intestino grueso (Bardi y cols., 1991) y tumores de otros tejidos (Johansson y cols., 1993) ha sido cuestionada, los recientes hallazgos de esta trisomía en el componente epitelial de pólipos adenomatosos por análisis cromosómico con bandeado en células metafásicas (Bardi y cols., 1995^b) y por hibridación in situ con sondas centroméricas específicas en células interfásicas (Herbergs y cols., 1994) apoyan la sugerencia inicial (Becher y cols., 1983; Ochi y cols., 1983) respecto de su rol primario en muchas neoplasias colorrectales. El gen denominado DRA (downregulated in adenomas) ha sido localizado en la región 7q22-q31.1 y se ha demostrado su expresión específica en la mucosa colónica (Schweinfest y col, 1993; Tagushi y col, 1994). La sobreexpresión del mismo podría ser una importante respuesta de la trisomía 7. Entre otros genes candidatos están los oncogenes MUC3 y MET que se localizan en 7q22 (Fox y cols., 1991). Si bien, la actual implicancia de algunos de estos loci génicos es aún enteramente especulativa, la presencia de una copia extra de algún cromosoma particular puede traducirse en un cambio en el potencial de crecimiento suficiente para precipitar una transformación neoplásica. La ganancia de un cromosoma 13 es la segunda anomalía numérica más común en los adenomas del intestino grueso y ha sido hallada en casi el 30% de los casos. En frecuencia descendente le siguen la ganancia de los cromosomas 20 (17%), 8 (15%), 14 (13%) y la pérdida del cromosoma 18 (13%) (Bardi y cols., 1997). Cada uno de estos cambios ha sido detectado ocasionalmente como la única anomalía. Si bien la pérdida del cromosoma 18 podría obrar a través de la pérdida de un alelo DCC, SMAD4 o SMAD2 (Fearon y cols., 1990; Laurent-Puig, 1999; Arends, 2000; Lievre y Laurent-Puig, 2004). Una deleción del brazo corto del cromosoma 1 es el reordenamiento estructural más común en los pólipos intestinales (Couturier-Turpin y cols., 1992; Bardi y cols., 1993b; Longy y cols., 1993; Bomme y cols., 1994; Muleris y cols., 1994). El grupo escandinavo de Bardi y cols. (1997) lo ha observado en 30% de los casos con cariotipo anormal, a menudo como la única anomalía, lo cual los ha conducido a sugerir que esto es un cambio genético temprano en el desarrollo de los tumores del intestino grueso. Esta deleción varía de tamaño de un tumor a otro, pero siempre influye la pérdida de la banda 1p36 (Bardi y cols., 1993b) lo que indicaría que un gen supresor putativo de tumores mapearía sobre esta banda. La evidencia que corroboró tal efecto provino de un estudio que mostró la pérdida de tumorigenicidad de una línea celular de carcinoma colorrectal tras la introducción en su genoma de un segmento 1p36 normal (Tanaka y cols., 1993). En este contexto adquiere particular relevancia el hallazgo en un modelo de tumorigénesis colorrectal en ratón, en el cual la pérdida en una región en el cromosoma 4 (homólogo de la región 1p36 en humanos) es un evento temprano del desarrollo tumoral, lo que puede considerarse como una pista clave en la asignación de un gen responsable (Dietrich y cols., 1993). Finalmente, el desbalance o la pérdida alélica de un alelo distal en 1p fue hallado en un 20% de los pólipos analizados por análisis de ADN (Lothe y cols., 1995; Couturier-Turpin y cols., 2001). Entre los tumores colorrectales benignos con pérdida de 1p36 no solo hay adenomas, sino también pólipos hiperplásicos los cuales no presentan atipia celular. En el momento actual no se sabe con

certeza si esta entidad nosológica también tiende a la formación de carcinomas (Jass y Path, 1989; Longacre y Fenoglio-Preiser, 1990; Hamilton, 1992). Los datos citogenéticos indican que estos tipos de pólipos son neoplasmas genuinos, con rasgos cariotípicos similares a aquellos de los pequeños adenomas tubulares (Bomme y cols., 1994). Las deleciones del brazo corto del cromosoma 1 son vistas también en los carcinomas del intestino grueso, aunque no con la misma frecuencia y a menudo con fragmentos perdidos de mayor tamaño que en los adenomas. Generalmente la deleción 1p en los carcinomas está acompañada por otras anomalías, pero existen casos en los que ha sido el único cambio cariotípico observado. Se ha sugerido que los tejidos adenomatosos remanentes hallados en los tumores pudieron albergar células con deleciones 1p como único cambio cromosómico (Bardi y cols., 1995^a; Zhou y cols., 2004).

ANÁLISIS CITOGÉNÉTICO-MOLECULAR DE LOS CARCINOMAS COLORRECTALES

En la mayor serie publicada de carcinomas colorrectales investigados citogenéticamente se observaron aberraciones cromosómicas clonales en la mayoría de los casos (Bardi y cols., 2004). No obstante, una pequeña fracción de alrededor del 10% de los tumores presenta un complemento cromosómico normal. Este hecho no excluye la presencia de reordenamientos genómicos submicroscópicos o que las células examinadas fueran de origen estromal. El número cromosómico modal de los CCRs varía desde próximo a la diploidía hasta la pentaploidia. Más de la mitad de los casos descritos presentan cariotipos cercanos a la diploidía o pseudodiploides lo cual es consistente con los hallazgos de la citometría de flujo en donde un alto porcentaje de los carcinomas colorrectales son diploides (Bauer y cols., 1987; Halvorsen y cols., 1990). Los carcinomas con número cromosómico próximo a la triploidía generalmente poseen ambos tipos de reordenamientos, numéricos y estructurales, aunque han sido descritos unos pocos tumores con anomalías numéricas exclusivamente (Bardi y cols., 1995^a).

Las anomalías numéricas más comunes son la pérdida del cromosoma 18 (26%), ganancia del cromosoma 7 (25%), pérdida del Y (15%), ganancia del 20 (14%), pérdida del 17 (13%), ganancia del 13 y pérdida de los cromosomas 14 y 22 (cada uno de ellos observados en aproximadamente un 12% del total de tumores con anomalías). Con la excepción del cromosoma Y, todos los cromosomas se hallan implicados en reordenamientos estructurales en los carcinomas colorrectales. Las anomalías estructurales más comunes son i(8)(q10), i(17)(q10), del(17)(p11), i(13)(q10), i(1)(q10) y del(1)(p13). La consecuencia neta de estos reordenamientos es la pérdida de 1p y la ganancia de 1q, la pérdida de 8p y la ganancia de 8q, pérdida de 13p y ganancia de 13q y pérdida de 17p con ganancia de 17q. Aunque las anomalías mencionadas se repiten en la mayoría de las series publicadas de CCRs caracterizados citogenéticamente, sus frecuencias varían considerablemente (Reichmann y cols., 1981; Ferti y cols., 1988; Muleris y cols., 1990; Konstantinova y cols., 1991; Wang y cols., 1992; Bardi y cols., 1993^a; Bardi y cols., 1995^a; Höglund y cols., 2002; Zhou y cols., 2004). Los factores técnicos y estocásticos indudablemente juegan un rol en la aparición de tal variabilidad (Pandis y cols., 1994), pero las diferencias sistemáticas relacionadas a la composición de las series examinadas podrían ser importantes (Fernebrot y cols., 2002; Piard y cols., 2002).

La aparición en las últimas décadas de las técnicas citogenéticas moleculares han permitido resolver algunos problemas inherentes a la citogenética clásica (como la necesidad de obtener metafases de buena calidad), a lo que se vieron enfrentados los primeros investigadores que utilizaron el bandeamiento cromosómico para diferenciar longitudinalmente e identificar con mayor definición los cromosomas humanos (Drets y Shaw, 1971), y han rellenado el gap de resolución existente entre el nivel de estudio citogenético (megabases) y las técnicas de biología molecular (pares de bases) (Ried y cols., 1997). Entre ellas, las más importantes son la Hibridación Genómica Comparada (CGH), la hibridación in situ fluorescente (FISH) y las técnicas de cariotipado multicolor: SKY (Spectral Karyotyping) y FISH multiplex (M-FISH), cuya combinación ha permitido avances relevantes en el análisis de los tumores sólidos y líneas celulares (Chen y Nierman, 1994; Masramon y cols., 2000; Tsushimi y cols., 2001; Grade y cols., 2006).

La Hibridación Genómica Comparada (CGH) consiste en una hibridación competitiva entre ADN normal y tumoral, cada uno marcado con un fluorocromo e hibridados en metafases normales (Kallioniemi y cols., 1993). Las diferencias de color a lo largo de los cromosomas permiten la detección de regiones con pérdida o ganancia en el ADN del tumor. Es una técnica especialmente adecuada para el análisis de los tumores sólidos porque nos da información global de las alteraciones empleando ADN genómico. La CGH ha contribuido a la confirmación de muchos de los hallazgos previos con los métodos citogenéticos clásicos (Muleris y cols., 1990; Bardi y cols., 1995a). Adicionalmente, permitió incrementar el conocimiento de las alteraciones cromosómicas presentes en los tumores sólidos en general y en especial en el CCR, donde se ha podido identificar alteraciones cromosómicas recurrentes y no aleatorias, incluyendo pérdidas y/o ganancias de cromosomas o de regiones cromosómicas y amplificaciones génicas (Ried y cols., 1996; Meijer y cols., 1998; Nakao y cols., 1998; De Angelis y cols., 1999; Georgiades y cols., 1999). Aunque no se han efectuado análisis de sobrevida en la mayoría de los estudio se ha podido demostrar que el número de alteraciones cromosómicas aumenta a medida que progresa la enfermedad, ya sea comparando adenomas con carcinomas (Ried y cols., 1996; Meijer y cols., 1998), diferentes estadios de Dukes en los CCRs (De Angelis y cols., 1999) o carcinomas con metástasis (Al-Mulla y cols., 1999; Knösel y cols., 2002). Además, los tumores aneuploides exhiben más alteraciones cromosómicas que los tumores diploides (De Angelis y cols., 1999) y el número de alteraciones están positivamente correlacionados con el índice de ADN tumoral (Meijer y cols., 1998). Estudios que combinan CGH y citometría de flujo con la determinación de inestabilidad de microsatélites han hallado un subgrupo de tumores cercanos a la diploidía que no muestran inestabilidad de microsatélites ni alteraciones cromosómicas, lo que sugiere que los mismos seguirían una vía de progresión diferente (Georgiades y cols., 1999; Chan y cols., 2001; Zoratto y cols., 2014).

Las técnicas de FISH consisten en la hibridación de sondas de ADN marcadas con fluorocromos sobre cromosomas metafásicos o en núcleos interfásicos (Gozzetti y Le Beau, 2000). Son de gran utilidad para detectar anomalías específicas, aunque de menor valor en la búsqueda de nuevos reordenamientos y han permitido una mejor caracterización de los CCRs (Obara y cols., 2001) y la evaluación de los fenómenos de clonalidad y heterogeneidad tumoral (Nanashima y cols., 1996; Lengauer y cols., 1997; Di Vinci y cols., 1999; Bomme y cols., 2001; Roschke y cols., 2002), logrando una mejor caracterización de anomalías específicas. Las técnicas derivadas del FISH de cariotipado multicolor (SKY y M-FISH) permiten el análisis

simultáneo del complemento cromosómico completo, por lo que se las puede emplear para detectar nuevas aberraciones cromosómicas específicas de tumores (Schrock y Padilla-Nash, 2000). Se basan en la hibridación de 24 sondas de 'chromosome painting' marcadas diferencialmente sobre metafases tumorales, visualizándose simultáneamente mediante análisis de imagen porque cada par cromosómico se ha pintado con un color fluorescente diferente. Esta metodología ha contribuido a una mejor identificación de las aberraciones cromosómicas (Melcher y cols., 2000) y a la detección de inestabilidad cromosómica (Ghadimi y cols., 2000; Abdel-Rahman y cols., 2001; Tsushimi y cols., 2001; Roschke y cols., 2002) en estudios de CCR. No obstante, de manera similar a las técnicas citogenéticas clásicas, el cariotipado multicolor requiere de metafases de buena calidad cromosómica, lo que lo limita en el análisis de tumores sólidos.

CARIOTIPO Y SITIO TUMORAL

El análisis de correlación entre cariotipo y sitio tumoral (Bardi y cols., 1995^a; Frattini y cols., 2004; Gervaz y cols., 2004) mostró diferencias estadísticamente significativas. Los carcinomas rectales presentan cariotipos anormales con mayor frecuencia que los de colon. Por otra parte los carcinomas del colon distal son citogenéticamente normales más a menudo que los pertenecientes al colon proximal. Se halló que el número cromosómico modal tenía una alta correlación con el sitio tumoral. Mientras que tumores cercanos a la diploidía, triploidía y tetraploidía se localizaban de preferencia en el colon distal, los tumores con aberraciones múltiples fueron menos comunes en el colon proximal y en el recto. Otros autores han encontrado más tumores anormales en el recto que en el colon (Reichmann y cols., 1982; Muleris y cols., 1990). El análisis de ADN por citometría de flujo ha mostrado que los carcinomas del colon proximal son comúnmente diploides a diferencia de los distales (Delattre y cols., 1989; Barreton y cols., 1991; Costa y cols., 1992).

CARIOTIPO E HISTOLOGIA TUMORAL

Se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa entre el cariotipo de los CCRs y sus grados de diferenciación cuando los tumores citogenéticamente anormales eran divididos entre los que presentaban solamente cambios numéricos y aquellos que mostraban además cambios estructurales (Bardi y cols., 1995^a; Bardi y cols., 1993^c). Los carcinomas que portaban aberraciones estructurales eran en su mayoría pobremente diferenciados, mientras los tumores moderadamente y bien diferenciados generalmente poseían anomalías numéricas o cariotipos normales (Piard y cols., 2002).

CARIOTIPO Y PRONÓSTICO

En un estudio relativamente pequeño efectuado por Bardi y cols. (1993^a) se demostró una correlación estadísticamente significativa entre cariotipo tumoral y sobrevida de los pacientes. Los casos con cariotipos tumorales complejos tenían una sobrevida menor comparados con pacientes que presentaban pocas o ninguna anomalía cromosómica. Un análisis multivariado realizado por Laurent-Puig y cols. (1992) mostró que la pérdida de heterocigosidad en el brazo corto del cromosoma 17 estaba asociado de manera independiente a una sobrevida más corta, concluyendo que la pérdida de alelos constituía un marcador de agresividad tumoral. Recientemente se ha visto que las aberraciones estructurales, los reordenamientos en los cromosomas 8 y 16 como también las pérdidas del cromosoma 4 estaban significativamente correlacionados sobretodo a una corta sobrevida libre de enfermedad (Bardi y cols., 2004). Asimismo, un estudio multivariado que incluía pacientes con carcinomas colorrectales en estadios I, II y III mostró un fuerte e independiente valor predictivo de sobrevida de los hallazgos citogenéticos frente a otras variables clínico-patológicas, por lo que actualmente se piensa que los cariotipos de tumores colorrectales deben ser tenidos en cuenta en el contexto general del manejo clínico de tal patología (Bardi y cols., 2004; Westra y cols., 2004).

HETEROGENEIDAD DEL CCR EN SUS FORMAS ESPORÁDICA Y HEREDADA

A pesar de los cariotipos que distinguen de manera no aleatoria la tumorigénesis en el intestino grueso no es posible negar que existe una considerable heterogeneidad genética aún entre tumores del mismo fenotipo, dado que unos tumores presentan cariotipos con cambios muy simples mientras otros los tienen muy complejos. Estos datos se han interpretado como compatibles con la existencia de dos subgrupos citogenéticos principales en los carcinomas colorrectales: a) un primer grupo de tumores cercanos a la triploidía o tetraploidía con aberraciones cromosómicas complejas, tanto numéricas como estructurales, de localización preferencial en el colon distal, histológicamente pobremente diferenciados y con una sobrevida corta de los pacientes y, b) un segundo grupo de tumores con cariotipos cercanos a la diploidía, de localización proximal o a nivel de recto, histología moderada o bien diferenciada y con mayor sobrevida de los pacientes (Bardi y cols., 1993^c). La información proveniente del análisis del ADN recombinante y de la citometría de flujo son concordantes con tal dicotomía. Los carcinomas hereditarios con contenido de ADN aneuploide se localizan con mayor frecuencia en el colon distal mientras que los pertenecientes al colon proximal se acercan típicamente a la diploidía (Kouri y cols., 1990). Otros investigadores han llegado a la misma conclusión en estudios de cánceres esporádicos (Barreton y cols., 1991; Costa y cols., 1992). Delattre y cols. (1989) observaron que las pérdidas alélicas eran comunes en los tumores del colon distal pero raras en aquellos localizados en regiones más proximales.

Ciertas interesantes correlaciones surgen de cotejar la clasificación basada en los perfiles cariotípicos con la información obtenida de la genética molecular al analizar dos formas familiares hereditarias (Lynch y cols., 1993). Los carcinomas en la FAP muestran pérdida de heterocigosis y otras aberraciones indistinguibles del

grupo de tumores cariotípicamente reconocidos con reordenamientos múltiples (Buffil y cols., 1990; Thiagalingam y cols., 2001). Por otro lado los HNPCC parecen haber sufrido solamente alteraciones genéticas menores. Ambas formas de carcinomatosis colorrectal ostentan grados similares de heterogeneidad en lo concerniente a daños adquiridos con distribución anatómica similar en dos agrupamientos. En la medida que aumente la casuística global de las formas esporádicas y heredadas tanto desde el abordaje citogenético como de la biología molecular, será posible comprobar la validez de su paralelismo y si la presencia o ausencia del fenotipo RER+ influencia la elección de las vías de transformación tumoral a través de un estado benigno y en dirección a los diferentes grados de malignización (Tang y cols., 2004; Worthley y cols., 2007).

INESTABILIDAD GENÓMICA: SU ROL EN LA PROGRESIÓN TUMORAL

ORIGEN DE LA TEORÍA DE LA INESTABILIDAD GENÓMICA

Según el modelo de progresión tumoral expuesto en las Figuras 2 y 3, la acumulación de unas pocas alteraciones genéticas es suficiente para el desarrollo de un tumor. Sin embargo desde hace mucho tiempo se sabe que las células cancerosas presentan gran cantidad de alteraciones genéticas, detectadas fundamentalmente a nivel citogenético. Estas y otras observaciones llevaron a Nowell (1976) a proponer su teoría de la evolución clonal. Nowell no sólo propuso que la generación de un cáncer es el resultado de un proceso de mutación y selección de las clonas más agresivas, sino que esto es posible gracias a la existencia de un mecanismo de variabilidad genética de los tumores. Esta variabilidad queda reflejada en la elevada frecuencia de ‘errores mitóticos y otros cambios genéticos’ que tienen las células tumorales. La esencia de su hipótesis es la siguiente: si para el desarrollo del cáncer son necesarias múltiples alteraciones genéticas, entonces un aumento en la tasa de producción de esas alteraciones determinará un aumento en la velocidad de desarrollo del cáncer. Las bases de esta inestabilidad genética adquirida eran desconocidas en su momento, pero Nowell postuló que uno de los primeros cambios de las células tumorales podría implicar la activación de un gen que aumentara la probabilidad de subsecuentes errores mitóticos o no disyunciones cromosómicas. Propuso asimismo que la existencia de la inestabilidad genómica conlleva una gran capacidad de variación y selección que permite a los tumores crear subpoblaciones mutantes resistentes a diferentes tratamientos (Nowell, 1976). Todas estas hipótesis se han visto confirmadas a posteriori (Frede y cols., 2014; Blanco-Calvo y cols., 2015; Amaro y cols., 2016; Uthamacumaran, 2017; Wangsa y cols., 2018; Bettoni y cols., 2019; Bolhaqueiro y cols., 2019; Bordonaro, 2019).

El siguiente paso para la reafirmación del concepto de inestabilidad genómica fue dado por Loeb en 1991. Loeb calculó que la tasa de mutación espontánea en células normales humanas es de 1.4×10^{-10} mutaciones/par de bases/división celular, la cual es insuficiente, incluso considerando la exposición a carcinógenos, para explicar la acumulación de múltiples mutaciones que se observa en los tumores. Por ello,

postuló la existencia del ‘fenotipo mutador’, es decir, una alteración temprana en el proceso tumoral que produce un aumento de la tasa de mutación de las células facilitando la acumulación de mutaciones (Loeb, 1991). Un fenotipo mutador podría resultar de la inactivación o la desregulación de cualquiera de los numerosos genes que controlan la inestabilidad genómica. Entre ellos se encuentran genes implicados en la replicación y la reparación de ADN, en la segregación cromosómica y en los checkpoints (puntos de control) del ciclo celular. La eliminación o la disminución de la eficiencia de estas funciones de mantenimiento de la estabilidad genómica podrían producir un aumento de la tasa de mutación en la célula afectada que la predispusiera a la acumulación de mutaciones (Jackson y Loeb, 1998). Estas mutaciones podrían afectar a muchos genes y entre ellos, a genes supresores de tumores y a oncogenes, promoviendo la transformación de una célula normal en cancerosa (Cheng y Loeb, 1993).

Uno de los problemas que enfrenta la teoría de la inestabilidad genómica es explicar por qué se seleccionan las mutaciones en los genes de inestabilidad, las cuales no representan ninguna ventaja selectiva para las células. De acuerdo con la teoría propuesta, las mutaciones que confieren ventajas en la proliferación se producen gracias a las mutaciones causantes de inestabilidad y, por tanto, la selección de las células mejor adaptadas conlleva la selección conjunta de ambos tipos de mutaciones (Loeb y Loeb, 2000). Por otro lado, hay que tomar en consideración que niveles elevados de inestabilidad genómica pueden ser deletéreos para la célula. En principio, una célula con un genoma intacto tiene una mayor capacidad de supervivencia y de adaptación al medio (fitness) que una célula con un exceso de alteraciones genéticas (Cahill y cols., 1999). Sin embargo, para que la progresión tumoral sea posible es necesario alcanzar cierto nivel de inestabilidad genómica que produzca la heterogeneidad necesaria para superar las diferentes barreras de selección. Un nivel adecuado de inestabilidad genómica hace que el tumor sea una población en cambio continuo, formada por una gran variedad de subclonas con un elevado potencial de alteraciones que le permite afrontar las presiones de selección (Cahill y cols., 1999; Frede y cols., 2014; Amaro y cols., 2016).

DISTINCIÓN ENTRE DAÑO GENÓMICO E INESTABILIDAD GENÓMICA

Durante varios años ha existido una gran confusión debido al uso indistinto de los términos ‘daño genómico’ e ‘inestabilidad genómica’. Lengauer y cols. introdujeron los conceptos de ‘estado’ y ‘tasa’ para aclarar ambos términos (Lengauer y cols., 1998). Es un hecho que los tumores contienen múltiples alteraciones genéticas (daño genómico), tanto a nivel de secuencia de ADN como a nivel citogenético. Pero la existencia de estas alteraciones no conduce automáticamente a la afirmación de que el tumor es genéticamente inestable. La inestabilidad consiste en un aumento en la frecuencia de mutación y, por tanto, es una tasa, mientras que la existencia de mutaciones es un estado, que no tiene necesariamente como causa a la inestabilidad genómica (Lengauer y cols., 1998). Las mutaciones que conducen a la transformación neoplásica pueden estar causadas por factores exógenos (carcinógenos, radiación) o por factores endógenos resultantes de procesos celulares que incluyen reacciones de depuración o deaminación, daño causado por radicales de oxígeno libres o por errores de la polimerasa (Coleman y Tsongalis, 1999). Por tanto, no puede

asumirse como una generalidad que las alteraciones genómicas presentes en los tumores sea una medida directa de la inestabilidad genómica (Cahill y cols., 1999). Sin embargo, como los tumores presentan un exceso de alteraciones genéticas no explicable por las tasas de mutación normal de la célula, se acepta la premisa que dichas alteraciones son consecuencia de la inestabilidad genómica. Por ende, la medida global del daño genómico presente en el tumor se puede utilizar como una estimación representativa de la inestabilidad genómica subyacente (Yamasaki y cols., 1992; Martin y cols., 2010; Pino y Chung, 2010; Brierley y Martin, 2013; Wang y cols., 2017; Herrington y cols., 2019; Reilly y cols., 2019; Valle y cols., 2019).

CONTROVERSIAS ACERCA DE LA INESTABILIDAD GENÓMICA

A pesar del atractivo y la coherencia que presenta la teoría de la inestabilidad genómica, su actual difusión se explica por el descubrimiento en 1993 de un grupo de tumores colorrectales en el que se demostraba la existencia de un fenotipo mutador, el cual causaba un tipo de inestabilidad genética concreta (inestabilidad de microsatélites) que favorecía la progresión tumoral (Ionov y col, 1993). Una de las críticas más severas a esta teoría fue realizada por Tomlinson y cols. (1996), quienes desarrollando modelos matemáticos comprobaron que no era necesario un aumento en la tasa de mutación para causar tumorigénesis, ya que con el proceso de selección era suficiente. Los autores no descartaban el hecho de que algunos tumores pudieran adquirir un fenotipo mutador, pero afirmaban que éste no era necesario para el desarrollo del cáncer. Diferentes estudios han medido la tasa de mutación en células normales y tumorales y han obtenido resultados contradictorios. Se ha concluido, por tanto, que algunos tumores podrían expresar un fenotipo mutador mientras que otros podrían desarrollar múltiples mutaciones en ausencia de un aumento apreciable en la frecuencia de mutación. En el mismo sentido se conducen los experimentos que pretenden explicar la conversión de una célula normal en tumoral por la alteración de uno o varios genes. En 1999 Hahn y cols. (1999) demuestran que es posible inducir transformación tumoral mediante la expresión ectópica de la telomerasa en combinación de dos oncogenes. De acuerdo a este hallazgo, el planteamiento sobre la existencia de inestabilidad genómica parece innecesario ya que supuestamente bastan tres alteraciones para producir tumorigénesis. Sin embargo, se han formulado severas críticas a la interpretación de estos experimentos y, de hecho, algunos datos indican que la presencia de estas tres alteraciones sólo facilita el proceso tumoral, siendo necesaria la presencia de inestabilidad genética en forma de aneuploidía para alcanzar la transformación neoplásica (Duesberg y cols., 1999). Stoler y cols. (1999) ya estimaban en 11000 el número de alteraciones genéticas presentes en una célula tumoral y señalado además, que existe una cantidad similar en pólipos. En este caso, los resultados indican la presencia de inestabilidad genómica en las primeras etapas del desarrollo tumoral y sugieren que es la causa, y no el efecto, de la malignidad. Esta hipótesis es la más aceptada actualmente, pero la controversia en torno al tema pone de manifiesto la necesidad de lograr resultados concluyentes que, como la inestabilidad de microsatélites, aporten pruebas inequívocas y permitan conciliar las diferentes observaciones. Mientras que el papel de la inestabilidad genómica continúa en debate (Cahill y cols., 1999), por otro lado se perfila de forma cada vez más clara la

existencia de diferentes vías de progresión tumoral. Aunque la única vía bien establecida es la de la inestabilidad de microsatélites (microsatellite instability, MSI), se ha propuesto para los tumores colorrectales la existencia de una vía alternativa que normalmente se conoce como inestabilidad cromosómica (CIN) (Lengauer y cols., 1997; Coschi y Dick, 2012; Ijspeert y cols., 2015; Cavestro y cols., 2018; Gupta y cols., 2018).

INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

La primera prueba concluyente de la existencia de un fenotipo mutador fue encontrada en 1992 mediante el análisis por AP-PCR (arbitrarily-primed polymerase reaction) de un grupo de tumores colorrectales en los que se detectó la delección de unos pocos nucleótidos en las secuencias polyA (repeticiones de adeninas) distribuidas a lo largo del genoma (Peinado y cols., 1992; Ionov y cols., 1993). Este estudio sugería que el 12 % de los tumores mostraba estas mutaciones, las cuales se daban en un número aproximado de 100000 mutaciones por tumor. Estudios subsecuentes mostraron que otras secuencias microsatélite (secuencias cortas compuestas por repeticiones de 1 a 6 nucleótidos) se veían afectadas de forma similar, dando lugar al término 'inestabilidad de microsatélites' (Ionov y cols., 1993; Thibodeau y cols., 1993; Perucho y cols., 1994). Simultáneamente, se describió la presencia de MSI en los cánceres de pacientes con HNPCC (Aaltonen y cols., 1993). En estos tumores la frecuencia de MSI es muy alta (50-90%) en contraste con el 5-15% presente en los cánceres esporádicos. Posteriormente, numerosos estudios han hallado MSI en otros tipos de tumores sólidos con frecuencias variables según el tipo de tumor (Coleman y Tsongalis, 1999).

La causa de la inestabilidad de microsatélites en los tumores humanos es la alteración del mecanismo de reparación de errores en el ADN conocido como MMR (mismatch repair) system. Este mecanismo fue descrito inicialmente en bacterias y levaduras, lo cual facilitó la comprensión del mismo en humanos y la identificación de los genes implicados. Estos son hMSH2, hMSH3 y hMSH6, los cuales son homólogos del gen bacteriano MutS; y hMLH1, hPMS1 y hPMS2, homólogos del gen bacteriano Mult.. Uno o más de estos genes se encuentran mutados en la línea germinal de la mayoría de los individuos con HNPCC y se han hallado mutaciones somáticas de los mismos en los cánceres esporádicos con MSI (Coleman y Tsongalis, 1999). Además, la introducción de una copia normal de uno de los genes de reparación de ADN en una línea celular deficiente para ese gen produce la recuperación de la estabilidad de microsatélites (Arzimanoglou y cols., 1998). Sin embargo, en muchos casos con MSI no se ha podido identificar ninguna alteración de los genes del sistema MMR, lo que sugiere que existen genes de reparación adicionales o mecanismos alternativos de producción de MSI. Se ha confirmado la relación entre regulación epigenética y funcionamiento del sistema MMR. Los tumores con alto nivel de MSI, sin expresión detectable de hMLH1 y sin mutaciones puntuales en este gen muestran hipermetilación del promotor de hMLH1. Esto sugiere que la inactivación por hipermetilación del promotor representa un mecanismo de inactivación génica que conlleva inestabilidad de microsatélites (Coleman y Tsongalis, 1999). El sistema MMR se encarga de reconocer

nucleótidos no apareados o mal apareados y de repararlos. Si alguna de las proteínas implicadas en este sistema falla, se produce una acumulación de errores especialmente de las secuencias microsatélite ya que, debido a la repetición de nucleótidos, la polimerasa tiende a cometer más errores durante la replicación de estas secuencias. La inserción o deleción de uno o varios nucleótidos en estas secuencias se manifiesta en forma de expansión o contracción cuando se analizan por electroforesis. Los microsatélites están distribuidos a lo largo de todo el genoma y la mayoría de ellos se encuentran en el ADN no codificante. Sin embargo, en algunos casos se presentan dentro de regiones codificantes y es entonces cuando la inestabilidad de microsatélites produce mutaciones. La inserción o deleción de uno o dos nucleótidos origina un cambio en el marco de lectura que conlleva la creación de una proteína truncada, por tanto, no funcional (Boland, 1997). Si estas mutaciones se producen en genes cuya alteración puede ser relevante para el proceso tumorigénico, la inestabilidad de microsatélites actúa favoreciendo en forma indirecta la aparición de un cáncer. Son múltiples los genes cuya función se relaciona con el control del crecimiento y la reparación del ADN y que contienen secuencias microsatélites susceptibles de sufrir mutaciones de cambio de marco de lectura. Algunos de estos genes que se encuentran mutados en los tumores con MSI son: TGF β RII (Receptor tipo II del Transforming Growth Factor β), APC, Bax, IGF1R (Receptor tipo II del Insulin-like Growth Factor), hMSH3 y hMSH6 (Arzimanoglou y cols., 1998). Para que un fenotipo mutador favorezca la progresión tumoral es necesario que ocurra en las etapas iniciales del desarrollo tumoral. Numerosas evidencias demuestran que en el caso de la inestabilidad de microsatélites existe esta condición. En primer lugar, se han observado mutaciones clonales de secuencias de microsatélites en todas las regiones neoplásicas de tumores de un mismo paciente, incluyendo adenomas. En segundo lugar, se ha detectado la presencia de inestabilidad de microsatélites en focos de criptas aberrantes, que son lesiones microscópicas consideradas el precursor más temprano del cáncer de colon. Además, se ha observado inestabilidad de microsatélites en enfermedades caracterizadas por inflamación crónica y asociadas a una alta incidencia de cáncer, como la pancreatitis crónica o la colitis ulcerosa. Por último, la inestabilidad de microsatélites se asocia con características típicas de carcinomas tempranos tales como: baja incidencia de mutaciones en K-RAS y TP53; el fenotipo pobremente diferenciado; la baja incidencia de metástasis y diploidía (Jackson y Loeb, 1998). Otras características distintivas de los tumores MSI son la localización preferencial en el colon derecho y su diagnóstico frecuente en pacientes jóvenes (Ionov y cols., 1993; Søreide, 2007; Sameer y cols., 2014; Yamamoto e Imai, 2015; Keysselt y cols., 2017; Yu y cols., 2019).

INESTABILIDAD CROMOSÓMICA

ALTERACIONES CROMOSÓMICAS E INESTABILIDAD

Las alteraciones genómicas que presentan los tumores se pueden clasificar en dos tipos: alteraciones en la secuencia de ADN (incluye sustituciones, inserciones o deleciones de uno o unos pocos nucleótidos) y alteraciones cromosómicas. Estas últimas pueden ser de dos tipos:

- a) alteraciones numéricas (aneuploidías o poliploidías) que consisten en ganancias o pérdidas de cromosomas enteros.
- b) alteraciones estructurales: incluyen amplificaciones, deleciones, inversiones y translocaciones.

El análisis de las alteraciones genéticas a nivel de secuencia del ADN es difícil debido a la extensión del genoma y al alto grado de resolución requerido para su detección. Por este motivo y salvo la inestabilidad de microsatélites, es escaso el conocimiento sobre las mutaciones puntuales que afectan a las células tumorales. Sin embargo, las alteraciones cromosómicas son fácilmente detectables a nivel citogenético y, de hecho, se conoce desde hace más de un siglo su elevada frecuencia en células tumorales (Hansemann, 1890; Boveri, 1914; Holland y Cleveland, 2009). Además, existen múltiples evidencias que demuestran que el genoma de las células tumorales es más susceptible a la inducción de alteraciones cromosómicas (fracturas, intercambio de cromátidas hermanas, no disyunciones y cambios en la ploidía) que el genoma de células normales (Pino y Chung, 2010). Esto sugiere la existencia de una inestabilidad genómica real que se manifiesta a nivel cromosómico y que puede ser la responsable de la evolución de los tumores (Nowell, 1986; Janiszewska y Polyak, 2015; Krzywinski, 2016; McClelland, 2017). A este tipo de inestabilidad genómica se la ha llamado inestabilidad cromosómica (CIN). Desafortunadamente el término 'inestabilidad cromosómica' ha sido utilizado para designar únicamente las alteraciones cromosómicas de tipo numérico (Lengauer y cols., 1997; Hirpara, 2018), lo que ha propiciado una gran confusión respecto al tipo de alteraciones que se asocian con este fenómeno. En los tumores existen alteraciones cromosómicas tanto numéricas como estructurales y, por tanto, cualquier consideración acerca de la inestabilidad cromosómica debería hacer referencia a ambas.

A nivel citogenético se conocen bien, algunos de los posibles mecanismos que originan los diferentes tipos de alteraciones cromosómicas. En concreto, la no disyunción mitótica (las cromátidas hermanas no se separan correctamente en la anafase, migran hacia un polo y quedan incluidas en la misma célula hija) o el retraso anafásico (una cromátida se retrasa en su movimiento anafásico y no se incorpora al núcleo correspondiente) dan origen a aneuploidías. La poliploidía se origina por endorreducción (dos rondas consecutivas de síntesis de ADN sin mitosis) (Hameroff, 2004). Y las alteraciones de tipo estructural se originan habitualmente por fenómenos que implican rotura de la cadena de ADN y errores en los sistemas de reparación (Friedberg y cols., 2006; De Patger y Kloosterman, 2015; Ghosh y cols., 2018; Iliakis y col., 2019). A pesar de conocer estos mecanismos, las causas primeras que conducen a la aparición de las alteraciones cromosómicas se desconocen. Se ha propuesto la existencia de alteraciones cromosómicas primarias (las que aparecen en todas las células del tumor) que actuarían como un mecanismo generador de inestabilidad, promoviendo la variabilidad genética a partir de la cual se seleccionarían otras alteraciones secundarias (Heim y Mitelman, 1995). De todas maneras, aunque las alteraciones primarias fueran esenciales para el desarrollo del tumor, esto no significa que sean las primeras que ocurran, ya que pueden existir mutaciones submicroscópicas que no se detectan a nivel citogenético. En realidad no existen resultados claros que permitan concluir cuál es el origen u orígenes de la inestabilidad cromosómica, pero, a pesar de ello, diferentes autores han propuesto teorías y mecanismos para explicar la inestabilidad cromosómica, la

mayoría de los cuales se han limitado al estudio de la aneuploidía (Vecsey-Semjen y cols., 2002; Pfau y Amon, 2012; Duesberg, 2014; De Wolf y Kops, 2017; Pellestor, 2019).

INESTABILIDAD CROMOSÓMICA NUMÉRICA

La aneuploidía es una característica fundamental de las células tumorales pero, por sí misma, no constituye ninguna evidencia de que el genoma de las células sea inestable (Lengauer y cols., 1998). Sin embargo, dos experimentos independientes con líneas celulares han demostrado que existe una asociación entre aneuploidía e inestabilidad cromosómica numérica (Lengauer y cols., 1997; Duesberg y cols., 1998; Duesberg, 2014). Paradójicamente, las explicaciones que ambos grupos de investigación han dado a los resultados obtenidos se contraponen, lo que advierte sobre la precaución que debe tenerse al interpretar las dos hipótesis que se exponen a continuación.

Los primeros investigadores en demostrar la idea de inestabilidad cromosómica numérica fueron el grupo de Lengauer y col (1997) al comprobar que de las 8 líneas celulares colorrectales estudiadas sólo las 4 que eran aneuploides presentaban una tasa de ganancia o pérdida cromosómica elevada que podía interpretarse como inestabilidad cromosómica numérica. Además, la inducción de aneuploidía en células diploides no producía una alteración del número de cromosomas a lo largo de las generaciones, por lo que se dedujo que la aneuploidía era la consecuencia de una inestabilidad subyacente causada posiblemente por la mutación de algún gen implicado en la segregación cromosómica (Lengauer y cols., 1997). Sin embargo en 1998 el grupo de Duesberg interpretó sus propios resultados y también los de Lengauer de forma opuesta. Utilizando células CHE (Chinese Hamster Embryo) transformadas observaron que cuanto más alta era la aneuploidía, más heterogéneo era el cariotipo de las células y más rápidamente cambiaba a lo largo de las generaciones. Es decir, la inestabilidad cromosómica que sufrían las células era proporcional a su grado de aneuploidía. Según los autores, estas observaciones confirmaban su hipótesis de trabajo que postulaba a la aneuploidía como causa de inestabilidad genética. Esta hipótesis se basa en lo siguiente: para la correcta segregación simétrica de los cromosomas es necesario tener dos copias de los genes involucrados en mitosis. Si existe aneuploidía y ésta afecta a cromosomas que contienen genes implicados en el desarrollo de mitosis, se producirá una segregación aberrante y una desestabilización progresiva del cariotipo a medida que las células se tornan más aneuploides (Duesberg y cols., 1998;). Las líneas celulares usadas por Lengauer al parecer se comportan de acuerdo a esta hipótesis, ya que a medida que aumenta la aneuploidía crece la inestabilidad cariotípica de las células (Duesberg y cols., 1998; Duesberg y cols., 2004). Mucho antes de que el grupo de Duesberg llevara a cabo estos experimentos, Holiday (1989) ya había propuesto una teoría similar. Sostenía que la aneuploidía era un ejemplo de sistema de propagación de errores en el que un error inicial (no disyunción espontánea de un cromosoma que contenga genes implicados en la segregación cromosómica) aumenta la frecuencia de errores posteriores (falta de control en la segregación cromosómica y nuevas aneuploidías). Diez años más tarde, el grupo de Duesberg resume su hipótesis de la siguiente manera: a) en una primera etapa un carcinógeno o la mutación de un gen genera aneuploidía y b) en la segunda etapa, la aneuploidía desestabiliza el cariotipo e inicia una evolución autocatalítica en la que se

generan cariotipos preneoplásicos y eventualmente neoplásicos (Li y cols., 2000; Coschi y Dick; 2012; Mahathre y cols., 2016; Hirpara y cols., 2018).

INESTABILIDAD CROMOSÓMICA ESTRUCTURAL

Al igual que la aneuploidía, las alteraciones cromosómicas estructurales no son, por sí mismas, evidencia de inestabilidad subyacente. Sin embargo, su presencia en pacientes con síndromes de rotura o fragilidad cromosómica constituyen un dato inequívoco sobre la posibilidad de que un genoma inestable pueda propiciar la aparición de reorganizaciones estructurales que conduzcan al cáncer. Los pacientes con síndromes de rotura cromosómica (síndrome de Bloom, anemia de Fanconi, ataxia telangiectasia y xeroderma pigmentosum) heredan una alteración genética que determina un nivel constitucional elevado de roturas cromosómicas (en el caso del xeroderma pigmentosum es inducido por la exposición a la luz ultravioleta) y presentan un alto riesgo de desarrollo de cánceres (Heim y cols., 1989; Duker, 2002). Probablemente, la inestabilidad genética de las células de estos pacientes conduce a aberraciones cromosómicas aleatorias, las cuales constituyen un alto potencial de evolución y favorecen la aparición de tumores (Guénolé y Legube, 2017).

En cuanto a mecanismos de producción de inestabilidad cromosómica, se ha sugerido que los ciclos de rotura-fusión-puente (breakage-fusion-bridge, BFB) pueden constituir un mecanismo de generación de heterogeneidad intratumoral (Gisselsson y cols., 2000;). Estos ciclos ocurren si en la mitosis se encuentran presentes anulares, dicéntricos o cromosomas implicados en asociaciones teloméricas. Estos cromosomas aberrantes forman puentes en anafase que finalmente se rompen con posterior reunión de los extremos distales originando nuevas variantes cromosómicas anómalas en las células hijas. De esta manera, los tumores que muestran este tipo de alteraciones cromosómicas presentan una inestabilidad mitótica que les conduce a una continua producción de heterogeneidad a nivel de aberraciones de índole estructural. Los autores de este trabajo han demostrado que el mecanismo BFB se observa con elevada frecuencia en los tumores que presentan abundantes cambios estructurales no específicos. Además, estos tumores muestran una tasa disminuida de eliminación de células aberrantes que podría estar relacionada con las mutaciones en TP53. En conclusión, la formación ocasional de ciertas aberraciones cromosómicas puede constituir un mecanismo de producción de inestabilidad cromosómica estructural que, juntamente con una elevada tolerancia al daño cromosómico, puede conducir a la progresión tumoral (Gisselsson y Höglund, 2005; Campbell, 2012; Bertorelle y cols., 2014).

Finalmente, las alteraciones genéticas ampliamente distribuidas por todo el genoma son un aspecto común de la mayoría de los cánceres colorrectales. Mientras las alteraciones recurrentes específicas pueden revelar la implicancia de un gen o un conjunto de genes en la biología de la enfermedad, el daño genómico acumulado refleja la historia biológica de las células neoplásicas. Además, los hechos funcionales más allá de estos cambios genéticos pueden mostrar el potencial evolutivo de las células neoplásicas. Las diferentes aproximaciones analíticas, que incluyen desde la determinación del contenido nuclear de ADN hasta estudios

a nivel citogenético y/o molecular, revelan diferentes tipos de alteraciones cromosómicas y subcromosómicas y han sido aplicadas para medir el daño genómico generalizado en carcinomas colorrectales. Los niveles elevados de daño genómico generalmente aparecen asociados con mayor agresividad del CCR, por lo que la definición apropiada de la extensión de las alteraciones acumuladas y sus consecuencias funcionales puede ser de interés en el entendimiento y manejo del cáncer (Risques y cols., 2003a; Risques y cols., 2003b; Guénolé y Legube, 2017; Iliakis y cols., 2019).

2. OBJETIVOS

Objetivo general:

De acuerdo a los temas planteados y los escasos antecedentes de estudios citogenéticos en tumores sólidos en Uruguay nos hemos propuesto poner a punto la técnica de cultivos celulares en tumores sólidos utilizando como modelo el CCR en el Uruguay para su análisis citogenético.

Objetivos específicos:

Sobre la frecuencia y tipo de reordenamientos cromosómicos relacionados con el CCR se proponen los siguientes objetivos específicos:

- 1) Puesta a punto de la metodología de cultivo primario de CCR de pacientes provenientes de diferentes centros quirúrgicos. La población seleccionada corresponde a pacientes con CCR esporádico de ambos sexos en los cuales no se ha detectado elementos de agregación familiar.
- 2) Determinar las anomalías cromosómicas mediante técnicas citogenéticas convencionales presentes en los cultivos primarios de CCR.
- 3) Relacionar los resultados obtenidos de la población uruguaya con los datos publicados a nivel internacional. Determinar anomalías cromosómicas recurrentes o no respecto de las bases de datos específicas en la muestra analizada.
- 4) Comparar y discutir los datos de la muestra analizada en un contexto metodológico múltiple dada la complejidad de los procesos tumorales, en particular el CCR, teniendo en cuenta los avances científicos y metodológicos más recientes.
- 5) Correlacionar los patrones de hallazgos citogenéticos y la sobrevida de los pacientes.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

POBLACIÓN ESTUDIADA

Se analizaron 31 tumores provenientes de 30 pacientes con CCR. Un paciente presentó dos tumores sincrónicos. La histopatología correspondió en todos los casos a adenocarcinomas. No se detectaron antecedentes familiares al momento de revisar las historias clínicas. La relación de datos de la población analizada se detalla en la siguiente tabla:

Tabla 3.1. Datos correspondientes a la muestra estudiada

Diagnóstico (No de pacientes)	Edad media (rango, años)	Sexo		Estadio clínico (Dukes)				Momento del estudio	
		F	M	A	B	C	D	Diagnóstico	Recaída
30	52-84	14	16	1	13	15	1	30	0

TÉCNICAS DESARROLLADAS

DISGREGACIÓN DEL TEJIDO TUMORAL:

Las porciones de tumor provenientes del block quirúrgico se transportan en solución salina de Hanks con antibióticos en las mismas concentraciones que las utilizadas para su posterior cultivo. Se lavan en solución salina en condiciones de esterilidad en cámara de flujo laminar vertical. Se eliminan restos adiposos y necróticos mediante una suave disección, cortando luego el tejido tumoral en pequeños trozos que puedan resuspenderse adecuadamente. Se separa el medio de los fragmentos y se centrifugan (800 rpm, 5 min), obteniéndose un pool de células desprendidas de los trozos de mayor tamaño. Los fragmentos visibles se colocan en medio de cultivo con colagenasa cruda a una concentración final de 200 U/ml a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5 % de 2 a 12 horas dependiendo del grado de disgregación de las células, lo que se controla mediante microscopio óptico invertido (Limon y col, 1986; Nelson, 2017).

CULTIVO DE CÉLULAS:

Las células tumorales se cultivan en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 20 %, glutamina (200 mM), penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml), gentamicina (50 µg/ml) a 37°C y 5 % de CO₂. Se siembra la suspensión celular, producto de la disgregación mecánica y enzimática, a razón de 1:10 en el medio de cultivo completo en frascos de plástico y/o de vidrio, no menos de tres unidades por paciente a fin de prever probables fallas en el establecimiento del cultivo primario. Se realiza una inspección diaria con el microscopio invertido para valorar la adhesión celular y el índice mitótico.

RECOLECCIÓN DE LOS CULTIVOS:

Cuando el número de mitosis por colonia alcanzó aproximadamente entre 15 y 25 % se incorpora Colcemid (0.1 µg/ml) durante dos horas. Los cultivos se detienen durante la primera semana posterior a su establecimiento para evitar el sobrecrecimiento de células normales debido a una proliferación de

fibroblastos del estroma tumoral. Cumplido el tiempo de acción del Colcemid se quita el medio de cultivo y se agregan 5 ml de solución hipotónica [KCl 3 g/l, EGTA 0.2 g/l y HEPES 4.8 g/l a pH 7.4 (Gibas y col. 1984)] durante 20 a 30 minutos y se recogen las células de la monocapa empleando el rastrillo celular. Se centrifuga la suspensión celular en tubos de centrífuga cónicos (800 rpm, 5 min), se descarta el sobrenadante y se fijan las células con metanol-ácido acético (3:1) durante 20 minutos. Se repite dos veces la fijación y se realizan los extendidos celulares sobre portaobjetos limpios.

IDENTIFICACIÓN CROMOSÓMICA:

BANDEO G

Las preparaciones cromosómicas se mantienen por lo menos una semana a 37°C para su envejecimiento. Para realizar el bandeo G se tiñen los preparados con colorante de Wright 0.25 % en buffer fosfato pH 6.8 durante 2 a 3 minutos (Yunis J, 1981); en las mismas preparaciones se puede requerir un pretratamiento con tripsina 0.25 % (15 - 45 seg). Se analizan al menos 20 metafases bandeadas a fin de detectar las anomalías cromosómicas presentes para establecer los cariotipos (Figura 3.1) cuya representación constituye el idiograma como el mostrado en la Figura 3.2.

Figura 3.1 CROMOSOMAS METAFÁSICOS HUMANOS NORMALES CON BANDEO G

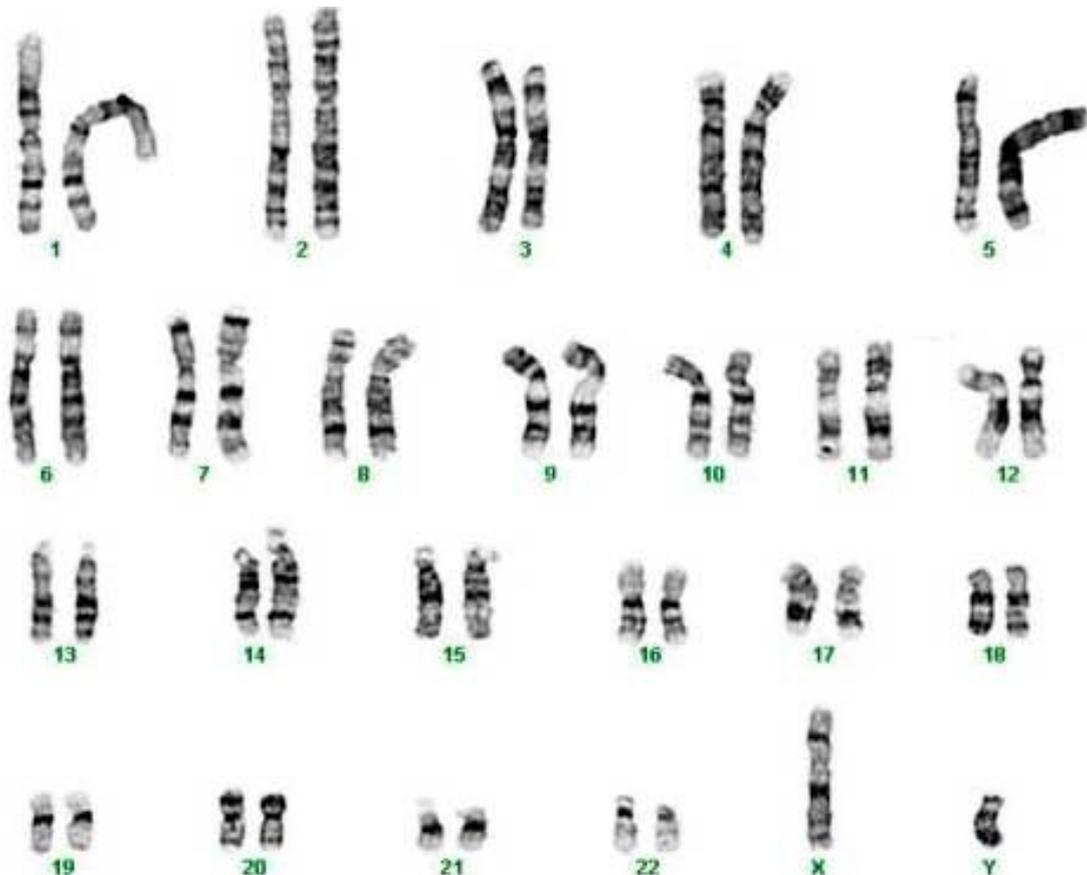
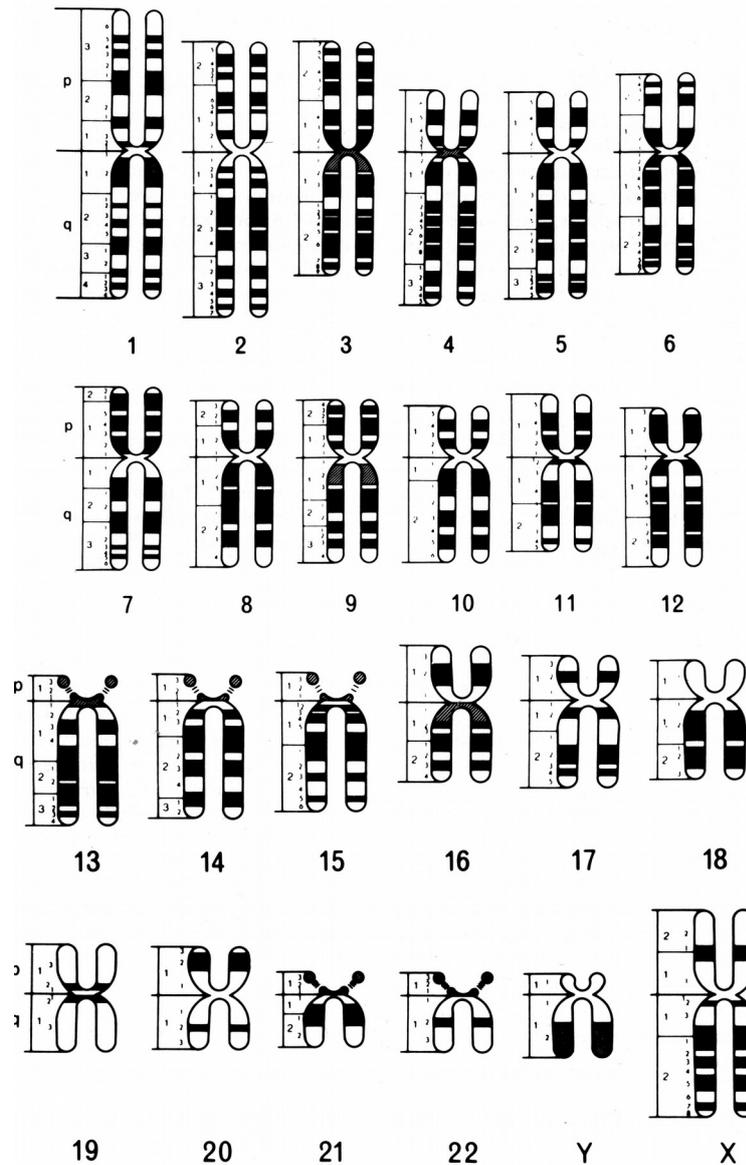


Figura 3.2 IDIOGRAMA DE LA CONFERENCIA DE PARÍS, 1971



TÉCNICA DE HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

Las técnicas de hibridación molecular consisten en la utilización de fragmentos conocidos de ácidos nucleicos (sondas) que permiten detectar secuencias de nucleótidos o determinados genes en una muestra problema. Entre ellas, la hibridación *in situ* es un método altamente sensible que permite la detección de secuencias específicas en muestras fijadas, extendidas sobre un portaobjetos. Para obtener una señal de hibridación visible al microscopio las sondas deben estar marcadas, pudiendo utilizarse para ello métodos radiactivos o no radiactivos. La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) emplea sondas de ADN marcadas con un fluoróforo, siendo el isotiocianato de fluoresceína (FITC) uno de los más comúnmente empleados. Esta técnica también recibe el nombre de ‘citogenética de interfase’, ya que permite el análisis de determinadas anomalías cromosómicas en células interfásicas o bien el de ‘citogenética molecular’, debido a que combina la metodología citogenética con detecciones a nivel molecular (Pinkel y cols. 1986; Chen y cols., 1992;

Kraker y cols., 1992; Price, 1992). Esta metodología consiste en la desnaturalización del ADN de la célula en estudio y de la sonda a utilizar, seguido de la incubación de ambos para permitir la hibridación de ambos ADNs y la posterior contracoloración del ADN restante para realzar la visualización del material marcado. Pueden emplearse sondas: a) centroméricas, que corresponden al ADN α -satélite del centrómero de cada cromosoma; b) del total del cromosoma (painting), que contienen secuencias homólogas únicas del ADN de cada cromosoma; c) secuencias o gen específicas, que permiten detectar una región o gen en particular y d) teloméricas. La lectura puede hacerse en núcleos interfásicos o en células en metafase. Se pueden utilizar para detectar alteraciones cromosómicas numéricas, anomalías estructurales o pérdida de genes o zonas específicas.

PROCEDIMIENTO

Preparación de la sonda:

Se precalienta la sonda a 37° C durante 5 minutos, se mezclan 1,5 μ l de la sonda con 30 μ l de Hybrisol centrifugando 1 – 3 segundos. Se desnaturaliza durante 5 minutos a 72° C en baño, se centrifuga 1 – 3 segundos y se mantiene posteriormente en hielo.

Preparación de los extendidos:

Se colocan en 2xSSCC/0,5% NP-40, pH 7 a 37° C (30 min). Se deshidratan en alcohol 70%, 80% y 95 % (2 min c/u). A continuación se desnaturalizan los extendidos en formamida 70%/2xSSC (2 min, a 72° C) y se deshidratan nuevamente en etanol 70%, 80% y 95% sucesivamente (2 min en c/u) y se dejan secar los preparados.

Hibridación:

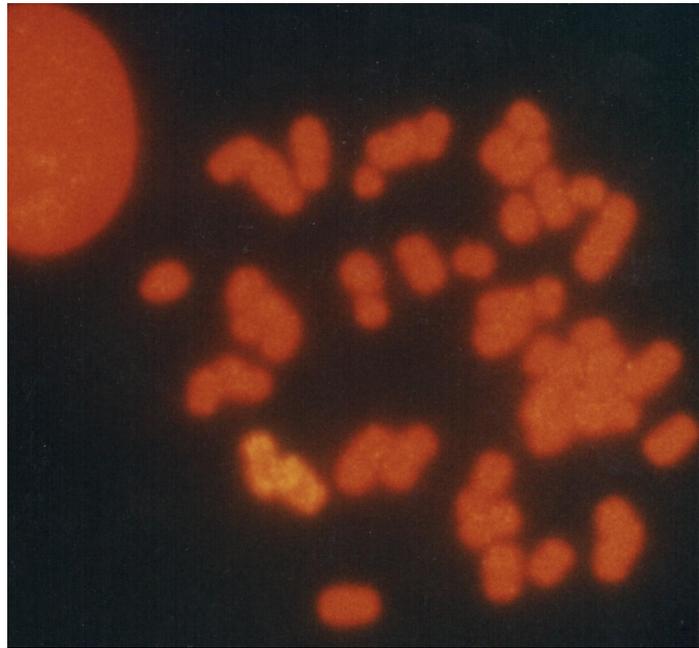
Se colocan 10 μ l de la sonda en un área de 22x22mm y se ubica un cubreobjeto y sellante a efectos de incubar en cámara húmeda a 37° C durante 16 horas. A continuación se retira el sellado y el cubreobjetos y se lava en 0,5xSSC, pH 7 a 72° C durante 5 minutos y en 1xPBD a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se secan en oscuridad; luego se tiñen con 10 μ l de contracolorante (yoduro de propidio) y nuevamente ponemos cubreobjetos y sellamos para observar al microscopio de fluorescencia (Olympus BX 40) con filtro triple (DAPI, FITC, Texas Red).

Interpretación de los resultados:

Para la detección de anomalías numéricas en células interfásicas se deben analizar 400 células determinando la cantidad de células con: 0, I, II, III y IV señales. El porcentaje obtenido en cada población debe ser comparado con el control a fin de establecer si existe un clon con alteraciones en el número cromosómico (trisomías o monosomías). Cuando se utilizan sondas de todo el cromosoma o 'painting probes' (Figura 3.3) para la detección de anomalías estructurales el análisis debe efectuarse en células en

metafase, analizando alrededor de 20 células. Las sondas para genes específicos se pueden analizar tanto en células interfásicas como metafásicas siguiendo las indicaciones precedentes

Figura 3.3 CROMOSOMAS METAFÁSICOS ANALIZADOS POR FISH



TERMINOLOGÍA Y TIPOS DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS EN TUMORES

Los cariotipos (orden de los cromosomas de una especie de acuerdo al número, tamaño y posición del centrómero) se efectuaron de acuerdo al International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 2016), en su sección específica para citogenética de neoplasias. El número total de cromosomas se coloca primero, luego los cromosomas sexuales y a continuación se describen las ganancias o pérdidas totales, y finalmente los reordenamientos estructurales. Los brazos cortos y largos de los cromosomas son representados por 'p' y 'q' respectivamente. Las ganancias o pérdidas totales son identificadas por un signo '+' o un signo '-' delante del número cromosómico. Las translocaciones son aberraciones estructurales comunes y se forman a partir del intercambio de segmentos de diferentes cromosomas. Ellas pueden ser balanceadas (recíprocas) o no balanceadas, dando origen a pérdida o ganancia de material cromosómico. Son representadas por una 't'; los cromosomas implicados están incluidos en un primer grupo de paréntesis y los puntos de ruptura de la translocación están en un segundo grupo de paréntesis que se coloca a continuación. Otras aberraciones cromosómicas incluyen deleciones, que pueden ser terminales o intersticiales, inversiones e isocromosomas. Las deleciones son representadas por 'del' seguido por el cromosoma implicado entre paréntesis y el punto de ruptura entre paréntesis colocado a continuación. Las inversiones se representan por 'inv' seguido del cromosoma implicado entre paréntesis y los puntos de ruptura dentro de unos segundos paréntesis donde se anotan las bandas involucradas en el reordenamiento. Las inversiones pueden incluir al centrómero (pericentroméricas) o no (paracentroméricas). Los isocromosomas surgen de la pérdida completa

de uno u otro de los brazos cromosómicos con la duplicación del que permanece, situación única que genera cromosomas con un índice centromérico (relación entre el brazo corto y la longitud total del cromosoma) equivalente a 0,5. Se nombran por una 'i' seguida del cromosoma entre paréntesis 'p' o 'q' dependiendo si la formación corresponde al brazo corto o largo respectivamente. Las regiones cromosómicas amplificadas a menudo se manifiestan como regiones homogéneamente teñidas (hsr, del inglés *homogeneously staining region*) o como pequeños segmentos acéntricos (carentes de centrómero) conocidos como cromosomas dobles diminutos (DM, *double minute*) los que se anotan en una descripción cariotípica como 'dmin' después de la descripción de otras anomalías.

CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN DE ANOMALÍAS CITOGÉNÉTICAS EN TUMORES:

Número modal: es el número más común en una población de células tumorales; puede ser expresado como un rango entre dos números cromosómicos.

Clonas y evolución clonal: una clona se define como una población de células que derivan de un mismo progenitor que no necesariamente son completamente homogéneas ya que pueden aparecer subclonas durante la evolución del tumor. Se tendrá en cuenta como criterios de aceptación: el número de células examinadas, la naturaleza de la aberración implícita, el tipo de cultivo y el tiempo de permanencia *in vitro* antes de la cosecha celular. Una anomalía cromosómica clonal se define cuando dos o más metafases contienen la misma alteración estructural o cromosoma adicional, tanto como cuando tres o más metafases contengan la misma pérdida.

Línea principal (ml): es la constitución cromosómica más frecuente de una población celular tumoral. Es un término puramente cuantitativo para describir la clona de mayor tamaño, y no necesariamente indica lo fundamental en términos de progresión. La línea madre –stemline- (sl) constituye la clona básica de toda la población celular y todas las subclonas que de ella derivan se las llama líneas colaterales –sidelines- (sl), pudiendo haber más de una por las que se las llamará sl1, sl2, etc. Las clonas y subclonas relacionadas se presentan en la medida de lo posible en orden de complejidad creciente, independiente del tamaño de la clona, aunque la línea madre se la coloca en primer lugar. Las clonas con cariotipos no relacionados que se hallan ocasionalmente se las presenta de acuerdo a su tamaño en orden decreciente de frecuencia.

Cariotipos compuestos: a pesar de la gran heterogeneidad dentro de los tumores pueden aparecer características citogenéticas compartidas que incluyen los criterios de clonalidad. Se detalla el cariotipo con las anomalías clonales; colocando al final de la descripción el número total de células donde se observan dichas alteraciones precedido por la abreviatura 'cp'.

DOCUMENTACIÓN FOTOGRÁFICA:

Para nuestros registros se utilizó un fotomicroscopio Olympus BX 40 empleando película blanco y negro ASA 25 y películas color para papel y diapositivas. Posteriormente se digitalizaron las imágenes y se procesaron con Adobe PhotoShop versión 7.0.

EVALUACIÓN ESTADÍSTICA:

El análisis estadístico se efectuó mediante la utilización del test de χ^2 y otros análisis no paramétricos. Se analizó la distribución de los tiempos de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier (Kaplan y Meier, 1958; Goel y cols., 2010) teniendo en cuenta diferentes covariables relevadas. Estas covariables fueron: sexo, edad, sitio tumoral, tamaño tumoral, grado de diferenciación tumoral, infiltración linfocitaria, estadios de Dukes y anomalías cromosómicas. Las anomalías cromosómicas fueron agrupadas de acuerdo a los hallazgos en anormales simples (**AS**: con hasta tres anomalías numéricas) y anormales complejas (**AC**: con más de tres anomalías numéricas y/o presencia de anomalías estructurales). Los contrastes estadísticos univariados se llevaron a cabo mediante el test de log-rank. Todos los análisis se realizaron usando el paquete computacional STATA 6.1.

ASPECTOS ETICOS Y BIOSEGURIDAD:

Las muestras analizadas pertenecían a pacientes que brindaron por escrito su consentimiento para que se hicieran los estudios sobre el material biológico obtenido de las resecciones quirúrgicas practicadas. El laboratorio donde se realizó la pasantía cuenta con la habilitación del Ministerio de Salud Pública para operar en el área diagnóstica y los aspectos de bioseguridad estuvieron contemplados en todo el proceso del estudio realizado.

4. RESULTADOS

En el presente estudio se efectuó el estudio citogenético de 31 muestras provenientes de 30 pacientes con tumores colorrectales. El análisis cromosómico con técnicas de bandeado G reveló aberraciones clonales en todos los tumores estudiados. El número cromosómico se situó en el rango de 34 a 94. Se observaron 20 tumores con comportamiento bimodal (64,41%), 7 unimodales (22,58) y 3 de tipo trimodal (12,90%). Las clonas en su mayoría correspondieron al rango próximo a la diploidía (81,33%), mientras que 11,86% se ubicaron alrededor de la triploidía y sólo 6, 77% a nivel de la tetraploidía. En 6 pacientes se hallaron clonas relacionadas (19,35%). De los 31 tumores se encontraron 13 con sólo anomalías numéricas (41,94%) y 18 con alteraciones numéricas y estructurales (58,06%). El 39% de los casos mostró células normales residuales. En la Tabla 4.1 se presentan las anomalías clonales detectadas en la población estudiada.

Tabla 4.1

PACIENTE:	CARIOTIPO:
01	39,X,-X,del(1)(p34p36),-6,del(7)(q22q36),-10,-13,-16,-17,-18,-22[5] / 40-42,XX, del(1)(p34p36),-5,-8,-10,-13,-14,-18,-22[26] / 88,XXXX, del(1)(p34p36)x2,-10x3,-18,x2[3]
02	46,X,-X,i(X)(q10),+8,+12,-18,-19[6] / 47,XX,+7[13]
03	41-49,XX,i(X)(q10),-X,-3,+5,+6,+7,-8,+8,+9,-10,+11,-14,+15,+16,+19,+20,+22 [21] / 46,XX[5]
04	43,XY,-18,-19,-21[9] / 45,X,-Y[6] / 46,XY[4]
05	45,XY,-16[4] / 47,XY,+7[6]46,X,-Y,+7[5] / 48,XY,+7,+20[9]
06	46,Xder(Y)t(Y;18)(p11.2;q12.2),+der(3)del(q23q29), del(q21q27),+7,+13,-15,-17,-18[6] / 46,XY[11]
07	43,X,-Y,-5,-21[5] / 46,XY[5] / 46,XY,del(3)(q25q29) [4] / 47,XY, del(3)(q25q29),+13,i(17)(q10)[2] / 48,XY, del(3)(q25q29), +6,+20[7] / 50,XY,+8,+9,+12,+17[4]
08	45,XX,-10[5] / 46,XX[5] / 47,XXX,[8] / 47,XXX,+13[6]
09	63-73,XXY,+X,+Y,-Y,-1,+2, t(2;12)(q37;q11),+3,del(3)(q23q29),-4,-5,+7,-7,+8,-10,-11,-12,+13,-15,+16,+16,+19,-19,+20,-21,-22+i(17)(q10),[29]
10	45,XX,-20[5] / 46,XX,[11] / 47,XX,+7[4]
11	49,XXX,+19,+20, t(13;17)(q12;p13)[8] / 66-72,XXX,-1,+2,+3,-4,-6,+8,-9,+10,-13x2,-14,-15,-17,+der(17) T(13;17)(q12;p13),+18,+19x2,+20x3,+der(19)t(15 ;19)(q15;q13)-21,+r(?)[11]
12	44-49,XY,+5,-5,+7+9,-10+13[31]

13	46-49,XXY,t(1;18)(p34;q21),+19,+20[17]/ 90-94,XXXYY,del(6)(q21q27),-8,-10,+12,-14,+15,,-18,+19,-20[11]
14	46,XXY,t(1;18)(q44;q11),-21[3]/ 47,XY,i(1)(q10),+mar[5]/48,XXY,i(1)(q10),-18,+19,+20[9]
15	47-49,XY,+7,-10,+13,+22 [11] / 68-72,XXY,-4,+5,+7,-10,-11,+13,-18,i(17)(q10) [15]
16	46,XY[11] / 49-50,XY,+4,+7,-10,+13,-18,+19,+20[14]
17	46,XX[10] / 47-48,XX,+8,+13,-14[11]
18	46,XY[7] / 47-49,XY,del(1)(q34q36),i(8)(q10),+7,+9,+22[9]
19	45-48,XY,-Y,-10,+13,-18[19]
20	85-91,XXXYY,-1,+3,+7,-8,+9,-10,+11,-12,-13,-17,-19,-20,i(1)(q10), del(6)(q13q27), i(8)(q10),del(18) (q21q23) [17]
21	46,XY[3] / 47,XY,+8[7]/48,+7,+13[9]
22	46,XY[7] / 49,XXX,+9,+20[15]
23 A	44-48,XY,+X,-Y,+7,+8,-13,+20[9] / 46-50,XY,-X,-Y,+3,+5,+6,-10+14,-15,-16,-18x2,+19x3,+21,-22, +der(6)(q21q27), i(8)(q10) , +der(11)t(11;18)(p15;q11.2) [21] / 66-70,XX,+2,+5,-6,-10,-15,-16,-17x2,-18,-20,+21, del(6)(q21q27)x2, i(17)(q10), +der(19)t(2;19)(q23;p13), +der(19)t(13;19)(q12;p13) [11] / 81-90,XXXYY,-1,der(1)t(1;18)(p34;q11),der(3)del(q23q29),-4,-5, der(6)(q21q27),i(8)(q10),-12,- 13,der(13)t(13;15)(q34;q15),-14,-15,-16,-17,del(17)(p11p13),-18,der(19)t(13;19)(q12;q13),-21,-22
23 B	70-79,XXY,+X,+Y,-Y, ,+1,-1,t(1 ;13)(p34;q12),+2,-4,+7,+8, i(8)(q10),+9,+11, -14,-15,-16,-17,+der(17)t(1;17)(q25;p11),-18,+19,+ 20[29]
24	46,XX[9] / 48,XX,+der(6)del(6)(q21q27),+9,-17,+20[5]
25	45-47,XX,+7,-18,+20[23]
26	42-47,XX,-6,+12,-17,i(17)(q10),-18,-22[19]
27	46,XY[2]/49,XY,+Y,del(1)(p32p36)+der(19)t(10;19)(q11;p13),inv(12)(p13q24)?+12,i(17) (q10),i(13)(q10)[3] / 63-71,XXY,+i(8)(q10),-3,+5,+6,+11,-14,-18,-17,-18,+19,+20,+22[18]
28	49-51,XX,+7,-9,+14,+16,-18,+19,+20,-21[15] / 70-77,XXX,+2,+der(3)del(q21q29),-8,i(8)(q10),+9,+10, +11x2,+der(11)del(q13q21),+13,-14,+16,-17,-18x2, +der(19)t(19;?)(p13.3;?)x3,+20,-21x2[17] /
29	44,XX,-6,-17,+21[4] / 47-48,XX,+X,+7,-18[7]
30	45,XX,-20[11] / 47,X,+7,+19[5]

ANEUPLODÍAS HALLADAS EN LOS PACIENTES ESTUDIADOS

El análisis cromosómico mostró la participación de todos los cromosomas en anomalías numéricas, tanto ganancias como pérdidas totales (excepto el cromosoma 2 que no se observó en situación de pérdida clonal). Los cromosomas mayormente involucrados en ganancias fueron el 7 (14,92%) (Figura 4.1), 20 (12,68%), 19 (9,70%) y 13 (8,20). En cambio, los pares mayormente afectados por la pérdida clonal fueron: 18 (14,39%), 10 (11,36%) y 17 (9,09%). En la Tabla 4.2 y Figura 4.2A se detallan los hallazgos completos de las anomalías numéricas.

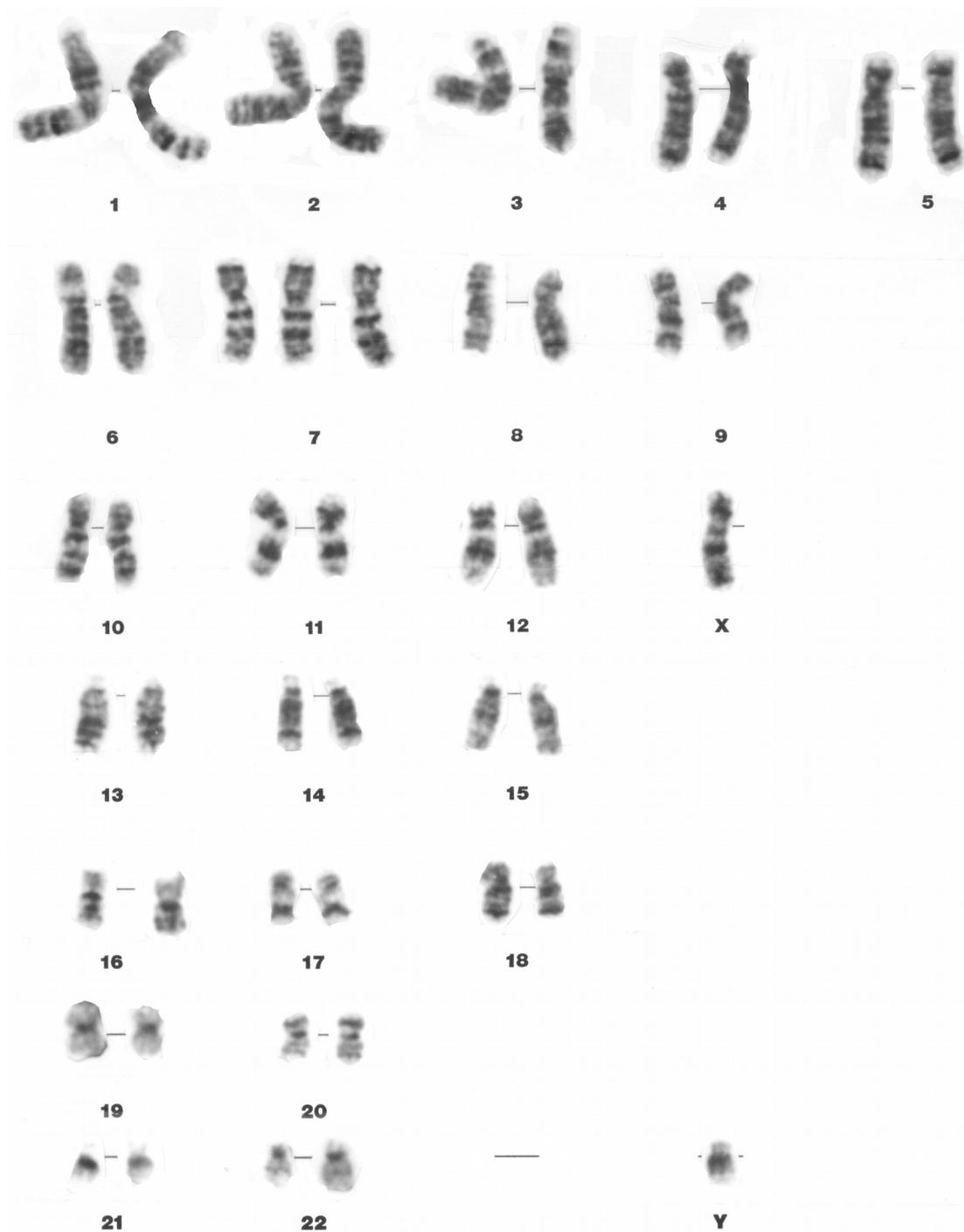


Figura 4.1 Cariotipo del paciente 05 que presenta una trisomía del cromosoma 7

Tabla 4.2 Aneuploidías de los CCRs de la población uruguaya

CROMOSOMA	PÉRDIDAS		GANANCIAS	
	n	%	n	%
1	5	3.78	1	0.74
2	0	0.00	4	2.98
3	2	1.51	3	2.23
4	5	3.78	1	0.74
5	5	3.78	6	4.47
6	4	3.03	4	2.98
7	1	0.78	20	14.92
8	5	3.78	9	6.71
9	2	1.51	9	6.71
10	15	11.56	2	1.49
11	2	1.51	5	3.73
12	3	2.28	5	3.73
13	5	3.78	11	8.20
14	8	6.10	2	1.49
15	6	4.54	2	1.49
16	6	4.54	4	2.98
17	12	9.09	1	0.74
18	19	14.39	1	0.74
19	3	2.27	13	9.70
20	4	3.03	17	12.68
21	5	3.78	3	2.23
22	5	3.78	4	2.98
X	2	1.51	4	2.98
Y	8	6.10(T)/11.10(SV)	3	2.23(T)/4.05(SV)
TOTALES	132	100%	134	100%

Figura 4.2A Distribución de las alteraciones numéricas del CCR en Uruguay

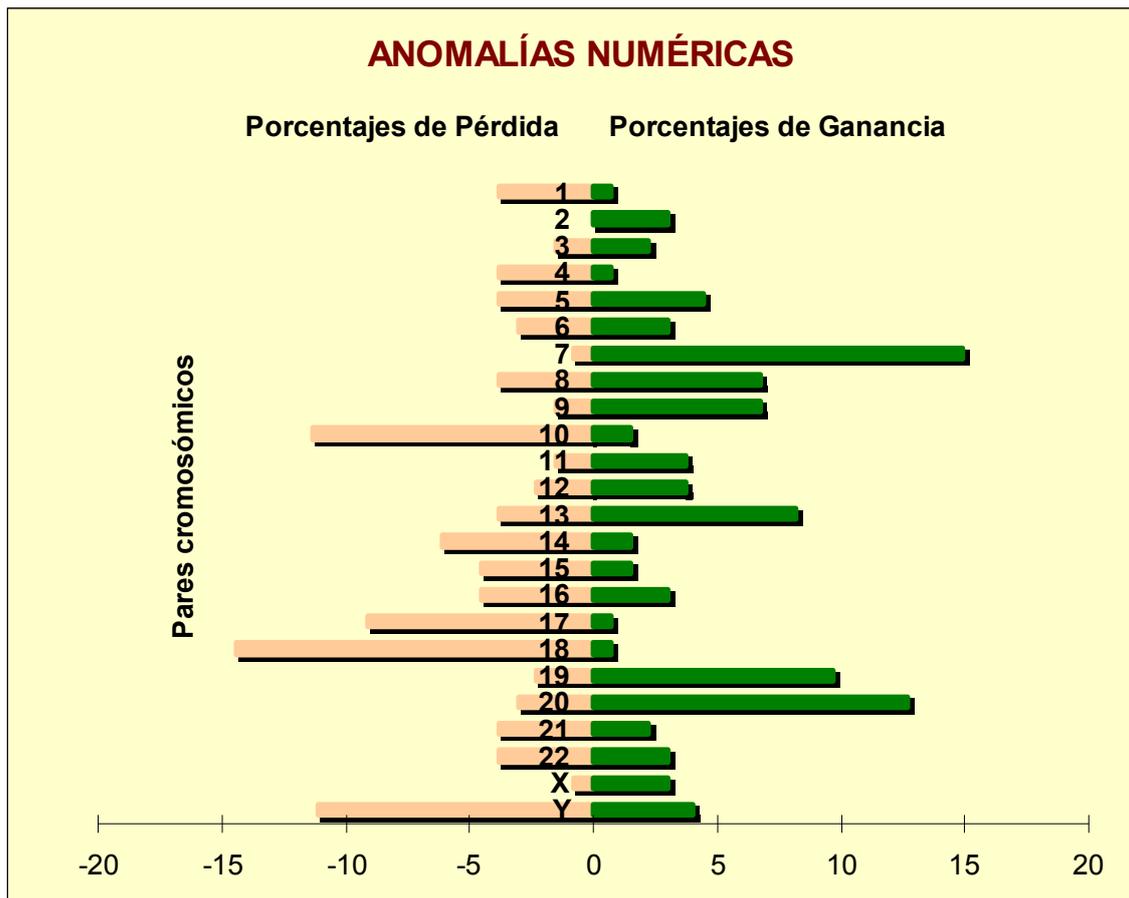
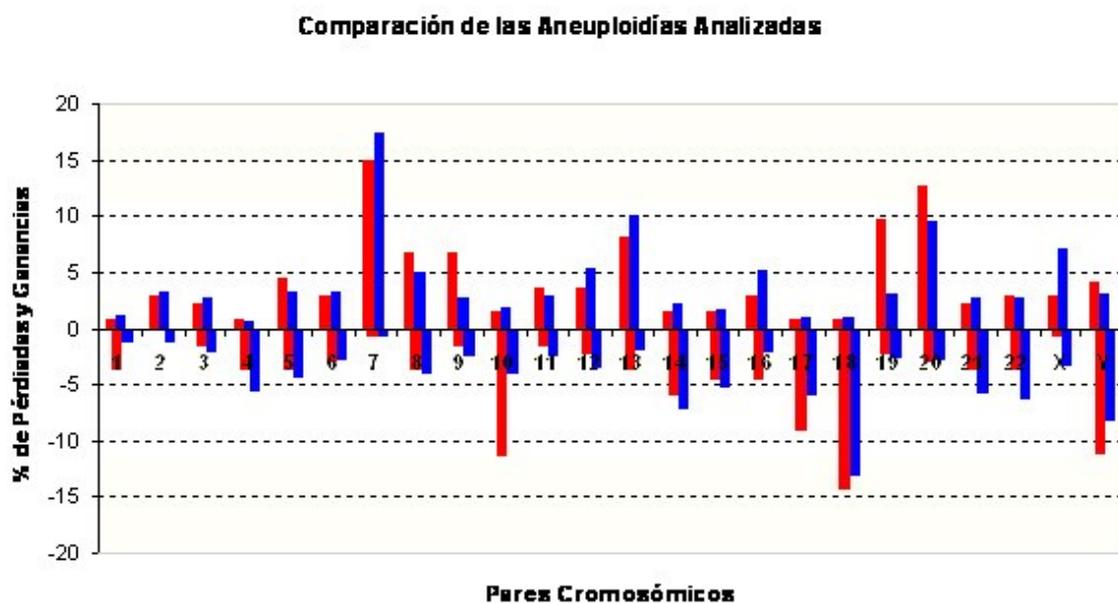


Figura 4.2B Aneuploidias en CCR de Uruguay vs poblacion mundial



*Las barras color rojo corresponden a la distribución de aneuploidías de la población uruguaya (n = 31).

** Las barras color azul corresponden a la distribución de aneuploidías de la base de datos de Mitelman (n = 356).

ANOMALIAS CROMOSOMICAS ESTRUCTURALES

Se observaron 35 alteraciones cromosómicas estructurales diferentes que se distribuyeron en: translocaciones, deleciones, isocromosomas, cromosomas en anillo e inversiones todas las cuales cumplieron criterios de clonalidad (Tabla 4.3) (Figura 4.3). El 42,85% (15/35) de las mismas correspondieron a translocaciones: 67% desbalanceadas (Figura 4.4) y Figura 4.5 t(Y;18) y las restantes (33%) balanceadas (Figura 4.6 t(1;18); el 31,42% (11/35) fueron deleciones, de las cuales solo una fue intersticial: del(11)(q13q21) y las demás terminales, y el 17,64% correspondió a isocromosomas. Entre ellas, las deleciones: del(1)(p34), del(3)(q23) y del(6)(q21) (Figura 4.5), así como los isocromosomas i(1)(q10), i(8)(q10), i(17)(q10) e i(X)(q10) (Figura 4.6) fueron recurrentes en nuestra serie. Los cromosomas mayormente involucrados fueron: 1 y 17 (13,23%), 18 (10,29%), 6 y 8 (8,82%), 3, 13 y 19 (7,35%). El cromosoma 19 fue el más involucrado en translocaciones (Figura 4.4), los pares 3 y 6 en deleciones y los cromosomas 8 y 17 en isocromosomas.

Tabla 4.3. Reordenamientos detectados

Translocaciones	Anomalías estructurales [número de casos]		
	Deleciones	Isocromosomas	Otras
t(1;13)(p34;q12) [1]	del(1)(p34) [2]	i(1)(q10) [2]	inv(12)(p13q24)[1]
t(1;18)(p34;q21) [1]	del(1)(p32) [1]	i(6)(p10) [1]	r(?) [1]
t(1;18)(q44;q11) [1]	del(3)(q25) [1]	i(8)(q10) [6]	mar no identificado [1]
der (1)t(1;18)(p34;q11) [1]	del(3)(q23) [3]	i(13)(q10)[1]	
t(2;12)(q37;q11) [1]	del(3)(q21) [1]	i(17)(q10)[6]	
der(11)t(11;18)(p15;q11.2)[1]	del(6)(q21) [3]	i(X)(q10) [2]	
t(13;17)(q12;p13) [1]	del(6)(q13) [1]		
der (13)t(13;15)(q34;q15) [1]	del(7)(q22) [1]		
der(17)t(1;17)(q25;p11) [1]	del(11)(q13q21)[1]		
der (19)t(2;19)(q23;p13) [1]	del(17)(p11) [1]		
der (19)t(10;19)(q11;p13)[1]	del(18)(q21) [1]		
der (19)t(13;19)(q12;p13) [1]			
der (19)t(15;19)(q15;q13) [1]			
der (19)t(19;?)(p13.3;?) [1]			
der(Y)t(Y;18)(p11.2;q12.2)?[1]			

Figura 4.3 Distribución de reordenamientos cromosómicos

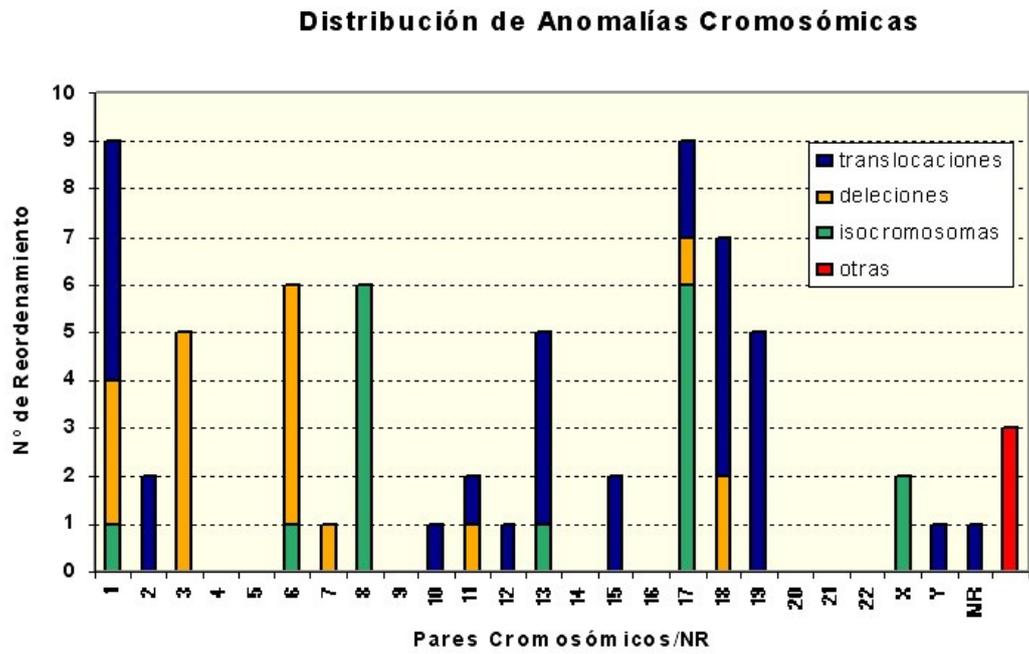


Figura 4.4 Cariotipos parciales de translocaciones que involucran al cromosoma 19

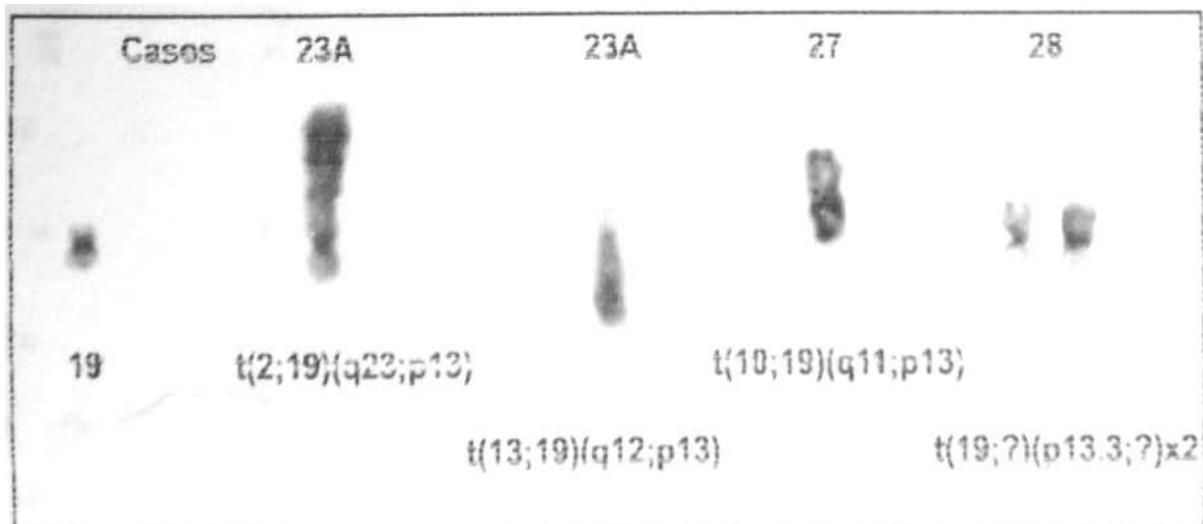


Figura 4.5 Cariotipo pseudodiploide del paciente 06 con una t(Y;18)



Figura 4.6 Cariotipo del caso 13 mostrando los marcadores involucrados en la t(1;18)

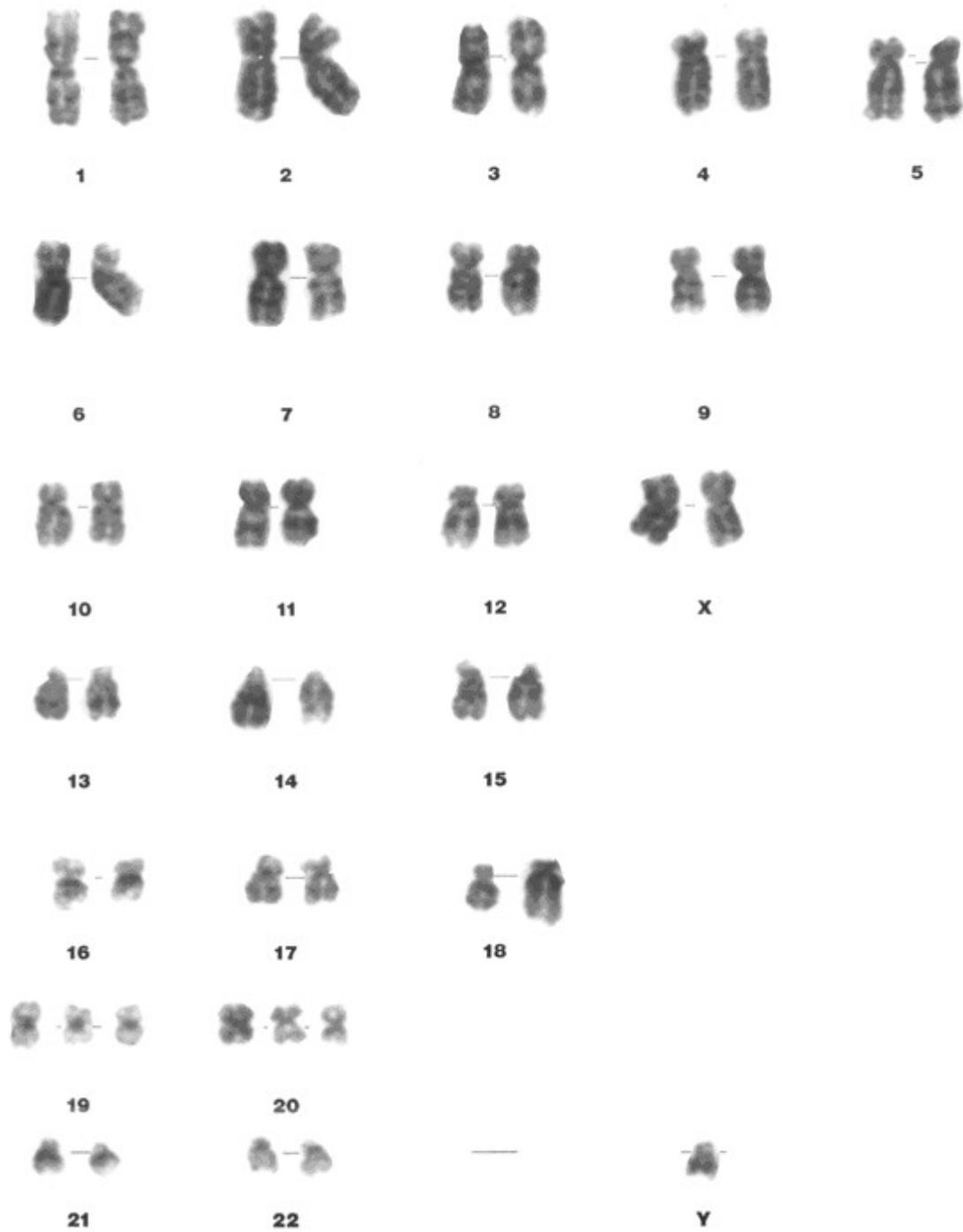


Figura 4.7 Compuestos cromosómicos parciales con deleciones de los cromosomas 1, 3, 6, 7, 11 y 17.

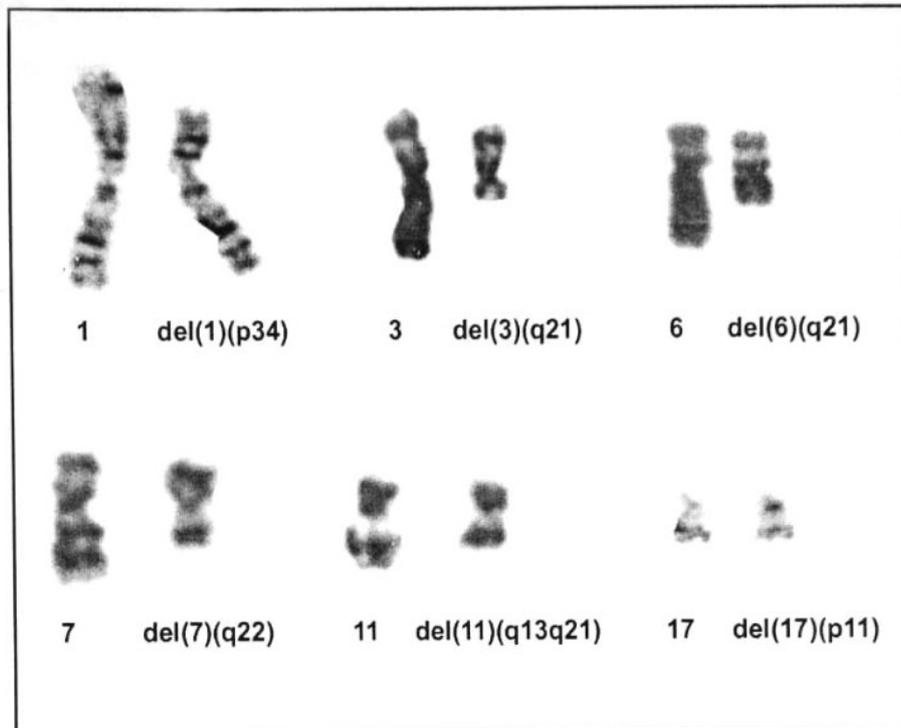
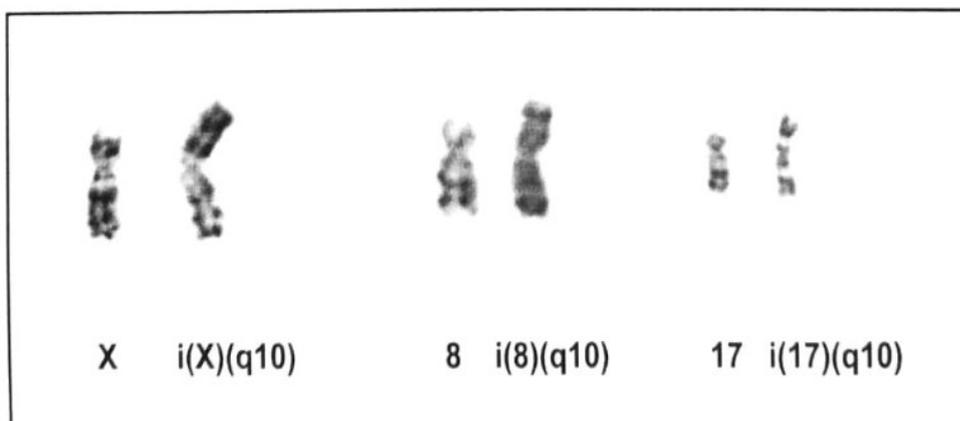


Figura 4.8. Cariotipos parciales de los casos 03, 18 y 09 mostrando los isocromosomas X, 8 y 17.



BANDAS CROMOSÓMICAS INVOLUCRADAS EN LOS REARREGLOS ESTRUCTURALES

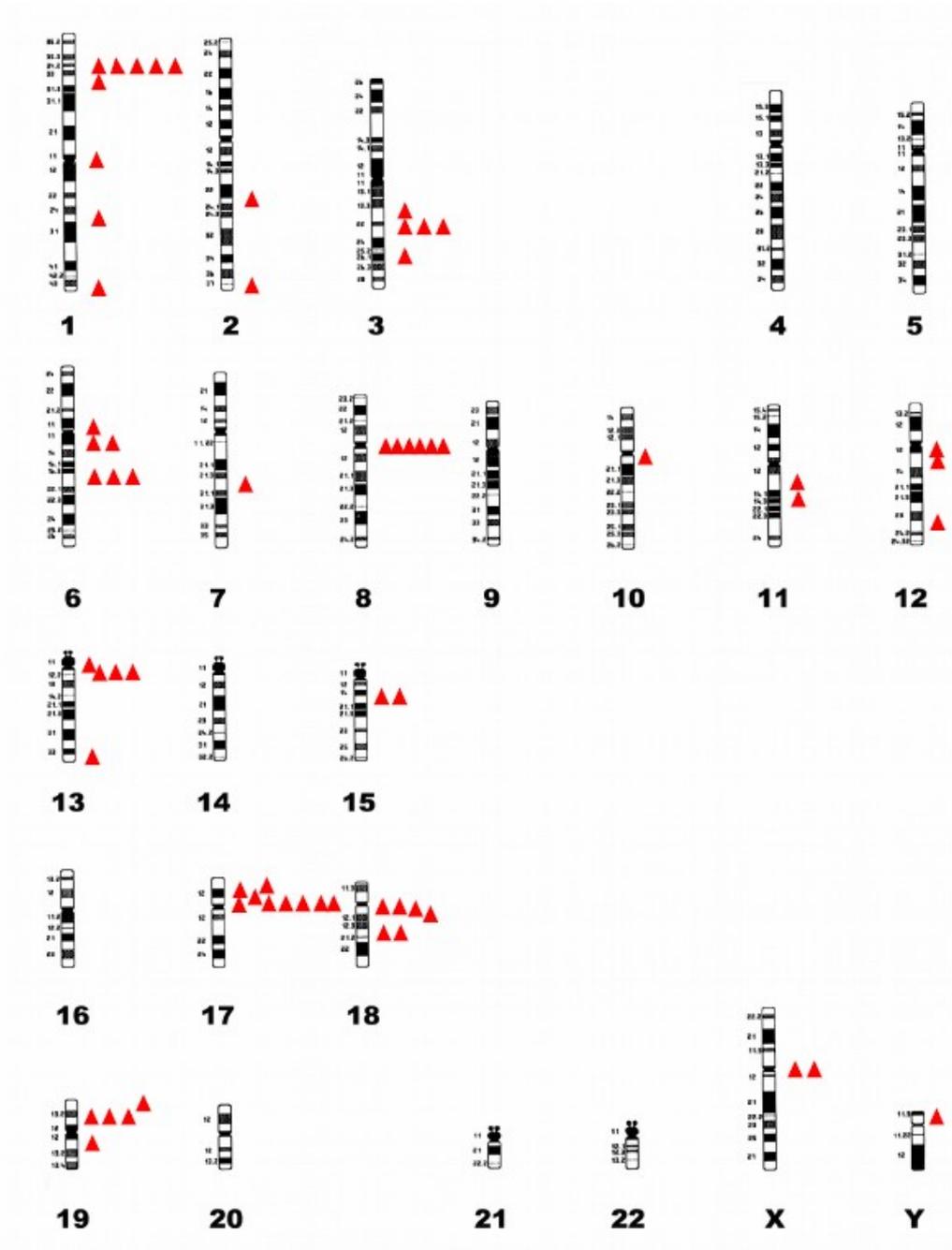
Se detectaron 38 bandas cromosómicas, distribuidas en los cromosomas 1, 2, 3, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 17, 18, 19, X e Y. En la Tabla 4.4 se detallan los puntos de ruptura involucrados en las diferentes anomalías estructurales. Considerando los diferentes sitios de fractura, los cromosomas mayormente afectados fueron: 1 (13,15%), 18 (10,52%) y 3, 6, 11, 12, 13, 17 y 19 (7,89%). Las bandas cromosómicas preferentemente involucradas en los diferentes reordenamientos cromosómicos se distribuyeron de la siguiente manera: 8q10 y 17q10 (8,95%), 1p34 (7,46%), 3q23, 6q21, 13q12, 18q21 y 19p13 (4,47%) y 6q13, 15q15, 17p11, 18q11 y Xq10 (2,98%), y finalmente las representadas una sola vez (1,49%). En la Figura 4.9 se ilustra la distribución de los puntos de ruptura hallados en nuestra serie de CCR.

Los reordenamientos más frecuentes que afectaron estas bandas fueron isocromosomas i(8)(q10) e i(17)(q10), translocaciones a nivel de 1p34, 13q12, 18q11 y 19p13, deleciones en 3q23, 6q21, 1p34, 6q13 y 18q21. Las pérdidas parciales se localizaron en su mayoría en 8p, 17p, 3q, 6q, 1p, 18q y Xp.

Tabla 4.4 Bandas cromosómicas detectadas en reordenamientos clonales

CROMOSOMA	BANDAS	CROMOSOMA	BANDAS	CROMOSOMA	BANDAS	CROMOSOMA	BANDAS
1	p34 p32 q10 q25 q34 q44	2	q23 q37	3	q21 q23 q25	6	q13 q21
7	q22	8	q10	10	q11	11	p11 q13 q21
12	p13 q11 q24	13	q12 q34	15	q15	17	p11 p13 q10
18	q11 q11.2 q12.2 q21	19	p13 p13.3 q13	X	q10	Y	p11.2

Figura 4.9 Distribución de los puntos de ruptura en los CCRs analizados

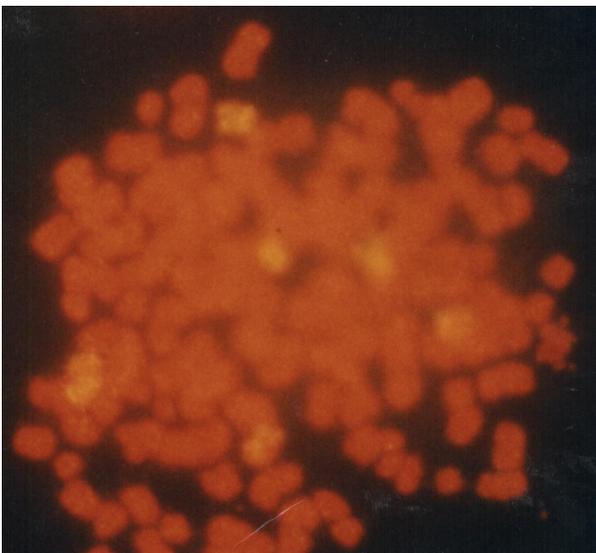


HIBRIDACION *IN SITU* FLUORESCENTE

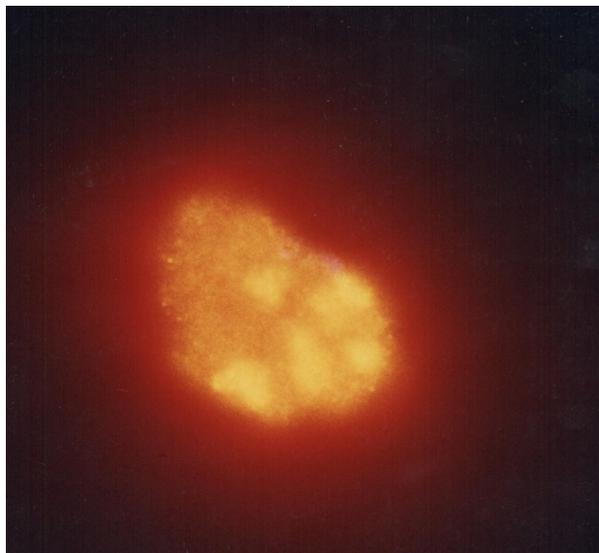
Se aplicó hibridación *in situ* fluorescente (FISH) sobre extendidos del tumor del Paciente 6 utilizando una sonda de pintado cromosómico para el par 6. La citogenética convencional definió un cariotipo pseudodiploide. La técnica de FISH permitió confirmar claramente uno de los reordenamientos estructurales: i(6)(p10) (Figura 4.10A). En la Figura 4.10B se presenta además, una imagen de la técnica aplicada en núcleos interfásicos donde se aprecian los dominios del cromosoma 6. El FISH amplió el perfil cariológico alcanzado por la citogenética clásica, permitiendo detectar no sólo metafases normales y pseudodiploides, sino también núcleos interfásicos y metafases con un nivel superior de ploidía, no detectables con técnicas convencionales, complementando y redifiniendo el halazgo citogenético.

Figura 4.10

A: Pintado cromosómico para el par 6



B: Dominios cromosómicos en núcleo interfásico



ASOCIACIONES TELOMERICAS

En el conjunto de células se observaron múltiples reordenamientos que no constituyeron anomalías clonales. Las asociaciones teloméricas (tas) merecen especial consideración por su frecuente aparición. Se detectó la participación de una o dos cromátidas en el fenómeno, como también la aparición de figuras múltiples de fusión. El análisis de los resultados mostró la presencia de tas en el 25,80% de los casos estudiados (8 de los 31 tumores de la serie). En la Figura 4.11 se muestran algunas de las asociaciones teloméricas (tas) detectadas.

Figura 4.11 Múltiples asociaciones teloméricas en células tumorales.

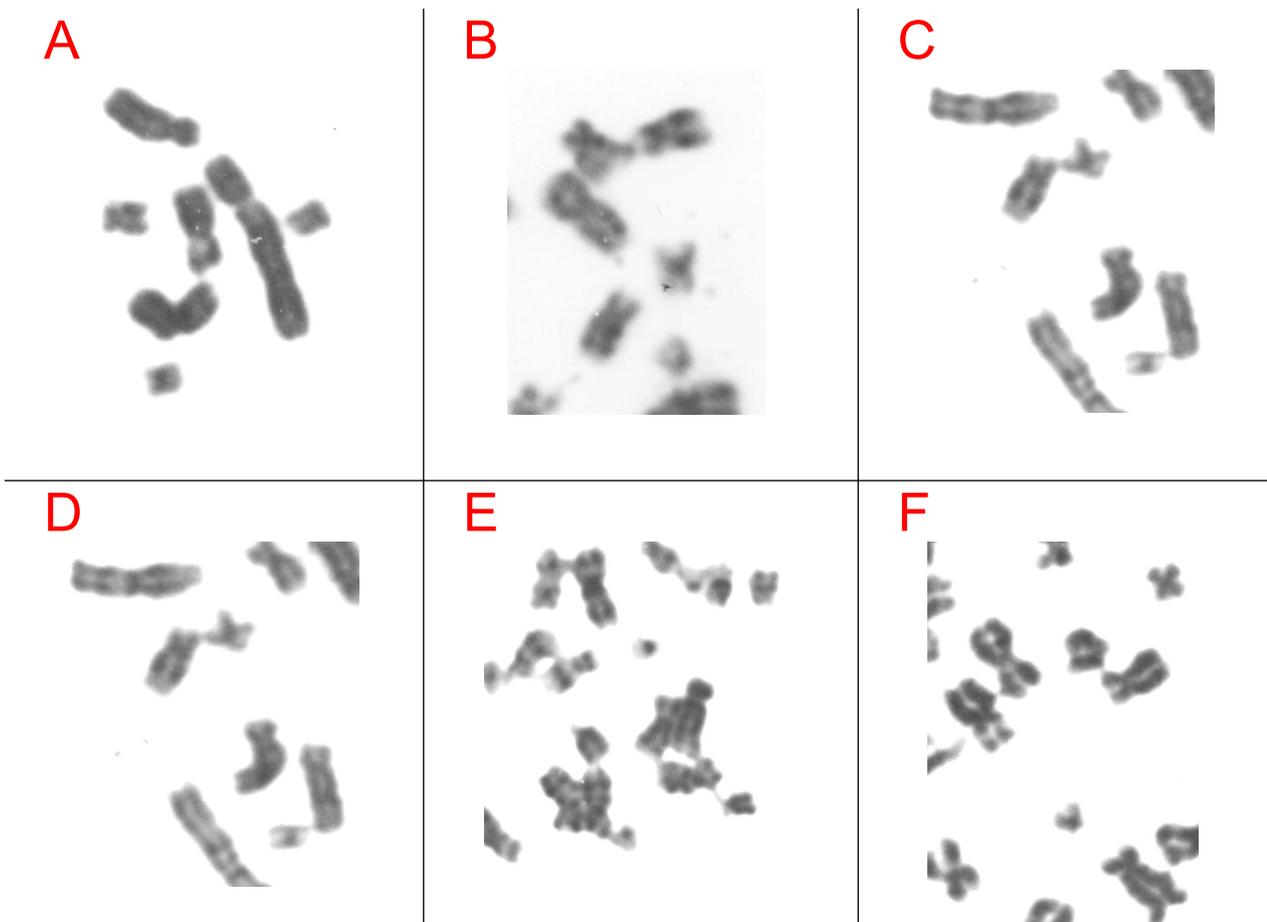


Tabla 4.5 Hallazgos clínico-patológicos, cariotipos y sobrevida de los pacientes.

PACIENTE	EDAD	SEXO	SITIO	TAMAÑO	GRADO	INF LINF	DUKES	CARIOTIPOS	SOBREVIDA
1	82	F	R	45mm	PD	SI	C	AC	58
2	72	F	R	90mm	MD	SI	C	AC	74
3	77	F	R	42mm	PD	SI	C	AC	68
4	84	M	R	50mm	MD	SI	B	AC	63
5	76	M	R	62mm	MD	SI	C	AC	77
6	53	M	R	42mm	MD	NO	A	AC	67
7	74	M	R	65mm	BD	SI	B	AC	64
8	73	F	D	15mm	BD	SI	C	AS	64
9	81	M	A	35mm	BD	SI	C	AC	67
10	67	F	R	45mm	MD	SI	D	AC	65
11	81	F	D	40mm	MD	SI	C	AC	82
12	73	M	S	35mm	MD	SI	B	AC	33
13	70	M	A	70mm	MD	SI	B	AC	21
14	79	M	R	13mm	MD	SI	B	AC	81
15	67	M	D	50mm	BD	SI	B	AC	76
16	72	M	S	58mm	MD	SI	B	AC	73
17	73	F	A	130mm	BD	SI	C	AS	66
18	69	M	R	62mm	MD	SI	B	AC	1
19	83	M	S	55mm	MD	SI	C	AC	21
20	74	M	A	50mm	BD	SI	C	AC	37
21	71	M	R	40mm	BD	SI	B	AS	84
22	74	F	A	120mm	MD	SI	B	AS	90
23 A	52	M	A	25mm	MD	SI	C	AC	99
23 B	52	M	R	27mm	MD	SI	C	AC	33
24	67	F	A	25mm	MD	SI	C	AC	1
25	76	F	R	40mm	MD	SI	B	AS	73
26	63	F	T	37mm	MD	SI	C	AC	13
27	78	M	S	45mm	MD	SI	C	AC	63
28	74	F	A	40mm	MD	SI	B	AC	67
29	77	F	R	45mm	MD	SI	B	AC	25
30	79	F	A	35mm	BD	SI	B	AC	58

SITIO: A (Ascendente), T (Transverso), D (Descendente), S (Sigmoides), R (Recto); GRADO: BD (Bien Diferenciado), MD (Medianamente Diferenciado), PD (Pobremente Diferenciado); CARIOTIPO: AS (Anormal Simple), AC (Anormal Complejo) / N (Numérico), E (Estructural), N y E (Numérico y Estructural). La SOBREVIDA está medida en meses desde la intervención quirúrgica hasta diciembre de 2005.

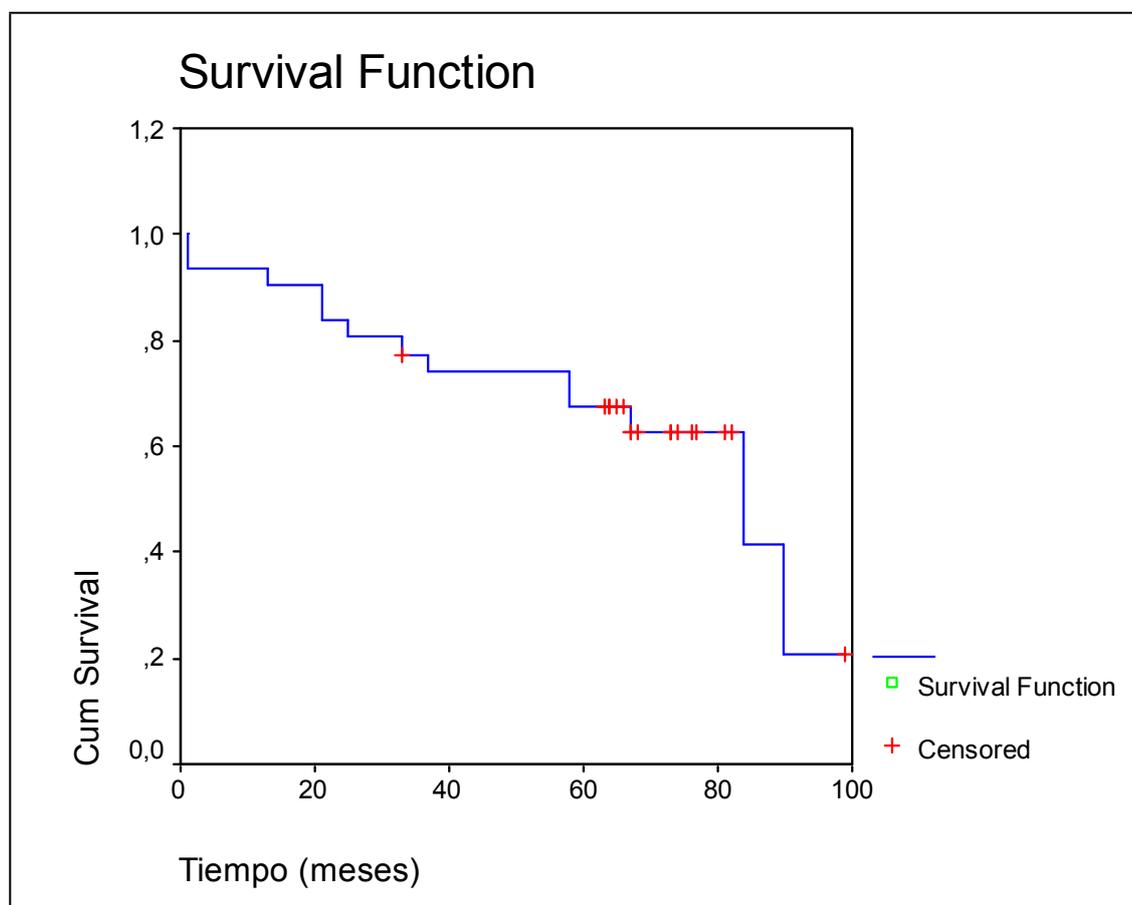
La población analizada (n = 30 pacientes / 31 tumores) presentó una media de edad de 72 años, con una mínimo de 52, una máximo de 84 y un desvío estándar de 8,344852. La mediana se situó en 74. El intervalo de confianza de 95% fue de 69,29392 a 75,41576. La muestra cumplió con los criterios de distribución normal. El valor de χ^2 fue de 4,238487 (df=2) (p=0,1201393). Los tests de Logrank para los contrastes univariados fueron no significativos.

CURVAS DE SOBREVIDA

Las variables clínicopatológicas y cariotipos hallados en los distintos tumores (Tabla 4.5) muestran una distribución global respecto a los tiempos de sobrevida con perfiles similares a los encontrados habitualmente en análisis hechos mediante el método de Kaplan-Meier para CCR (Figura 4.12).

SOBREVIDA GLOBAL

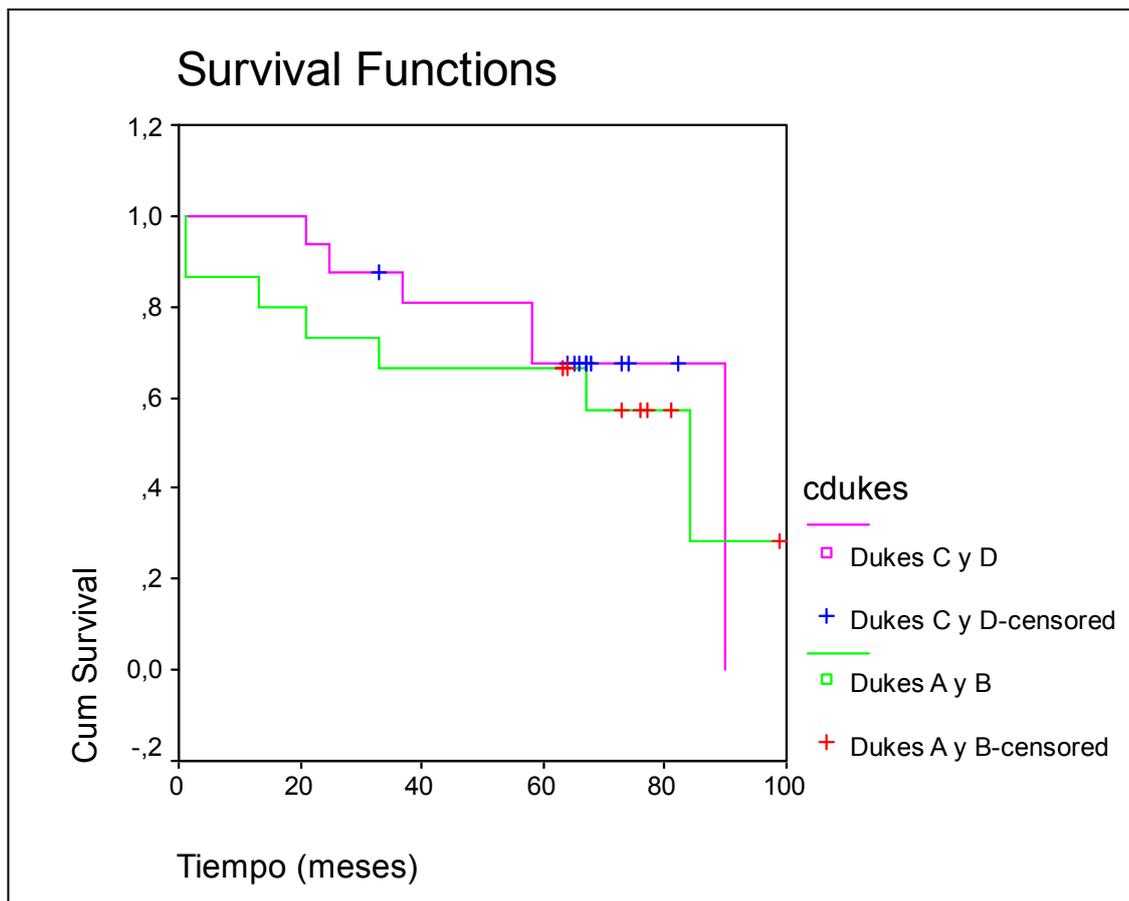
Figura 4.12



SOBREVIDA SEGÚN LA CLASIFICACIÓN DE DUKES

Si agrupamos los estadios de Dukes en dos categorías: Dukes tempranos (A y B) y Dukes tardíos (C y D), observamos que la tendencia de la curva (Figura 4.13) indica una menor probabilidad de sobrevida para estadios de Dukes avanzados.

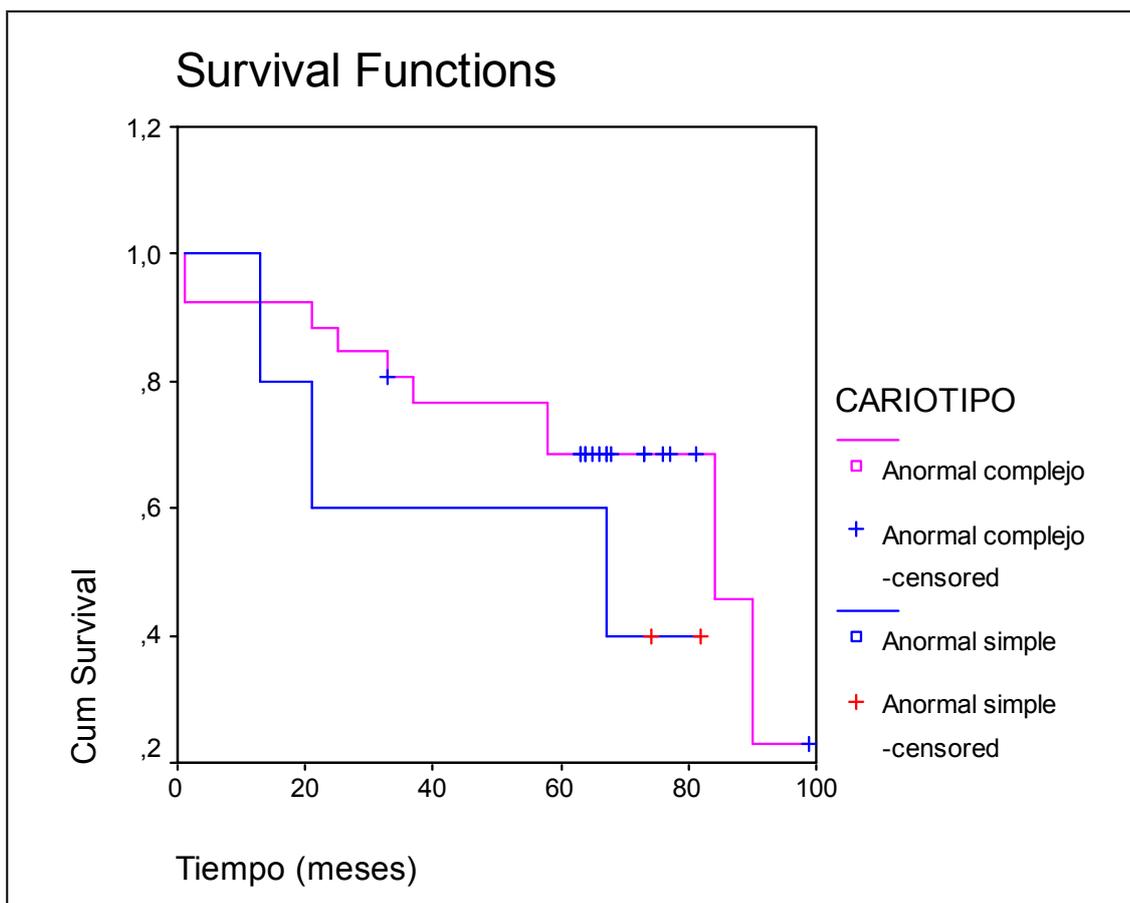
Figura 4.13



SOBREVIDA SEGÚN CARIOTIPO

En esta correlación (Figura 4.14) vemos que la curva vinculada a pacientes con cariotipos anormales simples (con hasta tres anomalías numéricas) tiende a mostrar una probabilidad de supervivencia mayor a largo plazo respecto a la curva correspondiente a los pacientes con tumores más complejos (con anomalías estructurales y/o más de tres anomalías numéricas).

Figura 4.14



5. DISCUSIÓN

Este trabajo constituyó un diseño de cultivo y análisis citogenético de tumores sólidos en el país. El modelo de estudio elegido permitió poner a punto la técnica de cultivo primario en CCR para análisis cromosómico así como comparar nuestros datos con la información publicada a nivel internacional. En el presente estudio se evaluaron 30 pacientes con CCR, uno de ellos (Caso 23) presentó dos tumores sincrónicos. Se observaron alteraciones clonales en el total de los casos.

Hemos observado que el comportamiento bimodal corresponde a la mayor distribución clonal (64,51%), seguido por los tumores que presentan distribución unimodal (22,58%) y trimodal (12,90%). Los datos obtenidos de la literatura muestran que la mayoría se sitúan en el rango de distribución unimodal (72,51%) mientras que los que presentan distribución bimodal y trimodal corresponden a 20,69% y 4,09% respectivamente. Los casos encontrados en la literatura con comportamiento tetra, penta y hexamodal globalmente no superan el 3% (Mitelman, 2019).

Los perfiles cromosómicos de nuestra serie se hallan mayormente cercanos a la diploidía (81,33 %), mientras que 11,86 % se ubican alrededor de la triploidía y sólo 6,77% a nivel de la tetraploidía. Se mantiene la tendencia en los casos reportados en la base de datos de Mitelman con aproximadamente 60 % de los cariotipos cercanos a la diploidía, 25% cercanos a la triploidía y 10 % en el rango de la tetraploidía. No hemos encontrado niveles de ploidía mayores a la tetraploidía, mientras que al momento actual se han reportado aproximadamente 6% de casos con ploidía mayor alcanzando valores desde cercanos a la pentaploidía hasta la nanoploidía.

La causa de la discordancia entre nuestra serie de datos y los publicados a nivel internacional en cuanto a la distribución modal y las diferencias respecto a la ploidía podrían deberse al tamaño pequeño de la muestra de pacientes provenientes de nuestro país comparado con los datos acumulados previamente. En particular los hallazgos de células citogenéticamente normales pudieron ejercer alguna influencia en la determinación del número modal.

El 37% de los tumores mostró cariotipos normales, los que probablemente representen fibroblastos en división. Dichos fibroblastos serían responsables de la síntesis y eliminación de muchos de los productos de la matriz extracelular en el estroma tumoral, así como también una fuente de factores de crecimiento parácrino (célula a célula) que influencia el crecimiento del tumor. Al principio se les atribuyó un rol más pasivo, como de respuesta a la influencia carcinomatosa. Sin embargo, actualmente se piensa que podrían ser potenciales inductores de células tumorales a nivel epitelial (Bhowmick y cols., 2004). Una explicación alternativa sería que las células con cariotipos normales fueran células del parénquima tumoral sin mutaciones somáticas o con reordenamientos genómicos submicroscópicos (Bardi y col., 1993^a).

Las aneuploidías más frecuentes corresponden a las trisomías de los pares cromosómicos **7** (14,92%), **20** (12,68%), **19** (9,70%), **13** (8,20%) y las monosomías de los pares **18** (14,39%), **10** (11,36%), **17** (9,09%). No se observaron monosomías del par **2**. Los datos obtenidos globalmente concuerdan con los valores publicados observándose un incremento a nivel de las monosomías del par 10, trisomías del par 19, y una disminución de las aneuploidías del cromosoma X. Según Lengauer y cols. (1997) la mayoría de los

CCRs presentan un fenotipo de inestabilidad cromosómica y muestran ciertas anomalías con mayor frecuencia que involucran los pares 1, 7, 8, 13, 17, 18 y 20. En el gráfico de la **Figura 4.2 B** se visualiza la comparación entre las poblaciones de Uruguay respecto a los datos aportados por la base de datos en citogenética del cáncer.

Los primeros estudios hechos por hibridación genómica comparada -CGH- en adenomas y carcinomas colorrectales mostraron que en los adenomas se observaron números similares de pérdidas y ganancias, mientras que en los carcinomas son mayores las pérdidas de material genético. En los adenomas las ganancias más frecuentes se observaron a nivel de 13q, 7p, 7q, 8q y 20q, mientras que las pérdidas mayores implicaron 18q, 4q y 8p. En los carcinomas las ganancias más frecuentes fueron en 13q, 8q y 20q y las pérdidas mayores correspondieron a 18q (Meijer y cols., 1998).

La mayoría de los estudios genéticos de la carcinogénesis colorrectal se han focalizado en los cambios hallados en carcinomas primarios, aunque algunos análisis se han hecho en metástasis hepáticas de CCRs mediante CGH. Una comparación de ganancias y pérdidas por CGH y bandeo cromosómico reveló gran similitud entre los tumores. Los desbalances detectados por ambas técnicas fueron ganancias de 6p, 7 y 8q y pérdidas de 4, 5q, 8p y 17p. No obstante por CGH se detecta más a menudo pérdidas de 18q y ganancias de 13q y 20q, mientras que el bandeo cromosómico detectó más pérdidas de 22q. La citogenética convencional tiene sus limitaciones y el cariotipo, a diferencia de la CGH, no es siempre representativo de todas las células malignas en la muestra. En las metástasis hepáticas las anomalías no aleatorias detectadas por CGH incluyeron ganancias del cromosoma 20 y los brazos cromosómicos 7p, 8q y 13q, mientras que las pérdidas incluyeron a los cromosomas 4 y 18 y los brazos cromosómicos 8p y 17p.

Las ganancias de los cromosomas 7 y 13q como resultado de trisomías ocurrirían en etapas tempranas de la tumorigénesis colorrectal dada su frecuencia en adenomas generalmente como anomalía única (Heim y Mitelman, 1995), lo que sugiere su participación en eventos de iniciación del proceso tumoral. La ganancias de 20q también se la ha asociado con la tumorigénesis colorrectal por su vinculación más frecuente en carcinomas que en adenomas de bajo o alto grado de diferenciación (Ried y cols., 1996) y con la inmortalización de células de CCR (Savelieva y cols., 1997). El incremento de 6p se lo ha asociado con estadios avanzados del CCR (estadios D de Dukes) y metástasis (Al-Mulla y cols., 1999). La pérdida de 17p y 18q son importantes eventos reconocidos de la tumorigénesis colorrectal (Fearon y Vogelstein, 1990). La pérdida de los cromosomas 17 y 18 ocurre con mayor frecuencia tardíamente en la secuencia adenoma-carcinoma (Fearon y Vogelstein, 1990), lo que reflejaría la inactivación de los genes TP53 (Fearon y Vogelstein, 1990; Soussi, 2007), DCC (Cho y Fearon, 1995), SMAD2 y SMAD4 (Cho y Fearon, 1995; Arends, 2000). La delección de estas regiones cromosómicas y la inactivación de estos genes supresores de tumores putativos están asociadas con corta supervivencia (McLeod y Murray, 1999). Las pérdidas de 8p y las ganancias de 8q se hallan con mayor frecuencia en carcinomas colorrectales y metástasis más que en adenomas, lo que sugiere que las alteraciones del cromosoma 8 están asociadas con progresión tumoral. La pérdida de 8p también se la ha asociado con microinvación (Kelemen y cols., 1994) y corta supervivencia (Halling y cols., 1999). Algunos genes supresores de tumores se han vinculado a esta región (Cunningham y cols., 1993; Wu y cols., 1997; Oyama y cols., 2000) aunque no es claro su rol en la tumorigénesis al igual

que el de 8q. La pérdida del cromosoma 4 parece ocurrir más frecuentemente en estadios tardíos de la carcinogénesis colorrectal (Griffin y cols., 1993; Bardi y cols., 1995^a; Korn y cols., 1999) así como también en otros neoplasmas (Mertens y cols., 1997), sugiriendo que este cromosoma contendría genes supresores de tumores que influenciarían estadios tardíos de la tumorigénesis.

Las translocaciones observadas no presentan recurrencia en la serie analizada al considerar tanto los reordenamientos balanceados como los desbalanceados. Encontramos que los puntos de ruptura que involucran **1q25** (Bardi y col., 1997), **1q44** (Bardi y col., 1995^a), **13q34** (Parada y col., 1999) y **18q21** (Muleris y col., 1985) aparecen citados una sola vez en la literatura contenida en la base de datos de referencia, lo que nos permite destacar su recurrencia a partir de nuestra serie. Respecto al cromosoma Y, en nuestra serie observamos en el caso 6 una translocación desbalanceada $t(Y;18)(p11.2;q12.2)?$, no descrita previamente en la literatura, que solo refiere una $t(Y;13)$ (Martín y col., 1979), también en situación de desbalance genético.

La **del(7)(q22)** fue observada 1 sola vez en la literatura (Bardi y col., 1995) pasando a ser recurrente a partir de nuestra serie. Las deleciones terminales con puntos de ruptura a nivel de 3q21, 3q23, 3q25 y 11q13q21 no fueron previamente descritas en la literatura (Mitelman, 2019).

Los isocromosomas de 8q y 17q aparecieron con alta frecuencia en nuestra serie (6 casos cada uno), similar a lo descrito previamente (Mitelman, 1994; 2019). No sucedió lo mismo respecto a los isocromosomas 1q y 13q, de los cuales observamos dos casos a nivel del par 1 y un solo caso correspondiente al par 13, siendo más frecuentes en la literatura. Esta variación también podrían estar vinculada al número de tumores analizados. Los isocromosomas son cromosomas monocéntricos o dicéntricos con brazos homólogos simétricos. Son anomalías constitutivas raras en el hombre aunque de frecuente aparición en células neoplásicas y desde que se halló por primera vez el $i(17)(q10)$ asociado a la leucemia mieloide crónica (Lobb y cols., 1972; Mitelman, 1973) se han reportado miles de isocromosomas vinculados a tumores tanto de la esfera hematológica como en tumores sólidos (Mitelman, 2019). En la primera revisión hecha por Mitelman y cols. (1994) en 155 adenocarcinomas de colon hallaron que el 53% presentaba algún isocromosoma, situación que no se ha modificado significativamente mientras que en nuestra serie sólo se encontraron alrededor de 18%. A pesar de la gran cantidad de casos con esta anomalía, poco se conoce acerca de su origen e impacto patogénico. Desde los estudios en meiosis de Darlington (1939) se ha sugerido que son el resultado de una división transversal en vez de longitudinal a nivel centromérico. Otro mecanismo podría ser la translocación o intercambios de cromátidas que involucren cromosomas homólogos. La formación de isocromosomas es un fenómeno común asociado a la progresión de tumores básicamente porque es muy raro encontrarlo como única anomalía y es más frecuente en tumores sólidos que en neoplasias hematológicas (Mitelman, 1993; 1994; 2019).

Cuando los hallazgos citogenéticos son explicados en términos de consecuencias genéticas moleculares, las deleciones o monosomías son interpretadas a menudo como indicadores de pérdida de genes supresores de tumores recesiva. El modelo de Knudson (1971) de inactivación de gen supresor de tumor provee una clave para explicar la significancia biológica de las pérdidas. El alto nivel de trisomías recurrentes o ganancias parciales de cromosomas son tomadas como evidencia circunstancial de

amplificación de oncogenes dominante. El rol de bajo nivel de ganancia no está aún definido. Cuando los reordenamientos involucran intercambio entre cromosomas no homólogos se asocia las regiones involucradas con probables variaciones en la regulación de la expresión génica (Hahn y Weinberg, 2002). En muchos casos, lesiones genéticas específicas se han identificado y asociado con procesos de transformación neoplásica y/o progresión tumoral para determinados tejidos o tipos celulares (Bishop, 1991; Bishop y Hall, 1994; Hahn y Weinberg, 2002). En nuestro análisis se detectaron 38 bandas cromosómicas, de las cuales 14 no fueron previamente descritas en la literatura: Yp11, 1p34, 2q23, 3q21, 3q23, 3q25, 10q11, 11q13, 11q21, 12q11, 13q12, 15q15, 18q11, 18q12.2. Cinco de estas bandas fueron observadas sólo una vez en las publicaciones: 1q25, 7q22 (Bardi y col., 1997), 1q44 (Bardi y col., 1995), 13q34 (Parada y col., 1999) y 18q21 (Muleris y col., 1985), pasando a ser puntos de ruptura recurrentes a partir de nuestros datos. Los restantes puntos son de aparición frecuente en la literatura (Mitelman, 2019), destacándose en nuestra serie las bandas 19 p13, 19q13, 17p11 y 18q21.

Entre las anomalías nuevas, presentan recurrencia en nuestra serie los puntos de ruptura: **1p34, 3q23, 13q12, 15q15 y 18q11**. Esto determinó nuestro interés en analizar los genes que mapean en las mismas.

A nivel de **1q34** encontramos a los genes EIF2C1/EIF2C4 que codifican para proteínas vinculadas a la familia Argonauta (Carmell y cols., 2002) y PAGA/PRDX1 cuya función está relacionada a la supresión tumoral (Prosperi y cols., 1994; Neuman y cols., 2003). Por otra parte en **3q23** ubicamos MED1 en relación a una proteína reparadora de ADN y apoptosis (Hendrich y Bird., 1998; Cortellino y cols., 2003) como también vinculada a la inestabilidad de microsatélites (Bellacosa y cols., 1999). En la misma región encontramos EPHB1 responsable del receptor de tirosina quinasa de efrina (Tang y cols., 1995) como la pérdida de la expresión de EphB (Batlle y cols., 2005). Completando la región tenemos a SMARCA3 (HTLF) que tiene que ver con el remodelado de la cromatina y se halla asociado a genes de la familia SWI/SNF (Moinova y cols., 2002); se agrega TM4SF1 en relación al antígeno de superficie celular L6 (Marken y cols., 1992). En **13q12** hallamos a CDX2 el cual es un homeobox (Woodford-Richens y cols., 2001), LATS2 implicado en la supresión tumoral (Yabuta y cols., 2000) así como en la fidelidad mitótica y estabilidad genómica (Mc. Pherson y cols., 2004), CPAP que actúa como potenciador de la transcripción inducida por TNF- α dependiente de NF κ B (Koyanagi y cols., 2005). En 15q15 se encuentra BUBR1 el que se lo relaciona con la regulación de la unión de los cromosomas al huso y la señalización de los puntos de control mitóticos clonado por Cahill y cols. en 1998 y mapeado por Davenport y cols. En 1999, así mismo tiene interacción funcional con APC (Lampson y Kapoor., 2005; Rao y cols., 2005). También en esta banda cromosómica se ubica TP53DP1 cuyo producto funciona como proteína de unión a p53 (Iwabuchi y cols., 1994) lo que es necesario para la acumulación de p53, detención del punto de control G2/M y en fase S frente a radiaciones ionizantes (Wang y cols., 2002; Huyen y cols., 2004). Finalmente en **18q11** encontramos al gen para N-caderina que constituye una proteínas de adhesión (Wallis y cols., 1994) la que en un modelo animal se la halla involucrada en la proliferación, migración y muerte a nivel de las criptas (Hemirston y Gordon, 1995), RIM cuyo producto con la proteína del gen RB (Fusco y cols., 1998) y CTIP del que su proteína resultante interacciona con RB, BRCA1, Icaros y CtBP interviniendo en la represión

transcripcional y remodelado de la cromatina (Shaepfer y cols., 1998; Chen y cols., 2005) el cual intervendría en la regulación de la embriogénesis temprana (Chinnadurai, 2006). Es posible pensar que estos genes ubicados en las regiones analizadas podrían eventualmente actuar en el proceso de iniciación, desarrollo y/o progresión tumoral del CCR (Mertens y cols., 2015; Okonechnikov y cols., 2016; Hsieh y cols., 2017).

El FISH amplió el perfil cariotípico alcanzado por la citogenética clásica al detectar en núcleos interfásicos y metafases un nivel superior de ploidía, no detectables con técnicas convencionales, lo que permite complementar y redefinir el hallazgo citogenético (Liehr y cols., 2015). Dado la limitación del bandeado cromosómico convencional la aplicación de técnicas citogenéticas moleculares ha mejorado mucho la precisión del diagnóstico citogenético dejando al descubierto un cierto número de aberraciones claves en casos previamente estudiados por citogenética clásica. Un objetivo importante de los recientes desarrollos citogenéticos ha sido aumentar la resolución. Esto se ha logrado mediante avances relacionados con los dos elementos del análisis citogenético, el objetivo y la sonda. Los métodos citogenéticos ahora están disponibles en resoluciones que permiten la identificación de incluso cambios de un solo nucleótido en el genoma. Por lo tanto, la distinción tradicional entre citogenética y genética molecular se está desvaneciendo. El desarrollo de procedimientos para la hibridación de múltiples sondas, cada una etiquetada en un color diferente, a objetivos tales como extensiones de metafase y núcleos interfásicos, ha tenido un tremendo efecto en la aplicación de la citogenética en la clínica y para la investigación básica. Los enfoques multicolores ahora están disponibles y permiten analizar incluso reordenamientos cromosómicos complejos, como se ve con frecuencia en tumores sólidos. Esto puede llevarse a cabo tanto en extensiones de metafase como en núcleos de interfase. La introducción de tecnologías de matriz para el análisis del genoma ha tenido un gran efecto en las aplicaciones citogenéticas. Se ha desarrollado una amplia variedad de plataformas de matriz, incluido el escaneo de todo el genoma para polimorfismos y cambios en el número de copias submicroscópicas. La identificación de cambios de un solo par de bases con fines de genotipado y la identificación de modificaciones epigenéticas también es posible utilizando estas técnicas. Una característica importante de los análisis citogenéticos es la capacidad de proporcionar información a la resolución de una sola célula. Aunque esto ha sido posible durante algún tiempo utilizando la tecnología de hibridación fluorescente *in situ*, los desarrollos recientes en la amplificación imparcial del ADN ahora permiten analizar células individuales utilizando aplicaciones de exploración del genoma, como la hibridación genómica comparativa. Las muchas tecnologías citogenéticas que ahora están disponibles permiten mucho más que una simple descripción del estado cromosómico o del ADN de una célula o tejido. La citogenética trifásica de interfase y el mapeo en microarrays de ADN que se ha enriquecido con la inmunoprecipitación de cromatina están comenzando a proporcionar nuevas ideas sobre la organización funcional del genoma. La hibridación *in situ* con fluorescencia de interfase multicolor nos ha ayudado a comprender mejor cómo se organiza el genoma en tres dimensiones. Los avances recientes en la hibridación *in situ* de fluorescencia de cuatro dimensiones contribuirán a una mejor comprensión de la interacción dinámica entre el genoma y sus factores reguladores en las células vivas. Por ello, estas tecnologías cierran la brecha entre el abordaje citogenético y el que permite la biología molecular (Speicher and Carter, 2005; Keren y cols., 2010; Das y Tan; 2013; Balajee y Hande, 2018; Braun y cols., 2019; Fiedler y cols., 2019).

Las asociaciones teloméricas no fueron objeto de un análisis cuantitativo, pero su presencia en más del 20% de los casos analizados nos conduce a pensar en la importancia de este fenómeno como causa de inestabilidad cromosómica y su papel en la tumorigénesis (O'Sullivan y cols., 2006). Diferentes estudios han demostrado que el acortamiento telomérico se encuentra asociado a la senescencia replicativa y a la presencia de inestabilidad cromosómica (Raynaud y cols., 2008), mecanismos que contribuyen directamente a la aparición de las anomalías cromosómicas observadas en las diferentes neoplasias, particularmente en tumores sólidos (Sandberg, 1990; Mrozek y Limon 1992; Prescott y cols., 2012). Esta reducción de la longitud telomérica llevaría a la formación de asociaciones teloméricas, consideradas como un primer evento en la generación de anomalías cromosómicas. Dichas alteraciones ocurrirían como resultado de ciclos de ruptura y fusión, que llevarían a desbalances de material genético e inestabilidad genómica y aumentarían la probabilidad de producir errores capaces de generar cambios de importancia para el proceso de desarrollo neoplásico (Ye y cols., 2010; Eissenberg, 2013; Bertorelle y cols., 2014).

Si bien los mecanismos que producen asociaciones teloméricas son aún desconocidos, podrían estar asociados a fallas en la actividad de la enzima telomerasa, una ribonucleoproteína con actividad de transcriptasa reversa específica de los telómeros, que permitiría mantener la longitud telomérica en equilibrio, de modo que la célula pueda seguir proliferando (Greider, 1996). La telomerasa es muy activa en células fetales, que mantienen un alto nivel de proliferación, pero muestra escasa actividad en células de adultos (Miura y cols., 2004). La observación que las células tumorales expresan niveles elevados de telomerasa ha llevado a especular que su reactivación puede ser necesaria para el crecimiento tumoral, y que su inhibición podría suponer un nuevo tipo de terapia contra el cáncer. El mantenimiento de los telómeros juega un papel importante en la inmortalización celular (Shay y Wright, 2005), como se deduce de la observación de que ratones que carecen de telomerasa muestran un acortamiento de su vida, algunos síntomas de envejecimiento prematuro, una menor capacidad de cicatrización de heridas, y una mayor incidencia de cáncer (Agaki, 2004). Aunque la telomerasa por sí sola no causa transformación celular, la reactivación de la telomerasa coopera durante el proceso tumorigénico con mutaciones en oncogenes como ras y genes supresores como p53 y Rb (Shats y cols., 2004). La eliminación de la telomerasa y, por tanto, el acortamiento progresivo de los telómeros, causa inestabilidad cromosómica, errores en la segregación, aparición de anomalías cromosómicas y diversos tipos de mutaciones. En esta situación, la inducción del gen supresor p53 parece ser importante para provocar la muerte celular programada y evitar así la acumulación de mutaciones y malignización de las células. Si la expresión de p53 se anula por mutación se produce lo que se ha denominado la catástrofe genética, con masiva acumulación de mutaciones (Sundaram, 2004). Datos de la literatura han demostrado una correlación positiva entre la presencia de anomalías cromosómicas y acortamiento telomérico (Höglund, 2002), habiéndose detectado que aquellos cromosomas con telómeros críticamente acortados se encontraban preferentemente involucrados en rearrreglos estructurales en neoplasias (Gisselsson, 2002). El acortamiento telomérico de las células epiteliales caracteriza la transición adenoma-carcinoma en los cánceres colorrectales humanos, lo que sugiere que los carcinomas provienen de células con acortamiento crítico de los telómeros dentro del adenoma (Plentz y cols., 2003). Ya que la transición adenoma-carcinoma en el CCR está caracterizado por un incremento de la inestabilidad cromosómica y

puentes anafásicos, se ha planteado la hipótesis de que el acortamiento telomérico iniciaría el proceso de carcinogénesis colorrectal provocando inestabilidad cromosómica (Gisselsson y Höglund, 2005).

El tratamiento de las células UXF1138L, provenientes de un carcinoma de útero, con la sal de metasulfato de acridinio pentacíclico RHPS4 conduce al desplazamiento de la subunidad catalítica de la telomerasa (hTERT) del núcleo, la inducción de la señalización iniciada en el telómero frente a daño del ADN y la fusión cromosómica. Aunque su acción *in vivo* es limitada, una combinación de RHPS4 con un veneno del huso mitótico como el Taxol causa la remisión de tumores y la potenciación posterior de la función del telómero (Phatak y cols., 2007).

Las células tienen una determinada capacidad intrínseca de proliferar. Generalmente se dividen hasta que llegan a un grado de diferenciación en que han adquirido las características óptimas para desarrollar una función, con una capacidad finita de proliferación que abarca unas 50 divisiones. Durante la fase final, las células entran en un proceso de degeneración llamado crisis que conduce a la senescencia o envejecimiento y posteriormente a la muerte (Zhang y Cohen., 2004). La apoptosis o muerte celular programada se produce de modo natural durante el desarrollo embrionario y postnatal temprano en múltiples tejidos. Su función puede ser la eliminación de células superfluas en un lugar determinado. Durante el ciclo celular, se produce apoptosis mediada por el gen supresor p53 u otros mecanismos cuando el DNA que va a ser o está siendo replicado presenta alteraciones, evitándose así la generación de células anormales. La mayor parte de los agentes empleados en quimioterapia anticancerosa basan su acción en la producción de roturas y/o alteraciones en el DNA de las células. De este modo, inducen el fenómeno de apoptosis y la muerte de las células tumorales. Desgraciadamente, una de las causas de fallo de los tratamientos quimioterápicos es la aparición de resistencias a la muerte apoptótica de las células tumorales como consecuencia de la mutación de genes como p53. Cabe pensar que la activación específica de las rutas de inducción de apoptosis sin necesidad de utilizar compuestos que dañen el DNA, o que actúen en etapas del proceso posteriores a la intervención de p53 tendrían la ventaja de ser eficaces en células con el gen p53 mutado, como son la mayoría de las células cancerosas (Carethers y Jung; 2015) por lo que adquiere especial relevancia el uso de biomarcadores en el CCR (Popp y cols., 2016; Batista y cols., 2019).

Las mutaciones que hacen que el ciclo celular progrese de manera descontrolada son un requisito previo en la tumorigénesis. No obstante, la evolución ha instalado en los programas de proliferación en células de mamífero una variedad de mecanismos innatos de supresión tumoral que desencadenan la apoptosis o la senescencia, a efectos de prevenir una proliferación aberrante. Aunque la proliferación y la muerte celular son destinos celulares diametralmente opuestos, ambos procesos están ligados y son interdependientes (Evan y col, 1992; Evan y Vousden, 2001). Hay una superposición entre las maquinarias que conducen a la proliferación y a la apoptosis. Los dos procesos están unidos en varios niveles a través de moléculas individuales responsables de orquestar la expansión celular, a menudo blancos de mutaciones oncogénicas. Existen mutaciones que promueven la proliferación celular que cooperan con aquellas que inhiben la proliferación proveniente de la apoptosis durante la transformación y la tumorigénesis (Evan y Vousden, 2001; Fridman y Lowe, 2003). Si bien se acepta que el fenómeno de apoptosis inducida por oncogenes es un mecanismo innato de supresión tumoral, recién se ha comenzado a desentrañar la diversidad

y la complejidad de los vínculos existentes entre las lesiones oncogénicas y la maquinaria apoptótica. Existe una vía intrínseca que constituye la respuesta primaria de apoptosis frente a señales de factores de sobrevida, stress e injuria celular. El conducto central de esta vía es la mitocondria, en cuyo espacio intermembranoso secuestra varios efectores proapoptóticos que una vez liberados gatillan la demisión celular. La permeabilidad mitocondrial está determinada por el balance entre las proteínas proapoptóticas Bax/Bak y sus similares Bcl2/BclXL (Danial y Korsmeyer, 2004; Cory y col, 2003; Green y Kroemer, 2004). Por otro lado, una vía extrínseca de muerte celular es activada a través de la unión de receptor vinculados a muerte celular en la superficie, tales como Fas/CD95, receptor del TNF y DF5 con sus respectivos ligandos FasL, TNF α y TRAIL (Peter y Kramer, 2003). Una vez unidos, estos receptores forman el complejo de señalización para la inducción de la muerte celular(DISC), que activarán a la cascada de la caspasa-8 apical. En muchos tipos celulares, esto hecho es suficiente para activar la cascada que lleva a la apoptosis; en otros es necesaria la participación del componente mitocondrial. p53 es un factor de transcripción que establece programas para apoptosis, senescencia y reparación en respuesta a una variedad de elementos que provocan el estrés celular tales como, daño en el ADN, hipoxia y disminución del aporte de nutrientes. Los blancos transcripcionales conocidos de p53 en la promoción de apoptosis incluyen miembros Bcl2 proapoptóticos como puma, noxa, Bid y Bax (Fridman y Lowe, 2003), así como también componentes de la señalización de la recepción de muerte celular, la maquinaria apoptótica efectora, entre otros menos conocidos; p53 también es inducida por muchos oncogenes, como E1A, Myc y E2F (Fridman y Lowe, 2003; Vogelstein y col, 2000). La apoptosis no es la única respuesta antiproliferativa unida a la señalización oncogénica. Los oncogenes activados también pueden desencadenar la senescencia celular (Dimri y col., 2000; Damalas y col., 2001; Serrano y col, 1997), un estado caracterizado por un freno permanente del ciclo celular y cambios específicos en la morfología y la expresión génica, distinguiéndose de la quiescencia, el cual es un estado reversible de la detención del ciclo celular. Mientras la senescencia replicativa es inducida por la erosión de los telómeros durante la división celular, puede ocurrir un fenotipo similar en células jóvenes frente a la activación de oncogenes, daño a nivel del ADN o estrés oxidativo (Campisi, 2001; Shay y Roninson, 2004). Las proteínas Rb y p53 son reguladores claves del programa de senescencia celular en la mediación del chequeo del ciclo celular y la supresión tumoral.

En función de los estudios moleculares llevados a cabo hasta el momento, se consideran dos vías preferenciales de progresión tumoral en el CCR: la vía de la inestabilidad de microsátélites y la vía de la inestabilidad cromosómica. Aunque se puede dar cierto solapamiento entre ambas vías normalmente esto no ocurre, lo que sugiere que las dos formas de inestabilidad aumentan la tasa de mutación de manera suficiente como para producir tumorigénesis (Loeb y Loeb, 1999). El análisis detallado de ambas vías de progresión tumoral y su posterior comparación permite concluir que, aunque por diferentes caminos, los dos conllevan la alteración de los mecanismos cruciales de control de crecimiento. El mejor ejemplo es el sistema APC- β -catenina, el cual se tiene que inactivar para iniciar el crecimiento del tumor colorrectal. En los tumores con inestabilidad cromosómica este mecanismo se altera gracias a la mutación intragénica de APC junto con la pérdida del alelo normal debida a pérdida cromosómica. Sin embargo, en los tumores con inestabilidad de microsátélites la inactivación de este sistema se da por mutaciones intragénicas de ambos alelos de APC

debido a la presencia de secuencias microsatélite en su región codificante. En ambas vías también se pueden producir mutaciones en β -catenina. Por tanto, se obtiene el mismo resultado funcional independientemente del tipo de inestabilidad genética que actúe (Cahill y col., 1999).

Múltiples estudios han intentado caracterizar ambas vías de progresión en diferentes series de tumores colorrectales. Mientras que en algunos casos la definición de los dos grupos se basaba en un criterio único de presencia o ausencia de inestabilidad de microsatélites (considerando que el grupo con inestabilidad cromosómica lo constituían tumores sin inestabilidad de microsatélites) (Breivik y col., 1997; Olschwang y col., 1997), en otros se intentaba medir el grado de inestabilidad cromosómica mediante técnicas como el análisis de pérdida de heterocigosidad (Tomlinson y col., 1998), la citometría de flujo (Yao y col., 1999; Pinto y cols., 2002) y la hibridación genómica comparada (Georgiades y col., 1999). La heterogeneidad de las diferentes aproximaciones se ve reflejada en la variabilidad de los resultados obtenidos. Mientras algunos estudios encuentran que los genes alterados en tumores MSI+ y MSI- podrían presentar diferencias mayores a lo estimado previamente (Olschwang y col., 1997), otros afirman que existe un gran solapamiento en el espectro de mutaciones (Tomlinson y col., 1998). También hay estudios que sugieren que las diferentes vías de progresión están condicionadas por factores relacionados con el sexo (Breivik y col., 1997) o la edad (Ionov y col., 1993). Por último, algunos de los estudios que analizan de forma independiente la inestabilidad de microsatélites y la cromosómica encuentran que hay un subgrupo de tumores que no presenta ninguna de las dos y que podrían pertenecer a una tercera vía de progresión tumoral con alguna forma de inestabilidad genómica desconocida o sin inestabilidad (Yao y col., 1999; Georgiades y col., 1999; Martín y col., 1999).

Ante la dificultad para encontrar criterios moleculares para la definición de las vías de progresión de los tumores colorrectales, se encuentra una propuesta atractiva en los estudios citogenéticos llevados a cabo por el grupo de Dutrillaux. Hace más de una década que estos autores definieron tres patrones de progresión tumoral colorrectal basándose en la comparación de metafases de tumores individuales y reconstruyendo su evolución clonal. Los tres patrones son: a) tipo monosómico (MT) (70 % de los tumores), caracterizado por la pérdida conjunta de los cromosomas 17p y 18, la presencia de monosomías, deleciones y reorganizaciones estructurales y la tendencia a la poliploidización; b) tipo trisómico (TT) (20-25 % de los tumores), caracterizado por la presencia de trisomías y la ausencia de poliploidías y de alteraciones estructurales, y c) tipo normal (NT) (5-7 % de los tumores), con cariotipo estable (Muleris y col., 1988; Muleris y col., 1990). Se podría pensar que los cariotipos normales pertenecen a células no tumorales, pero el carácter maligno se demostró al poder ser injertados en ratones atímicos (Dutrillaux, 1995). Respecto a los tumores monosómicos hay que señalar que la progresión se inicia con deleciones de brazos cromosómicos que conducen a hipodiploidía, pero posteriormente la fuerte tendencia a la endoreduplicación lleva a la formación de subclones hipotetraploides (Dutrillaux, 1995). A partir de estas observaciones, se propusieron los subtipos monosómicos “quasi” diploide y monosómico poliploide, pero al no hallarse diferencias significativas entre ellos se abandonó esta distinción (Muleris y Dutrillaux, 1996). Esta clasificación se basa en datos citogenéticos, pero también se ha demostrado que se asocia con parámetros clínicos y moleculares. Los tumores trisómicos y de cariotipo normal muestran características similares: se encuentran preferencialmente en el colon proximal, tienen baja incidencia de mutación de p53 y presentan inestabilidad

de microsatélites. Sin embargo los tumores monosómicos muestran las características opuestas (Dutrillaux, 1995). El hecho de que estos tumores presenten reorganizaciones estructurales y deleciones cromosómicas y no tengan inestabilidad de microsatélites aporta nuevos argumentos para considerar los dos mecanismos como vías de progresión tumoral diferentes (Remvikos y col., 1995).

La existencia de modelos matemáticos que relacionan la progresión tumoral con los fenómenos de pérdida y ganancia cromosómica podrían ser muy útiles en la determinación de genes involucrados en el cáncer y en su diagnóstico. La inferencia de fundamentos matemáticos respecto a la progresión tumoral basado en datos provenientes de análisis de CGH permite considerar un tipo de modelo triple para el desarrollo del CCR (Desper y cols., 1999; 2000) más que un modelo secuencial como se pensó inicialmente (Fearon y Vogelstein, 1990).

Experimentos más recientes siguen aportando datos que aumenta todavía más la complejidad de la interpretación de la progresión tumoral colorrectal. Se ha propuesto la existencia de un tipo de tumor colorrectal que se originaría debido a mutaciones de células del estroma y no de células epiteliales. Los pacientes con síndrome de poliposis juvenil o con colitis ulcerosa desarrollan pólipos hamartomatosos los cuales pueden progresar hacia la malignización. Se cree que estos pólipos se originan debido a la acumulación de alteraciones en células del estroma, que pueden conducir a la proliferación anormal de las células epiteliales. A este efecto se le conoce como efecto landscaper (de paisaje o entorno) (Kinzler y Vogelstein, 1998). En diferentes grupos de pacientes con JPS se han encontrado mutaciones germinales en los genes PTEN y SMAD4 (Laghi, 2000). Estudios posteriores tendrán que demostrar si existe inactivación de la segunda copia de estos genes en las células estromales o en las epiteliales y, de existir en las primeras, se tendrá que elucidar cuál es el mecanismo de esta nueva alternativa de progresión tumoral (Kinzler y Vogelstein, 1998).

El cáncer es una enfermedad genética acompañada por fenómenos epigenéticos tempranos que involucran tanto eventos de metilación, modificación de proteínas histónicas y remodelación de la cromatina (Esteller, 2006; Kawakami y cols., 2006). La inactivación de genes supresores de tumores específicos por silenciamiento transcripcional con hipermetilación de los promotores constituye un evento común a nivel tumoral. El fenotipo metilador de las islas CpG [CpG-island methylator phenotype (CIMP+)] en el CCR está caracterizado por hipermetilación frecuente en la región promotora de los genes supresores de tumores a diferencia del bajo nivel de metilación encontrado en las islas CpG de la mucosa colónica normal. Estudios hechos en CCR mediante amplificación de sitios intermetilados [amplification of intermethylated sites (AIMS)] y secuenciación en presencia de bisulfito confirmaron la metilación diferencial en el ADN. Concomitantemente, análisis de expresión llevados a cabo mediante reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR) revelaron la inactividad génica a nivel del gen de la prostaciclina sintetasa (PTGIS) (Frigola y cols., 2005). Se asocia la hipermetilación de las islas CpG del promotor del gen PTGIS con aneuploidía y mutaciones de p53. Otros estudios apuntan hacia el valor de los fenómenos epigenéticos en la regulación génica de células de CCR que escapan a la vigilancia inmunológica (Sato y cols., 2004). Son muy interesantes los estudios realizados con la línea celular CLY derivada de metástasis hepática de un paciente con CCR y trasplantada en ratones atímicos, cuyos hallazgos vinculan la aparición de aneuploidía

con disminución de la expresión del gen de la catenina β y silenciamiento de la caderina E por aumento de los niveles de metilación en sus promotores. Estos modelos *in vitro* e *in vivo* permitirán explorar los mecanismos metastáticos del CCR y abrirán la posibilidad de probar nuevos agentes terapéuticos para tratar pacientes en estadios avanzados de la enfermedad CCR (Li y cols., 2007).

A la vista de los datos expuestos resulta evidente la dificultad de integrar toda la información en una explicación clara y coherente de cómo ocurre la progresión tumoral colorrectal. La mayoría de los conocimientos actuales constituyen piezas aisladas, difíciles de ensamblar debido a la falta de resultados que permitan confirmar y relacionar las diferentes teorías. Sin embargo, una de las estrategias que surge como más clara es la necesidad de abordar la explicación de la formación de los tumores no como un proceso único, sino como el conjunto de diferentes procesos que pueden conducir a la tumorigénesis de forma independiente. De hecho, la existencia de múltiples vías de progresión tumoral encaja más acertadamente con el fenómeno de la inestabilidad genómica. Dado el elevado número de mecanismos de control de la estabilidad del genoma (Cheng y Loeb, 1993) es lógico pensar que la alteración en cualquiera de ellos pueda conducir a un tipo concreto de inestabilidad y consecuentemente a un proceso independiente de tumorigénesis. Por tanto, la visión globalizadora del modelo de Vogelstein, que fue útil en su momento para ilustrar la idea de evolución progresiva del CCR, comienza a ser sustituida por propuestas más concretas que definen diferentes modelos de progresión para diferentes grupos de tumores (Meijer y cols., 1998; Desper y cols., 1999; 2000). El estudio del daño genómico presente en los tumores puede colaborar en la identificación de los diferentes tipos de inestabilidad genómica y la caracterización de las posibles vías de progresión tumoral (Desper y cols., 1999; 2000).

El seguimiento de las aneuploidías y la inestabilidad cromosómica posee una indudable importancia por su posible aplicación a nivel clínico. En ese sentido, cabe destacar que los cánceres que son aneuploides y/o inestables cromosómicamente tienen, en general, un pronóstico más pobre que los cánceres diploides. El grado de la aneuploidía se correlaciona con la severidad de la enfermedad (Zhou y col., 2002; Watanabe y col., 2001). En nuestra serie el resultado del análisis estadístico mediante el método de estimación de sobrevida de Kaplan-Meier mostró que la información obtenida estaba acorde a lo esperado. La distribución global respecto a los tiempos de sobrevida mostró perfiles similares a los encontrados habitualmente para CCR al considerar las variables clínicopatológicas y cariotipos hallados en los distintos tumores (Figura 4.12). La separación en estadios de Dukes tempranos y tardíos en nuestro trabajo permitió separar dos grupos con perfiles definidos en cuanto a probabilidad de sobrevida a largo plazo (Figura 4.13). Resulta muy atractiva la obtención de una correlación entre menor probabilidad de sobrevida y aumento del grado de aneuploidías y/o reordenamientos cromosómicos (Figura 4.14) con una tendencia similar a los trabajos previamente publicados (Bardi y cols., 1993^a; 1993c; 2004). Esto apoya la teoría que se ha manejado en los últimos quince años en que los cariotipos de tumores colorrectales deben ser tenidos en cuenta en el contexto general del manejo clínico de esta patología (Bardi y cols., 2004; Westra y cols., 2004).

No es claro el motivo para que exista un pronóstico más pobre y algo a destacar es que los cánceres deficientes en los sistemas de reparación 'mismatch' (emparejamientos incorrectos) tienen una aptitud genética mayor que los cánceres cromosómicamente inestables (Nowak y col., 2002). Otro punto importante

acerca del pronóstico es que el estado de la ploidía generalmente no es utilizado para guiar regímenes de tratamiento para pacientes con tumores sólidos. Esto es cierto a pesar del hecho que la ploidía parece más predictiva de respuestas clínicas que otras herramientas comúnmente usadas (Sinicrope y cols., 2006).

La inestabilidad cromosómica también puede contribuir a la capacidad del cáncer para adquirir quimiorresistencia. Aunque los mecanismos de quimiorresistencia a los agentes quimioterapéuticos comunes son desconocidos (Lowe y col., 2004), unos pocos casos selectos indican que la inestabilidad cromosómica puede tener un rol importante. La CIN probablemente contribuya a la evolución tumoral por vías similares en ausencia de drogas, facilitando la generación de células ocasionales que tengan la capacidad de crecer más eficientemente en ambientes hostiles puestos en marcha por las defensas naturales del huésped (Rajagopalan y Lengauer, 2004).

La relevancia de la CIN en el pronóstico y en su capacidad aparente permitiendo la evasión de la intervención quimioterapéutica la hacen blanco del desarrollo racional de nuevos enfoques terapéuticos. Hay por lo menos dos vías donde se podría operar. Una aproximación implicaría a la inestabilidad cromosómica como diana directa, ya que reduciendo la concentración de proteína de punto de control como BUBR1 o MAD2, o bien inhibiendo la actividad quinasa de BUBR1 puede provocar la muerte celular por apoptosis en células aneuploides de cánceres humanos (Kops y col., 2004). La supresión de la señalización del punto de control mitótico parece invariablemente letal como consecuencia de la pérdida cromosómica masiva (Rajagopalan y Lengauer, 2004). Ambas familias génicas BUB y MAD fueron originalmente identificadas en levaduras porque mutaciones en estos genes conferían resistencia a la detención en mitosis en respuesta a agentes farmacológicos particulares (Spencer y col., 1990). Es posible que las drogas anti-CIN puedan ser encontradas haciendo lo contrario. Comenzando con las causas genéticas de la inestabilidad cromosómica, una búsqueda de drogas a gran escala para pequeñas moléculas de inhibidores de inestabilidad cromosómica que actúen de una manera genotipo específica podría ser hallada (Rajagopalan y Lengauer, 2004). Una segunda aproximación con las CIN como diana sería hallar agentes que inhiban las vías necesarias para mantener la inestabilidad cromosómica. En esta vía los compuestos anti-CIN podrían servir como un agente coadyuvante de la quimioterapia, previniendo al cáncer de la adquisición de nuevas mutaciones que les permita desarrollar resistencia a otros agentes citotóxicos (Rajagopalan y Lengauer, 2004).

Si se considera la visión mecanística de estos fenómenos genéticos y los aspectos clínicos en forma conjunta, se puede anticipar que el desafío clave en la próxima década será dilucidar los complicados eventos que subyacen en la aneuploidía y la inestabilidad genómica, y aplicar creativamente este conocimiento en la terapéutica contra el cáncer. Los neoplasmas son un microcosmos de evolución. Dentro de un neoplasma, un mosaico de células mutantes compiten por espacio y fuentes nutricias o energéticas, evadiendo el control que ejerce el sistema inmune y contribuyendo o bien, a la dispersión o a la colonización de nuevos órganos. La evolución de las células neoplásicas explica tanto, por qué podemos adquirir un cáncer y por qué ha resultado difícil obtener índices de curación significativos. Las herramientas de la biología y la ecología evolutiva están ofreciendo nuevas perspectivas en el conocimiento de la progresión tumoral y el control clínico del cáncer (Merlo LMF y cols., 2006; Davis y cols., 20017; Liggett y DeGregori; 2017; Somarelli y cols., 2017; Sottoriva y cols., 2017; Liu, 2018; Scherer, 2020).

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- 1) El análisis genético del CCR en el Uruguay ha significado un avance en el desarrollo metodológico de la puesta a punto de cultivos primarios en tumores sólidos y su aplicación para estudios citogenéticos.
- 2) Los perfiles cromosómicos obtenidos siguen apoyando la idea de que esta patología neoplásica es un proceso dinámico complejo no librado al azar en cuanto a su inicio y desarrollo.
- 3) El modelo inicial de tumorigénesis colorrectal secuencial está siendo modificado por aportes continuos que postulan vías de origen y progresión múltiples.
- 4) La identificación y la evolución de estas aberraciones en un contexto metodológico múltiple son de creciente utilidad para el manejo clínico de la enfermedad cáncer.
- 5) La distribución global respecto a los tiempos de sobrevida, con perfiles similares a los encontrados habitualmente en análisis realizados mediante el método de Kaplan-Meier para CCR, afirman el hecho de que las variables clínicopatológicas y los cariotipos hallados en los distintos tumores pueden ser de utilidad en el establecimiento del pronóstico de la neoplasia.
- 6) La recurrencia de regiones cromosómicas involucradas en nuestra serie permitiría establecer posibles genes candidatos que pueden ser útiles para dilucidar los mecanismos de la transformación neoplásica colorrectal con probable función oncogénica y/o supresora de tumores.
- 7) La trascendencia de estos hallazgos citogenéticos y moleculares en el estudio del CCR pueden estimarse mejor al considerar el rol de los diferentes procesos celulares vinculados a la aneuploidía que conducirán a esfuerzos concertados para desarrollar nuevas terapéuticas en el manejo de esta enfermedad dirigidos contra una de las características más antiguas reconocidas en el cáncer.

7. BIBLIOGRAFIA

- Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkanene L, Mecklin J-P, Jarvinene H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, Petersen GM, Kinzler KW, Vogelstein B, de la Chapelle A (1993) Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 260:812-816.
- Abdel-Rahman WM, Katsura K, Rens W, Gorman PA, Sheer D, Bicknell D, Bodmer WF, Arends MJ, Wyllie AH, Edwards PA (2001) Spectral karyotyping suggests additional subsets of colorectal cancers characterized by pattern of chromosome rearrangement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(5):2538-43.
- Agapova LS, Ilyinskaya GV, Turovets NA, Ivanov AV, Chumakov PM, Kopnin BP (1996) Chromosome changes caused by alterations of p53 expression. *Mutat Res* 354(1):129-38.
- Akagi T (2004) Oncogenic transformation of human cells: shortcomings of rodent model systems. *Trends Mol Biol* 10(11):542-8.
- Al-Mulla F, Keith WN, Pickford IR, Going JJ, Birnie GD (1999) Comparative genomic hybridization analysis of primary colorectal carcinomas and their synchronous metastases. *Genes Chromosomes Cancer* 24(4):306-14.
- Amaro, Chiara, Pfeffer (2016) Molecular evolution of colorectal cancer: from multistep carcinogenesis to the big bang. *Cancer Metastasis Rev* 35(1):63-74.
- ASCO (2019) <http://www.cancernet/tipos-de-cancer/cancer-colorrectal/estadisticas>
- American Cancer Society (2019) <https://www.cancer.org/es/>
- Arends JW (2000) Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinoma. *J Pathol* 190(4):412-6.
- Arribas R, Risques RA, Gonzalez-Garcia I, Masramon L, Aiza G, Ribas M, Capella G, Peinado MA (1999) Tracking recurrent quantitative genomic alterations in colorectal cancer: allelic losses in chromosome 4 correlate with tumor aggressiveness. *Lab Invest* 79(2):111-22.
- Arzimanoglou II, Gilbert F, Barber HR (1998) Microsatellite instability in human solid tumors. *Cancer* 82(10):1808-20.
- Astler VB, Collier FA (1954) The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 139(6):846-852.
- Balajee AS, Hande MP (2018) History and evolution of cytogenetic techniques: Current and future applications in basic and clinical research. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 836(Pt A):3-12. Review.
- Bardi G, Johansson B, Pandis N, Heim S, Mandhal N, Andrén-Sandberg A, Hägerstrand I, Mitelman F (1991) Trisomy 7 in short-term culture of colorectal adenocarcinomas. *Genes Chrom Cancer* 3:149-152.
- Bardi G, Johansson B, Pandis N, Bak-Jensen E, Örndal C, Heim S, Mandahl N, Andrén-Sandberg A, Mitelman F (1993^a) Cytogenetic aberrations in colorectal adenocarcinomas and their correlation with clinicopathologic features. *Cancer* 71:306-314.
- Bardi G, Pandis N, Fenger C, Kronborg O, Bomme L, Heim S (1993^b) Deletion of 1p36 as a primary chromosomal aberration in intestinal tumorigenesis. *Cancer Res* 53:1985-1998.
- Bardi G, Johansson B, Pandis N, Mandahl N, Bak-Jensen E, Linström C, Törnqvist A, Frederiksen H, Andrén-Sandberg A, Mitelman F, Heim S (1993^c) Cytogenetic analysis of 52 colorectal carcinomas: non-random aberration pattern and correlation with pathologic parameter. *Int J Cancer* 55:422-428.
- Bardi G, Sukhikh T, Pandis N, Fenger C, Kronborg O, Heim S (1995^a) Karyotypic characterization of colorectal adenocarcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 12(2):97-109.
- Bardi G, Pandis N, Heim S (1995^b) Trisomy 7 as the sole cytogenetic aberration in the epithelial component of a colonic adenoma. *Cancer Genet Cytogenet* 82:82-84.
- Bardi G, Pandis N, Mitelman F, Heim S (1997) Karyotypic characteristics of colorectal tumors. En *Human Cytogenetic Cancer Markers*, ed por Wolman SR y Sell S. Humna Press., Totowa, NJ pp151-168.

- Bardi G, Fenger C, Johansson B, Mitelman F, Heim S (2004) Tumor karyotype predicts clinical outcome in colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 22(13):2623-34.
- Barreton G, Gille J, Oevermann E (1991) Flow cytometric analysis of the DNA content in paraffin-embedded tissue from colorectal carcinomas and its prognostic significance. *Virchows Arch B Cell Pathol* 60:123.
- Barrios E, Musetti C, Alonso R, Garau M (2015) V Atlas de mortalidad por cáncer en el Uruguay 2009-2013. Montevideo: Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer.
- Barrios E, Garau M (2017). Cáncer: magnitud del problema en el mundo y en Uruguay, aspectos epidemiológicos. *Anales de la Facultad de Medicina*, 4(1), 7-161. <https://dx.doi.org/10.25184/anfamed2017.4.1.2>
- Bastians H (2015) Causes of Chromosomal Instability. *Recent Results Cancer Res* 200:95-113. Review.
- Batista WR, Santos G, Vital FMR, Matos D (2019) Immunoexpression of TS, p53, COX2, EGFR, MSH6 and MLH1 biomarkers and its correlation with degree of differentiation, tumor staging and prognostic factors in colorectal adenocarcinoma: a retrospective longitudinal study. *Sao Paulo Med J* 137(1):33-38.
- Battle E, Bacani J, Begthel H, Jonkheer S, Gregorieff A, van de Born M, Malats N, Sancho E, Boon E, Pawson T, Gallinger S, Pals S, Clevers H (2005) EphB receptor activity suppresses colorectal cancer progression *Nature* 435(7045):1126-30.[published correction appears in *Nature* 436(7052):881. Jonkeer, Suzanne [corrected to Jonkheer, Suzanne]].
- Bauer KD, Lincoln ST, Vera-Roman JM, Wallemark CB, Chmiel JS, Madurski ML (1987) Prognostic implication of proliferative activity and DNA aneuploidy in colonic adenocarcinomas. *Lab Inv* 57:329-335.
- Becher R, Gibas Z, Sandberg AA (1983) Involvement of chromosome 7 and 12 in large bowel cancer: trisomy 7 and 12q-. *Cancer Genet Cytogenet* 9:329-332.
- Beggs AD, Hodgson SV (2008) The Genomics of Colorectal Cancer: State of the Art. *Current Genomics* 9(1), 1–10.
- Bertorelle R, Rampazzo E, Pucciarelli S, Nitti D, De Rossi A (2014) Telomeres, telomerase and colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 20(8):1940-50. Review.
- Bettoni F, Masotti C, Corrêa BR, Donnard E, Dos Santos FF, São Julião GP, Vailati BB, Habr-Gama A, Galante PAF, Perez RO, Camargo AA (2019) The Effects of Neoadjuvant Chemoradiation in Locally Advanced Rectal Cancer-The Impact in Intratumoral Heterogeneity. *Front Oncol* 9:974.
- Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL (2004) Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nat* 432(7015):332-7.
- Binefa G, Rodríguez-Moranta F, Teule A, Medina-Hayas M (2014) Colorectal cancer: from prevention to personalized medicine. *World J Gastroenterol* 20(22):6786-808. Review.
- Bishop JM (1991) Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64:235-248.
- Bishop DT, Hall NR (1994) The genetics of colorectal cancer. *Eur J Cancer* 30A:1946-1956.
- Blanco-Calvo M, Concha Á, Figueroa A, Garrido F, Valladares-Ayerbes M (2015) Colorectal Cancer Classification and Cell Heterogeneity: A Systems Oncology Approach. *Int J Mol Sci* 16(6):13610-32. Review.
- Bogaert J, Prenen H (2014) Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann Gastroenterol* 27(1):9-14. Review.
- Boland CR (1997) Genetic pathways to colorectal cancer. *Hosp Pract* 32(11):79-84, 87-96. Review.
- Boland CR, Ricciardiello L (1999) How many mutations does it take to make a tumor? *Proc Natl Acad Sci USA* 96(26):14675-7.
- Bolhaqueiro ACF, Ponsioen B, Bakker B, Klaasen SJ, Kucukkose E, van Jaarsveld RH, Vivié J, Verlaan-Klink I, Hami N, Spierings DCJ, Sasaki N, Dutta D, Boj SF, Vries RGJ, Lansdorp PM, van de Wetering M, van Oudenaarden

- A, Clevers H, Kranenburg O, Foijer F, Snippert HJG, Kops GJPL (2019) Ongoing chromosomal instability and karyotype evolution in human colorectal cancer organoids. *Nat Genet* 51(5):824-834.
- Bomme L, Bardi G, Pandis N, Fenger C, Kronborg O, Heim S (1994) Clonal karyotypic abnormalities in colorectal adenomas: clues to the early events in the adenoma-carcinoma sequence. *Gene Chrom Cancer* 10:190.
- Bomme L, Lothe RA, Bardi G, Fenger C, Kronborg O, Heim S (2001) Assessments of clonal composition of colorectal adenomas by FISH analysis of chromosomes 1, 7, 13 and 20. *Int J Cancer* 92(6):816-2.
- Bordonaro M (2019) Quantum biology and human carcinogenesis. *Biosystems* 178:16-24. Review.
- Boveri T (1914) *Zür Frage der Entstehung malignen Tumoren* (On the Problem of the Origine of Malignant Tumors). Gustav Fischer, Gena.
- Braun R, Ronquist S, Wangsa D, Chen H, Anthuber L, Gemoll T, Wangsa D, Koparde V, Hunn C, Habermann JK, Heselmeyer-Haddad K, Rajapakse I, Ried T (2019) Single Chromosome Aneuploidy Induces Genome-Wide Perturbation of Nuclear Organization and Gene Expression. *Neoplasia* 21(4):401-412.
- Breivik J, Lothe RA, Meling GI, Rognum TO, Borresen-Dale AL, Gaudernack G (1997) Different genetic pathways to proximal and distal colorectal cancer influenced by sex-related factors. *Int J Cancer* 74(6):664-9.
- Brierley DJ, Martin SA (2013) Oxidative stress and the DNA mismatch repair pathway. *Antioxid Redox Signal* 18(18):2420-8. Review.
- Bufill JA (1990) Colorectal cancer: evidence for distinct genetic categories based on proximal or distal tumor location. *Ann Intern Med* 113:779-788.
- Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nat* 392(6673):300-3.
- Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C (1999) Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol* 9(12):M57-60.
- Calabrese P, Tavare S, Shibata D (2004) Pretumor progression: clonal evolution of human stem cell populations. *Am J Pathol* 164(4):1337-46.
- Calistri D, Rengucci C, Seymour I, Lattuneddu A, Polifemo AM, Monti F, Saragoni L, Amadori D (2005) Mutation analysis of p53, K-ras, and BRAF genes in colorectal cancer progression. *J Cell Physiol* [Epub ahead of print].
- Campisi J (2001) Cellular senescence as a tumour-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol* 11: S27–S31.
- Carethers JM, Jung BH (2015) Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 2015 149(5):1177-1190. Review.
- Cavestro GM, Mannucci A, Zuppardo RA, Di Leo M, Stoffel E, Tonon G (2018) Early onset sporadic colorectal cancer: Worrysome trends and oncogenic features. *Dig Liver Dis* 50(6):521-532. Review.
- Cohen AM, Shank B, Friedman NA (1989) Colorectal cancer. En *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds), JB Lippincott, Philadelphia, pp 895-964.
- Cohen AM, Minsky BD, Schilky RL (1993) Colorectal cancer. En *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds), JB Lippincott, Philadelphia, pp929-977.
- Coleman WB, Tsongalis GJ (1999) The role of genomic instability in human carcinogenesis. *Anticancer Res* 19(6A):4645-64.
- Cooley LD, Wilson KS (2013). The Cytogenetics of Solid Tumors. En *The Principles of Clinical Cytogenetics*, Gersen SL y Keagle MB Eds. Pp: 371-414.
- Cortellino S, Turner D, Masciullo V, Schepis F, Albino D, Daniel R, Skalka AM, Meropol NJ, Alberti C, Larue L, Bellacosa A (2003) The base excision repair enzyme MED1 mediates DNA damage response to antitumor drugs and is associated with mismatch repair system integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(25):15071–15076.

- Cory S, Huang DC, Adams JM (2003) The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22(53):8590-607.
- Coschi CH, Dick FA (2012) Chromosome instability and deregulated proliferation: an unavoidable duo. *Cell Mol Life Sci* 69(12):2009-24. Review.
- Cosenza MR, Krämer A (2016) Centrosome amplification, chromosomal instability and cancer: mechanistic, clinical and therapeutic issues. *Chromosome Res.* 24(1):105-26. Review.
- Costa A, Faranda A, Scalmati A (1992) Autoradiographic and flow cytometry assessment of cell proliferation in primary colorectal cancer: relationship to DNA ploidy and clinicopathologic features. *Int J Cancer* 50:719.
- Coutourier-Turpin M-H, Esnous C, Louvel A, Poirier Y, Coutourier D (1992) Chromosome 1 in human colorectal tumors. *Hum Genet* 88:431-438.
- Coutourier-Turpin MH, Bertrand V, Coutourier D (2001) Distal deletion of 1p in colorectal tumors: an initial event and/or a step in carcinogenesis? Study by fluorescence in situ hybridization interphase cytogenetics. *Cancer Genet Cytogenet.* Jan 1;124(1):47-55.
- Chan TL, Curtis LC, Leung SY, Farrington SM, HO JW, Chan AS, Lam PW, Tse CW, Dunlop MG, Wyllie AH, Yuen ST (2001) Early-onset colorectal cancer with microsatellite DNA and near-diploid chromosome. *Oncogene* 20:4871-4876.
- Chen Z, Morgan R, Berger Cs, Sandberg AA (1992) Application of fluorescence in situ hybridization in hematological malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* 63:62-69.
- Chen TR, Nierman WC (1994) Chromosome painting and quantitative karyotyping of colon adenocarcinoma cell lines, DLD-1 and HCT-15. *Anticancer Res* 14(1A):109-12.
- Chen PL, Liu F, Cai S, Lin X, Li A, Chen Y, Gu B, Lee EY, Lee WH (2005) Inactivation of CtIP leads to early embryonic lethality mediated by G1 restraint and to tumorigenesis by haploid insufficiency. *Mol Cell Biol* 25(9):3535-42.
- Chen DS, Mellman I (2017) Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point *Nature* 541(7637):321-330. Review.
- Cheng KC, Loeb LA (1993) Genomic instability and tumor progression: mechanistic considerations. *Adv Cancer Res* 60:121-56.
- Chinnadurai G (2006) CtIP, a candidate tumor susceptibility gene is a team player with luminaries. *Biochim Biophys Acta* 1765(1):67-73. Review.
- Cho KR, Fearon ER (1995) DCC: linking tumor suppressor genes and altered cell surface interactions in cancer? *Curr Opin Genet Dev* Feb;5(1):72-8. Review.
- Damalas A, Kahan S, Shtutman M, Ben-Ze'ev A y Oren M (2001) Deregulated beta-catenin induces a p53- and ARF-dependent growth arrest and cooperates with Ras in transformation. *EMBO J.* 20:4912-4922.
- DA Silva FC, Wernhoff P, Dominguez-Barrera C, Dominguez-Valentin M (2016) Update on Hereditary Colorectal Cancer. *Anticancer Res* 36(9):4399-405. Review.
- Danial NN, Korsmeyer SJ (2004) Cell death: critical control points. *Cell* 116(2):205-19.
- Darlington CD (1939) Misdivision and the genesis of the centromere. *J Genet* 37: 341-364.
- Das K, Tan P (2013) Molecular cytogenetics: recent developments and applications in cancer. *Clin Genet* 84(4):315-25. Review.
- Davenport JW, Fernandes ER, Harris LD, Neale GA, Goorha R (1999) The mouse mitotic checkpoint gene *bub1b*, a novel *bub1* family member, is expressed in a cell cycle-dependent manner. *Genomics* 55(1):113-7.
- Davis A, Gao R, Navin N (2017) Tumor evolution: Linear, branching, neutral or punctuated? *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1867(2):151-161. Review.

- De Angelis PM, Clausen OP, Schjolberg A, Stokke T. (1999) Chromosomal gains and losses in primary colorectal carcinomas detected by CGH and their associations with tumour DNA ploidy, genotypes and phenotypes. *Br J Cancer* 80(3-4):526-35.
- De' Angelis GL, Bottarelli L, Azzoni C, De' Angelis N, Leandro G, Di Mario F, Gaiani F, Negri F (2018) Microsatellite instability in colorectal cancer. *Acta Biomed* 89(9-S):97-101.
- Deans GT, Parks TG, Rowlands BJ, Spence RA (1992) Prognostic factor in colorectal cancer. *Br J Surg* 79:608-613.
- Deepa, Pundir S, Pundir CS (2019) Detection of tumor suppressor protein p53 with special emphasis on biosensors: A review. *Anal Biochem* 588:113473. Review.
- Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB (2019) Colorectal cancer. *Lancet* 394(10207):1467-1480. Review.
- De Lange T, Shiue L, Myers RM, Dox DR, Naylor SL, Killery AM, Varmus HE (1990) Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol* 10:518-527.
- Delattre O, Olschwang S, Law DJ, Melot T, Remvikos Y, Salmon RJ, Sastre X, Validire P, Feinberg AP, Thomas G (1989) Multiple genetic alteration in distal and proximal colorectal cancer. *Lancet* II:353-355.
- De Pagter MS, Kloosterman WP (2015) The Diverse Effects of Complex Chromosome Rearrangements and Chromothripsis in Cancer Development. En *Chromosomal Instability In Cancer Cells*, Ghadimi y Ried Eds., T Cham: Springer, pp165-194.
- Derks S, Postma C, Carvalho B, van den Bosch SM, Moerkerk PT, Herman JG, Weijnenberg MP, de Bruïne AP, Meijer GA, van Engeland M (2008) Integrated analysis of chromosomal, microsatellite and epigenetic instability in colorectal cancer identifies specific associations between promoter methylation of pivotal tumour suppressor and DNA repair genes and specific chromosomal alterations. *Carcinogenesis* 29(2):434-9.
- Desper R, Jiang F, Kallioniemi OP, Moch H, Papadimitriou CH, Schäffer AA (1999) Inferring tree models for oncogenesis from comparative genome hybridization data. *J Comput Biol* 6(1):37-51.
- Desper R, Jiang F, Kallioniemi OP, Moch H, Papadimitriou CH, Schäffer AA (2000) Distance-based reconstruction of tree models for oncogenesis. *J Comput Biol* 7(6):789-803.
- De Wolf B, Kops GJPL (2017) Kinetochore Malfunction in Human Pathologies. *Adv Exp Med Biol*. 1002:69-91. Review.
- Dietrich WF, Lander E, Smith JS, Moser AR, Gould K, Luongo C, Borenstein N, Dove A (1993) Genetic identification of Mom-1, a major modifier locus affecting Min-induced intestinal neoplasia in the mouse. *Cell* 75:631-639.
- Dimri, GP, Itahana K, Acosta M y Campisi, J (2000) Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumour suppressor. *Mol. Cell. Biol.* 20: 273–285.
- Di Vinci A, Infusini E, Peveri C, Sciutto A, Orecchia R, Geido E, Monaco R, Giaretti W (1999) Intratumor heterogeneity of chromosome 1, 7, 17, and 18 aneusomies obtained by FISH and association with flow cytometric DNA index in human colorectal adenocarcinomas. *Cytometry*. 1999 Apr 1;35(4):369-75.
- Dominguez-Valentin M, Sampson JR, Seppälä TT, Ten Broeke SW, Plazzer JP, Nakken S, Engel C, Aretz S, Jenkins MA, Sunde L, Bernstein I, Capella G, Balaguer F, Thomas H, Evans DG, Burn J, Greenblatt M, Hovig E, de Vos Tot Nederveen Cappel WH, Sijmons RH, Bertario L, Tibiletti MG, Cavestro GM, Lindblom A, Della Valle A, Lopez-Köstner F, Gluck N, Katz LH, Heinimann K, Vaccaro CA, Büttner R, Görgens H, Holinski-Feder E, Morak M, Holzapfel S, Hüneburg R, Knebel Doeberitz MV, Loeffler M, Rahner N, Schackert HK, Steinke-Lange V, Schmiegel W, Vangala D, Pylvänäinen K, Renkonen-Sinisalo L, Hopper JL, Win AK, Haile RW, Lindor NM, Gallinger S, Le Marchand L, Newcomb PA, Figueiredo JC, Thibodeau SN, Wadt K, Therkildsen C, Okkels H, Ketabi Z, Moreira L, Sánchez A, Serra-Burriel M, Pineda M, Navarro M, Blanco I, Green K, Laloo F, Crosbie EJ, Hill J, Denton OG, Frayling IM, Rødland EA, Vasen H, Mints M, Neffa F, Esperon P, Alvarez K, Kariv R, Rosner G, Pinero TA, Gonzalez ML, Kalfayan P, Tjandra D, Winship IM, Macrae F, Möslein G, Mecklin JP, Nielsen M, Møller P (2019) Cancer risks by gene, age, and gender in 6350 carriers of pathogenic mismatch repair variants: findings from the Prospective Lynch Syndrome Database. *Genet Med*. 2019 Jul 24. doi: 10.1038/s41436-019-0596-9. [Epub ahead of print]

- Drets ME, Shaw MW (1971) Specific banding patterns of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68(9):2073-7.
- Duensing A, Duensing S (2010) Centrosomes, polyploidy and cancer. *Adv Exp Med Biol* 676:93-103. Review.
- Duesberg P, Rausch C, Rasnick D, Hehlmann R (1998) Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(23):13692-7.
- Duesberg P, Rasnick D, Li R, Winters L, Rausch C, Hehlmann R (1999) How aneuploidy may cause cancer and genetic instability. *Anticancer Res.* 19:4887-4906 (1999).
- Duesberg P, Fabarius A, Hehlmann R (2004) Aneuploidy, the primary cause of the multilateral genomic instability of neoplastic and preneoplastic cells. *Life* 56(2):65-81.
- Duesberg PH (2014) Does aneuploidy destabilize karyotypes automatically? *Proc Natl Acad Sci U S A* Mar 18;111(11):E974.
- Duker NJ (2002) Chromosome breakage syndromes and cancer. *Am J Med Genet* 115(3):125-9. Review.
- Dukes CE, Bussey HJR (1958) The spread of rectal cancer and its effect on prognosis. *Br J Cancer* 12:309-320.
- Dutrillaux B (1995) Pathways of chromosome alteration in human epithelial cancers. *Adv Cancer Res* 67:59-82.
- Duval A, Hamelin R (2003) [Replication error repair, microsatellites, and cancer]. *Med Sci (Paris)* 19(1):55-62. Review.
- Eissenberg JC (2013) Telomeres, cancer & aging: live long & prosper? *Mo Med* 110(1):11-6. Review.
- Esteller M (2006) Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *Br J Cancer* Jan 30;94(2):179-83. Review.
- Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, Waters CM, Penn LZ, Hancock DC (1992) Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69(1):119-28.
- Evan GI, Vousden KH (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nat* 411:342-348.
- Evrard C, Tachon G, Randrian V, Karayan-Tapon L, Tougeron D (2019) Microsatellite Instability: Diagnosis, Heterogeneity, Discordance, and Clinical Impact in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* 11(10). pii: E1567. doi: 10.3390/cancers11101567. Review.
- Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thamas G, Kinzler KW, Vogelstein B (1990) Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 247:49-56.
- Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61. 759-767.
- Fearon ER, Jones PA (1992) Progressing toward a molecular description of colorectal cancer development. *FASEB J* 10:2783-90.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN. *Int J Cancer* 136(5):E359-86.
- Fernebro E, Halvarsson B, Baldetorp B, Nilbert M (2002) Predominance of CIN versus MSI in the development of rectal cancer at young age. *Cancer* 2(1):25.
- Ferti AD, Panani AD, Raptis S (1988) Cytogenetic study of rectosigmoidal adenocarcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 34:101-109.
- Fiedler D, Heselmeyer-Haddad K, Hirsch D, Hernandez LS, Torres I, Wangsa D, Hu Y, Zapata L, Rueschoff J, Belle S, Ried T, Gaiser T (2019) Single-cell genetic analysis of clonal dynamics in colorectal adenomas indicates CDX2 gain as a predictor of recurrence. *Int J Cancer* 144(7):1561-1573.

- Foulds L (1954) The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res* 14(5):327-39.
- Fox M, Lahib F, Pratt W, Attwood J, Gum J, Kim Y, Swallow DM (1991) Regional localization of MUC3 to chromosome 7q22. *Cytogenet Cell Genet* 58:1920-1921.
- Frattini M, Balestra D, Suardi S, Oggionni M, Alberici P, Radice P, Costa A, Daidone MG, Leo E, Pilotti S, Bertario L, Pierotti MA (2004) Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 10(12 Pt 1):4015-21.
- Frede J, Adams DJ, Jones PH (2014) Mutation, clonal fitness and field change in epithelial carcinogenesis. *J Pathol* 234(3):296-301. Review.
- Fridman IS, Lowe SW (2003) Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 22:9030-9040.
- Friedberg EC (2003) DNA damage and repair. *Nat* 421:436-440.
- Friedberg E, Walker G, Siede W, Wood RD, Schultz RA (2006) DNA Repair and Mutagenesis. 2da ed. American Society for Microbiology; Washington, DC.
- Funk JO (1999) Cancer cell cycle control. *Anticancer Res* 19(6A):4772-80.
- Gallois C, Pernot S, Zaanani A, Taieb J (2018) Colorectal Cancer: Why Does Side Matter? *Drugs* 78(8):789-798. Review.
- Georgiades IB, Curtis LJ, Morris RM, Bird CC, Wyllie AH (1999) Heterogeneity studies identify a subset of sporadic colorectal cancers without evidence for chromosomal or microsatellite instability. *Oncogene* 18(56):7933-40.
- Gervaz P, Bucher P, Morel P (2004) Two colons-two cancers: paradigm shift and clinical implications. *J Surg Oncol* 88(4):261-266.
- Geurts van Kessel A (2014) The cancer genome: from structure to function. *Cell Oncol (Dordr)* 37(3):155-65.
- Ghadimi BM, Sackett DL, Difilippantonio MJ, Schrock E, Neumann T, Jauho A, Auer G, Ried T (2000) Centrosome amplification and instability occurs exclusively in aneuploid, but not in diploid colorectal cancer cell lines, and correlates with numerical chromosomal aberrations. *Genes Chromosomes Cancer* 27(2):183-90.
- Ghosh R, Das D, Franco S (2018) The Role for the DSB Response Pathway in Regulating Chromosome Translocations. *Adv Exp Med Biol* 1044:65-87. Review.
- Gibas LM, Gibas Z, Sandberg AA (1984) Technical aspects of cytogenetics analysis of human solid tumors. *Kariogram* 110:25-27.
- Gisselsson D, Pettersson L, Höglund M, Heidenblad M, Gorunova L, Wiegant J, Mertens F, Dal Cin P, Mitelman F, Mandahl N (2000) Chromosomal breakage-fusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(10):5357-62.
- Gisselsson D, Jonson T, Yu C, Martins C, Mandahl N, Wiegant J, Jin Y, Mertens F, Jin C (2002) Centrosomal abnormalities, multipolar mitoses, and chromosomal instability in head and neck tumours with dysfunctional telomeres. *Br J Cancer* 87(2):202-7.
- Gisselsson D, Höglund M (2005) Connecting mitotic instability and chromosome aberrations in cancer--can telomeres bridge the gap? *Semin Cancer Biol* 15(1):13-23. Review.
- Goel MK, Khanna P, Kishore J (2010) Understanding survival analysis: Kaplan-Meier estimate. *Int J Ayurveda Res* 1(4):274-8.
- Goel S, Huang J, Klampfer L (2015) K-Ras, intestinal homeostasis and colon cancer. *Curr Clin Pharmacol* 10(1):73-81. Review.
- Gologan A, Sepulveda AR (2005) Microsatellite instability and DNA mismatch repair deficiency testing in hereditary and sporadic gastrointestinal cancers. *Clin Lab Med* 25(1):179-96. Review

- Gorunova L, Johansson B, Dawiskiva S, Andrén-Sandberg A, Jin Y, Mandahl N, Heim S, Mitelman F (1995) Massive cytogenetic heterogeneity in a pancreatic carcinoma: Fifty-four karyotypically unrelated clones. *Genes Chromosom Cancer* 14:259-266.
- Gozzetti A, Le Beau MM (2000) Fluorescence in situ hybridization: uses and limitations. *Semin Hematol* 37(4):320-33.
- Grade M, Becker H, Liersch T, Ried T, Ghadimi BM (2006) Molecular cytogenetics: genomic imbalances in colorectal cancer and their clinical impact. *Cell Oncol* 28(3):71-84. Review.
- Grade M, Difilippantonio MJ, Camps J (2015) Patterns of Chromosomal Aberration in Solid Tumors pp 115-143. En *Chromosomal Instability in Cancer Cells*. Ghadimi y Ried Eds. Springer.
- Green DR, Kroemer G (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305(5684):626-9.
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54(18):4855-78.
- Greider CW, Blackburn EH (1996) Telomeres, telomerase and cancer. *Sci Am* 274(2):92-7
- Griffin CA, Lazer S, Hamilton Sr, Giardiello FM, Long P, Krush AJ, Booker SV (1993) Cytogenetic analysis of intestinal polyps in polyposis syndromes: Comparison with sporadic adenomas. *Cancer Genet Cytogenet* 67:14-20.
- Guénolé A, Legube G (2017) A meeting at risk: Unrepaired DSBs go for broke. *Nucleus* 8(6):589-599. Review.
- Gupta R, Sinha S, Paul RN (2018) The impact of microsatellite stability status in colorectal cancer. *Curr Probl Cancer* 42(6):548-559. Review.
- Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA (1999) Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nat* 400(6743):464-8.
- Hahn WC, Weinberg R (2002) Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Reviews* 2:331-341.
- Halvorsen TB, Johannesen E (1990) DNA ploidy, tumor site, and prognosis in colorectal cancer: A flow cytometric study of paraffin-embedded tissue. *Scand J Gastroenterol* 25:141-148.
- Hameroff SR (2004) A new theory of the origin of cancer: quantum coherent entanglement, centrioles, mitosis, and differentiation. *Biosystems* 77(1-3):119-36.
- Hamilton SR (1992) The adenoma-adenocarcinoma sequence in the large bowel: variation on a theme. *J CellBiochem* 6G (Suppl 19):41-46.
- Hankey W, Frankel WL, Groden J (2018) Functions of the APC tumor suppressor protein dependent and independent of canonical WNT signaling: implications for therapeutic targeting. *Cancer Metastasis Rev* 37(1):159-172. Review.
- Hansemann D (1890) Ueber asymmetrische Zelltheilung in Epithelkrebsen und deren biologische Bedeutung. *Virschows Arch Pathol Anat* 119, 299-326.
- Heim S, Johansson B, Mertens F (1989) Constitutional chromosome instability and cancer risk. *Mutat Res* 221(1):39-51.
- Hellman S (1997) Darwin's clinical relevance. *Cancer* 15;79(12):2275-81.
- Heim S, Mitelman F (1995) *Cancer Cytogenetics*, 2nd edition. Wiley-Liss. New York.
- Hendrich B, Bird A (1998) Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* 18(11):6538-6547.
- Heppner GH, Miller FR (1998) The cellular basis of tumor progression. *Int Rev Cytol* 177:1-156.

- Herbergs J, de Bruine AP, Marx PTJ, Valinga MIJ, Stockbrugger RW, Ramaekers FCS, Arends Jw, Hopman AHN (1994) Chromosome aberrations in adenomas of the colon. Proof of trisomy 7 in tumor cells by combined interphase cytogenetics and immunocytochemistry. *Int J Cancer* 57:781-785.
- Hermiston ML, Gordon JI (1995) In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 129(2):489-506.
- Herrington CS, Poulson R, Coates PJ (2019) Recent Advances in Pathology: the 2019 Annual Review Issue of The Journal of Pathology. *J Pathol* 247(5):535-538.
- Hirpara A, Bloomfield M, Duesberg P (2018) Speciation Theory of Carcinogenesis Explains Karyotypic Individuality and Long Latencies of Cancers. *Genes (Basel)* 9(8).
- Höglund M, Gisselsson D, Hansen GB, Säll T, Mitelman F, Nilbert M (2002) Dissecting Karyotypic Patterns in Colorectal Tumors: Two Distinct but Overlapping Pathways in the Adenoma-Carcinoma Transition. *Can Res* 62, 5939–5946.
- Holland AJ, Cleveland DW (2009) Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(7):478-87. Review.
- Holliday R (1989) Chromosome error propagation and cancer. *Trends Genet* 5(2):42-5.
- Hsieh G, Bierman R, Szabo L, Lee AG, Freeman DE, Watson N, Sweet-Cordero EA, Salzman J (2017) Statistical algorithms improve accuracy of gene fusion detection. *Nucleic Acids Res* 45(13).
- Huyen Y, Zgheib O, Ditullio RA Jr, Gorgoulis VG, Zacharatos P, Petty TJ, Sheston EA, Mellert HS, Stavridi ES, Halazonetis TD (2004) Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature* 432(7015):406-11.
- IJspeert JE, Medema JP, Dekker E (2015) Colorectal neoplasia pathways: state of the art. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 25(2):169-82. Review.
- Iliakis G, Mladenov E, Mladenova V (2019) Necessities in the Processing of DNA Double Strand Breaks and Their Effects on Genomic Instability and Cancer. *Cancers (Basel)* 11(11). pii: E1671. Review.
- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M (1993) Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nat* 363(6429):558-61.
- ISCN (2016): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. McGowan-Jordan, Simon A y Schmid M (eds); S Karger, Basel.
- Iwabuchi K, Bartel PL, Li B, Marraccino R, Fields S (1994) Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(13):6098-102.
- Jackson AL, Loeb LA (1998) The mutation rate and cancer. *Genetics* 148(4):1483-90.
- Janiszewska M, Polyak K (2015) Clonal evolution in cancer: a tale of twisted twines. *Cell Stem Cell*. 2015 Jan 8;16(1):11-2.
- Jass JR, Path MRC (1989) Do all colorectal carcinomas arise in preexisting adenomas? *World J Surg* 13:45-51.
- Jin Y, Heim S, Mandahl N, Biörklund A, Wannenberg J, Mitelman F (1990) Unrelated clonal chromosomal aberrations in carcinomas of the oral cavity. *Genes Chromosom Cancer* 1:209-215.
- Jin Y, Mertens F, Mandahl N, Heim S, Wannenberg J, Olegard C, Biörklund A, Mitelman F (1993): Chromosomes abnormalities in eighty-three head and neck squamous cell carcinomas – influence of culture conditions on karyotypic pattern. *Cancer Res* 53:2140-2146.
- Johansson B, Heim S, Mandahl N, Mertens F, Mitelman F (1993) Trisomy 7 in non neoplastic cells. *Genes Chrom Cancer* 6:199-205.

- Johnston MD, Edwards CM, Bodmer WF, Maini PK, Chapman SJ (2007) Mathematical modeling of cell population dynamics in the colonic crypt and in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(10):4008-13.
- Juárez-Vázquez CI, Rosales-Reynoso MA (2014) [Colorectal cancer (CCR): genetic and molecular alterations]. *Gac Med Mex* 150(2):154-64. Review.
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1993) Comparative genomic hybridization: a rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors. *Semin Cancer Biol.* 4(1):41-6.
- Kaplan EL, Meier P (1958) Nonparametric estimation from incomplete observation. *J Am Stat Assoc* 53:457-481
- Karakousis CP, Dal Cin P, Turc-Carel C, Limon J, Sandberg AA (1987) Chromosomal changes in soft-tissue sarcomas. A new diagnostic parameter. *Arch Surg* 122:1257-1260.
- Kastan MB, Bartek J (2004) Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nat* 432:316-323.
- Kastrisiou M, Zarkavelis G, Pentheroudakis G, Magklara A (2019) Clinical Application of Next-Generation Sequencing as A Liquid Biopsy Technique in Advanced Colorectal Cancer: A Trick or A Treat? *Cancers (Basel)* Oct 16;11(10). pii: E1573. doi: 10.3390/cancers11101573. Review.
- Kawakami K, Ruszkiewicz A, Bennett G, Moore J, Grieu F, Watanabe G, Iacopetta B (2006) DNA hypermethylation in the normal colonic mucosa of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 94(4):593-8.
- Kelemen PR, Yaremko ML, Kim AH, Montag A, Michelassi F, Westbrook CA (1994) Loss of heterozygosity in 8p is associated with microinvasion in colorectal carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 11(3):195-8.
- Keren B, Schluth-Bolard C, Egea G, Sanlaville D (2010) [New technologies for the human genome exploration]. *Arch Pediatr. Nov;*17(11):1605-8.
- Keysselt K, Kreutzmann T, Rother K, Kerner C, Krohn K, Przybilla J, Buske P, Löffler-Wirth H, Loeffler M, Galle J, Aust G (2017) Different in vivo and in vitro transformation of intestinal stem cells in mismatch repair deficiency. *Oncogene.* 36(19):2750-2761.
- Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Landscaping the cancer terrain. *Science* 280(5366):1036-7.
- Korn WM, Yasutake T, Kuo WL, Warren RS, Collins C, Tomita M, Gray J, Waldman FM (1999) Chromosome arm 20q gains and other genomic alterations in colorectal cancer metastatic to liver, as analyzed by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 25(2):82-90.
- Koyanagi M, Hijikata M, Watashi K, Masui O, Shimotohno K (2005) Centrosomal P4.1-associated protein is a new member of transcriptional coactivators for nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* 280(13):12430-7.
- Knösel T, Petersen S, Schwabe H, Schluns K, Stein U, Schlag PM, Dietel M, Petersen I (2002) Incidence of chromosomal imbalances in advanced colorectal carcinomas and their metastases. *Virchows Arch* 440(2):187-94.
- Knudson AG (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* (4):820-823.
- Kobayashi K, Tomita H, Shimizu M, Tanaka T, Suzui N, Miyazaki T, Hara A (2017) p53 Expression as a Diagnostic Biomarker in Ulcerative Colitis-Associated Cancer. *Int J Mol Sci* 18(6). pii: E1284. Review.
- Konstantinova LN, Fleishman EW, Knisch VI, Perevozchicov AG, Kopnin BP (1991) Karyotype peculiarities of human colorectal adenocarcinomas. *Hum Genet* 86:491-496, 1991.
- Kops GJ, Foltz DR, Cleveland DW (2004) Lethality to human cancer cells through massive chromosome loss by inhibition of the mitotic checkpoint. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 8699–8704.
- Kouri M, Laasonen A, Mecklin JP, Jarvinen H, Franssila K, Pyyhoonen S (1990) Diploid predominance in hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma evaluated by flow cytometry. *Cancer* 65:1825-1829.
- Kraker WJ, Borell TJ, Schad CR, Oennington MJ, Karnes Ps, Dewald GW, Jenkins RB (1992) Fluorescent in situ hybridization: Use of whole chromosome probes to identify unbalanced chromosome translocation. *Mayo Clin Proc.* 67: 658-662.

- Krzywinski M (2016) Visualizing Clonal Evolution in Cancer. *Mol Cell*. 62(5):652-6. Review.
- Kusyk CJ, Edward CL, Arrighi FE, Romsdahl MM (1979) Improved method for cytogenetic studies of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*. 63: 1199-1203.
- Laghi L (2000) Genetics of colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 47(32):315-22. Review.
- Lampson MA, Kapoor TM (2005) The human mitotic checkpoint protein BubR1 regulates chromosome-spindle attachments. *Nat Cell Biol* 7(1):93-8.
- Laurent-Puig P, Olschwang S, Delattre O, Remvikos Y, Asselain B, Melot T, Validire P, Muleris M, Girodet J, Salmon R, Thomass G (1992) Survival and acquired genetic alteration in colorectal cancer. *Gastroenterol* 102:1136-1141.
- Laurent-Puig P, Blons H, Cugnenc PH (1999) Sequence of molecular genetic events in colorectal tumorigenesis. *Eur J Cancer Prev* 8 Suppl 1:S39-47.
- Laurent-Puig P, Agostini J, Maley K (2010) [Colorectal oncogenesis]. *Bull Cancer* 97(11):1311-21. Review.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1997) Genetic instability in colorectal cancers. *Nat* 386(6625):623-627.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nat* 396(6712):643-9.
- Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ (2002) The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg* 89(7):845-60. Review.
- Levi M, Prayogi G, Sastranagara F, Sudianto E, Widjajahakim G, Gani W, Mahanadi A, Agnes J, Khairunisa BH, Utomo AR (2018) Clinicopathological Associations of K-RAS and N-RAS Mutations in Indonesian Colorectal Cancer Cohort. *J Gastrointest Cancer* 49(2):124-131.
- Levine AJ, Puzio-Kuter AM (2010) The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science* 330(6009):1340-4. Review.
- Li R, Sonik A, Stindl R, Rasnick D, Duesberg P (2000) Aneuploidy vs. gene mutation hypothesis of cancer: recent 14675-7. study claims mutation but is found to support aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7):3236-41.
- Li LN, Zhang HD, Yuan SJ, Tian ZY, Sun ZX (2007) Establishment and characterization of a novel human colorectal cancer cell line (CLY) metastasizing spontaneously to the liver in nude mice. *Oncol Rep* (4):835-40.
- Li XL, Zhou J, Chen ZR, Chng WJ (2015) P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J Gastroenterol* 7;21(1):84-93. Review.
- Liehr T, Othman MA, Rittscher K, Alhourani E (2015) The current state of molecular cytogenetics in cancer diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn* 15(4):517-26. Review.
- Lievre A, Laurent-Puig P (2004) Colorectal carcinogenesis: update. *Rev Prat*. 2004 Jan 31;54(2):143-50.
- Liggett LA, DeGregori J (2017) Changing mutational and adaptive landscapes and the genesis of cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1867(2):84-94.
- Limon J, Dal Cin P, Sandberg AA (1986) Application of long-term collagenase disaggregation for the cytogenetic analysis of human solid tumor. *Cancer Genet Cytogenet*. 23: 305-313.
- Liu J (2018) The dualistic origin of human tumors. *Semin Cancer Biol*53:1-16. Review.
- Livingstone LR, White A, Sprouse J, Livanos E, Jacks T, Tlsty TD (1992) Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell* 70(6):923-35.
- Lobb DS, Reeves BR, Lawler SD (1972) Identification of isochromosome 17 in myeloid leukaemia. *Lancet* 1(7755):849-50.
- Loeb LA (1991) Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* 51(12):3075-9.

- Loeb KR, Loeb LA (1999) Genetic instability and the mutator phenotype. *Studies in ulcerative colitis. Am J Pathol* 154(6):1621-1626.
- Loeb KR, Loeb LA (2000) Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis* (3):379-85.
- Longacre TA, Fenoglio-Preiser CM (1990) Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia. *Am J Surg Pathol* 14:524-537.
- Longy M, Saura R, Dumas F, Leseve J-F, Taine L, Goussot J-F, Couzigou P (1993) Chromosome analysis of adenomatous polyps of the colon: possible existence of two differently evolving cytogenetic groups. *Cancer Genet Cytogenet* 67:7-13.
- Lothe RA, Andersen SN, Hofstad B, Mellin G, Peltomäki P, Heim S, Brogger A, Vant M, Rognum TO, Borresen A-L (1995) Deletion of 1p loci and microsatellite instability in colorectal polyps. *Gene Chrom Cancer* 14:182-188.
- Lowe SW, Cepero E, Evan G (2004) Intrinsic tumour suppression. *Nat* 432:307-315.
- Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF et al. (1993) Genetics, natural history, tumour spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: An updated review. *Gastroenterology* 104:1535-1549.
- Lynch HT, Shaw TG, Lynch JF (2004) Inherited predisposition to cancer: a historical overview. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 129(1):5-22.
- Mahathre MM, Rida PC, Aneja R (2016) The more the messier: centrosome amplification as a novel biomarker for personalized treatment of colorectal cancers. *J Biomed Res* 30(6):441-451. Review.
- Mandahl N (1992) Methods in solid tumors cytogenetics. En Rooney DE, Czepulkowski BH (eds). *Human Cytogenetics. A practical approach. Vol II Malignancy and Acquired Abnormalities*. Oxford University press, New York pp 155-187.
- Markowitz SD, Bertagnoli MM (2009) Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med* 361(25):2449-60. Review.
- Martin P, Levine B, Golomb HM, Riddell RH (1979) Chromosome analysis of primary large bowel tumor: a new method for improving the yield of analyzable metaphases. *Cancer* 44(5):1656-64.
- Martin L, Assem M, Piard F (1999) Are there several types of colorectal carcinomas? Correlations with genetic data. *Eur J Cancer Prev* 8 Suppl 1:S13-20.
- Martin SA, Hewish M, Lord CJ, Ashworth A (2010) Genomic instability and the selection of treatments for cancer. *J Pathol* 220(2):281-9. Review.
- Masagué J (2004) G1 cell-cycle control and cancer. *Nat* 432:298-306.
- Masramon L, Ribas M, Cifuentes P, Arribas R, Garcia F, Egozcue J, Peinado MA, Miro R (2000) Cytogenetic characterization of two colon cell lines by using conventional G-banding, comparative genomic hybridization, and whole chromosome painting. *Cancer Genet Cytogenet* 121(1):17-21.
- McClelland SE (2017) Role of chromosomal instability in cancer progression. *Endocr Relat Cancer* 24(9):T23-T31. Review.
- McLeod HL, Murray GI (1999) Tumour markers of prognosis in colorectal cancer. *Br J Cancer* 79(2):191-203.
- McPherson JP, Tamblin L, Elia A, Migon E, Shehabeldin A, Matysiak-Zablocki E, Lemmers B, Salmena L, Hakem A, Fish J, Kassam F, Squire J, Bruneau BG, Hande MP, Hakem R (2004) *Lats2/Kpm* is required for embryonic development, proliferation control and genomic integrity. *EMBO J* 23(18):3677-88.
- Mehlen P, Goldschneider D (2005) [Dependence receptors DCC and UNC5H: the role of apoptosis in the control of tumorigenesis]. *J Soc Biol* 199(3):211-8. Review.
- Mehlen P, Tauszig-Delamasure S (2014) Dependence receptors and colorectal cancer. *Gut*. 63(11):1821-9. Review.

- Meijer GA, Hermsen MA, Baak JP, van Diest PJ, Meuwissen SG, Belien JA, Hoovers JM, Joenje H, Snijders PJ, Walboomers JM (1998) Progression from colorectal adenoma to carcinoma is associated with non-random chromosomal gains as detected by comparative genomic hybridisation. *J Clin Pathol* 51(12):901-9.
- Mekeel KL, Tang W, Kachnic LA, Luo CM, DeFrank JS, Powell SN (1997) Inactivation of p53 results in high rates of homologous recombination. *Oncogene* 14(15):1847-57.
- Melcher R, Steinlein C, Feichtinger W, Muller CR, Menzel T, Luhrs H, Scheppach W, Schmid M (2000) Spectral karyotyping of the human colon cancer cell lines SW480 and SW620. *Cytogenet Cell Genet* 88(1-2):145-5.
- Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC (2006) Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer* 6(12):924-35. Review.
- Mertens F, Heim S, Mandahl N, Johansson B, Mertens O, Persson B, Salemark L, Wennenberg J, Jonsson N, Mitelman F (1991): Cytogenetic analysis of 33 basal cell carcinomas. *Cancer Res* 51:954-957.
- Mertens F, Johansson B, Höglund M, Mitelman F (1997) Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms. *Cancer Res* 57(13):2765-80.
- Mertens F, Johansson B, Fioretos T, Mitelman F (2015) The emerging complexity of gene fusions in cancer. *Nat Rev Cancer* 15(6):371-81. Review.
- Michel LS, Liberal V, Chatterjee A, Kirchwegger R, Pasche B, Gerald W, Dobles M, Sorger PK, Murty VV, Benezra R (2001) MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nat* 409(6818):355-9.
- Mitelman F, Brandt L, Levan G (1973) Identification of isochromosome 17 in acute myeloid leukaemia. *Lancet* 2(7835):972.
- Mitelman F, Mark J, Nilson PG, Dencker H, Norryd C, Trandberg K-G (1974) Chromosome banding pattern in human colonic polyps. *Hereditas* 78:63-68.
- Mitelman F, Kaneko Y, Trent JM (1990) Report of the committee on chromosome changes in neoplasia. *Cytogenet Cell Genet* 1990;55(1-4):358-86. Review.
- Mitelman F (1993) The cytogenetic scenario of chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 11 Suppl 1:11-5. Review.
- Mitelman F (1994) *Catalog of Chromosome Aberration in Cancer* (5th edn). Wiley-Liss, New York.
- Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer (2019). Mitelman F, Johansson B and Mertens F (Eds.), <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>.
- Miura T, Mattson MP, Rao MS (2004) Cellular lifespan and senescence signaling in embryonic stem cells. *Aging Cell* 3(6):333-43.
- Moinova HR, Chen WD, Shen L, Smiraglia D, Olechnowicz J, Ravi L, Kasturi L, Myeroff L, Plass C, Parsons R, Minna J, Willson JK, Green SB, Issa JP, Markowitz SD (2002) HMTF gene silencing in human colon cancer [published correction appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(7):4562-4567].
- Morán A, Ortega P, de Juan C, Fernández-Marcelo T, Frías C, Sánchez-Pernaute A, Torres AJ, Díaz-Rubio E, Iniesta P, Benito M (2010) Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World J Gastrointest Oncol* 2(3):151-8.
- Mrozek K, Limon J (1992) High frequency of telomeric association and chromatid exchanges and breaks in human ovarian carcinoma. *Hereditas* 117:259-263.
- Muleris M, Salmon RJ, Zafrani B, Girodet J, Dutrillaux B (1985) Consistent deficiencies of chromosome 18 and of the short arm of chromosome 17 in eleven cases of human large bowel cancer: a possible recessive determinism. *Ann Genet* 28(4):206-13.
- Muleris M, Salmon RJ, Dutrillaux B (1988) Existence of two distinct processes of chromosomal evolution in near-diploid colorectal tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 32(1):43-5.

- Muleris M, Salmon RJ, Dutrillaux B (1990) Cytogenetics of colorectal adenocarcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 46(2):143-56.
- Muleris M, Zafrani B, Validire P, Girodet J, Salmon R-J, Dutrillaux B (1994) Cytogenetic study of 30 colorectal adenomas. *Cancer Genet Cytogenet* 74:104-108.
- Muleris M, Dutrillaux B (1996) The accumulation and occurrence of clonal and unstable rearrangements are independent in colorectal cancer cells. *Cancer Genet Cytogenet* 92(1):11-3.
- Muñoz A (1997) *Cáncer. Genes y nuevas terapias*. Editorial Hélice, Madrid.
- Nakao K, Shibusawa M, Tsunoda A, Yoshizawa H, Murakami M, Kusano M, Uesugi N, Sasaki K (1998) Genetic changes in primary colorectal cancer by comparative genomic hybridization. *Surg Today* 28(5):567-9.
- Nanashima A, Tagawa Y, Morinaga M, Kusano H, Nakagoe T, Ayabe H (1996) Quantitative analysis of numerical chromosome aberrations in various morphological types of colorectal carcinomas. *J Gastroenterol* 31(6):793-800.
- Nanjangud G, Amarillo I, Rao PN (2011) Solid tumor cytogenetics: current perspectives. *Clin Lab Med* 31(4):785-811.
- Nelson M (2017) Cytogenetic methods and findings in human solid tumors pp 577-651. En *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual 4ta Edición*. Arsham MS, Barch MJ y Lawce HJ Eds, Wiley Blackwell.
- Neumann CA, Krause DS, Carman CV, Das S, Dubey DP, Abraham JL, Bronson RT, Fujiwara Y, Orkin SH, Van Etten RA (2003) Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. *Nature* 424(6948):561-5.
- Nowak MA, Komarova NL, Sengupta A, Jallepalli PV, Shih IeM, Vogelstein B, Lengauer C (2002) The role of chromosomal instability in tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(25):16226-31.
- Nowell PC (1976) The clonal evolution of tumor cell population. *Science* 194:23-28. Nowell PC. (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194(4260):23-8.
- Nowell PC (1986) Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res* 46(5):2203-7.
- Nussinov R, Muratcioglu S, Tsai CJ, Jang H, Gursoy A, Keskin O (2016) K-Ras4B/calmodulin/PI3K α : A promising new adenocarcinoma-specific drug target? *Expert Opin Ther Targets* 20(7):831-42. Review.
- Obara K, Yokoyama M, Asano G, Tanaka S (2001) Evaluation of myc and chromosome 8 copy number in colorectal cancer using interphase cytogenetics. *Int J Oncol* 18(2):233-9.
- Ochi H, Takeuchi J, Holyoke D, Sandberg AA (1983) Possible specific changes in large bowel cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 10:121-122.
- Okonechnikov K, Imai-Matsushima A, Paul L, Seitz A, Meyer TF, Garcia-Alcalde F (2016) InFusion: Advancing Discovery of Fusion Genes and Chimeric Transcripts from Deep RNA-Sequencing Data. *PLoS One* 11:(12).
- Olschwang S, Hamelin R, Laurent-Puig P, Thuille B, De Rycke Y, Li YJ, Muzeau F, Girodet J, Salmon RJ, Thomas G (1997) Alternative genetic pathways in colorectal carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(22):12122-7.
- Organización Panamericana de la Salud. *Las condiciones de salud en la Américas: Volumen II*. Washington: OPS, 1994: 466-77.
- Organización Panamericana de la Salud. *Salud en las Américas, edición del 2017. Resumen: panorama regional y perfiles de país*. Washington, D.C.: OPS; 2017.
- O'Sullivan J, Risques RA, Mandelson MT, Chen L, Brentnall TA, Bronner MP, Macmillan MP, Feng Z, Siebert JR, Potter JD, Rabinovitch PS (2006) Telomere length in the colon declines with age: a relation to colorectal cancer? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. Mar;15(3):573-7.
- Pandis N, Bardi G, Heim S (1994) Interrelationship between methodological choices and conceptual models in solid tumor cytogenetics. *Cancer Genet Cytogenet* 76:77-84.

- Pandis N, Jin Y, Gorunova L, Petersson C, Bardi G, Idvall I, Johansson B, Ingvar C, Mandahl N, Mitelman F, Heim S (1995): Chromosome analysis of 97 primary breast carcinomas: Identification of eight karyotypic subgroups. *Genes Chromosom Cancer* 12:173-185.
- Parada LA, Marañón A, Hallén M, Tranberg KG, Stenram U, Bardi G, Johansson B (1999) Cytogenetic analyses of secondary liver tumors reveal significant differences in genomic imbalances between primary and metastatic colon carcinomas. *Clin Exp Metastasis* 17(6):471-9.
- Paris Conference (1971): Standardization in human cytogenetics. *Cytogenetics* 11(5):317-62.
- Pathak S, Wang Z, Dhaliwal MK, Sacks PC (1988) Telomeric association: another characteristic of cancer chromosome. *Cytogenet Cell Genet* 47:227-229.
- Peinado MA, Malkhosyan S, Velazquez A, Perucho M (1992) Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(21):10065-9.
- Pellat A, Netter J, Perkins G, Cohen R, Coulet F, Parc Y, Svrcek M, Duval A, André T (2019) [Lynch syndrome: what is new?] *Bull Cancer*. Jul – Aug;106(7-8):647-655.
- Pellestor F (2019) Chromoanagenesis: cataclysms behind complex chromosomal rearrangements. *Mol Cytogenet* 12:6. Review.
- Perucho M, Peinado MA, Ionov Y, Casares S, Malkhosyan S, Stanbridge E (1994) Defects in replication fidelity of simple repeated sequences reveal a new mutator mechanism for oncogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 59:339-48.
- Peter ME, Krammer PH (2003) The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 10(1):26-35.
- Pfau SJ, Amon A (2012) Chromosomal instability and aneuploidy in cancer: from yeast to man. *EMBO Rep* 13(6):515-27. Review.
- Phatak P, Burger AM (2007) Telomerase and its potential for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol* 152(7):1003-11. Review.
- Piard F, Martin L, Chapusot C, Ponnelle T, Faivre J (2002) Genetic pathways in colorectal cancer: interest for the pathologist. *Ann Pathol* 22(4):277-88.
- Picksley SM, Lane DP (1993) The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53?. *Bioessays* 15(10):689-90.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Nat Acad Sci USA* 83: 2934-2938.
- Pino MS, Chung DC (2010) The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* 138(6):2059-72. Review.
- Pinto AE, Fonseca I, Soares J (2002) [DNA flow cytometry in solid tumors]. *Acta Med Port* 15(2):133-42. Review.
- Plentz RR, Wiemann SU, Flemming P, Meier PN, Kubicka S, Kreipe H, Manns MP, Rudolph KL (2003) Telomere shortening of epithelial cells characterises the adenoma-carcinoma transition of human colorectal cancer. *Gut* 52(9):1304-7.
- Plentz RR, Wiemann SU, Flemming P, Meier PN, Kubicka , Kreipe H, Manns MP, Rudolph KL (2005) Telomere shortening of epithelial cells characterises the adenoma-carcinoma transition of human colorectal cancer. *Gut* 52:1304-1307.
- Popat S, Houlston RS (2005) A systematic review and meta-analysis of the relationship between chromosome 18q genotype, DCC status and colorectal cancer prognosis. *Eur J Cancer* 41(14):2060-70. Review.
- Popp C, Nichita L, Voiosu T, Bastian A, Cioplea M, Micu G, Pop G, Sticlaru L, Bengus A, Voiosu A, Mateescu RB (2016) Expression Profile of p53 and p21 in Large Bowel Mucosa as Biomarkers of Inflammatory-Related Carcinogenesis in Ulcerative Colitis. *Dis Markers* 2016:3625279.

- Poulogiannis G, Frayling IM, Arends MJ (2010) DNA mismatch repair deficiency in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. *Histopathology* 56(2):167-79. Review.
- Prescott J, Wentzensen IM, Savage SA, De Vivo I (2012) Epidemiologic evidence for a role of telomere dysfunction in cancer etiology. *Mutat Res* 730(1-2):75-84. Review.
- Price CM (1992) Fluorescence in situ hybridization. *Blood Reviews* 7: 127-134.
- Prospéri MT, Apiou F, Dutrillaux B, Goubin G (1994) Organization and chromosomal assignment of two human PAG gene loci: PAGA encoding a functional gene and PAGB a processed pseudogene. *Genomics* 19(2):236-41.
- Puerta-García E, Cañadas-Garre M, Calleja-Hernández MÁ (2015) Molecular biomarkers in colorectal carcinoma. *Pharmacogenomics* 16(10):1189-222. Review.
- Purushotham AD, Sullivan R (2010) Darwin, medicine and cancer. *Ann Oncol* 21(2):199-203. Review.
- Raimondi SC, Ragsdale ST, Behm F, Rivera G, Williams DL (1987) Multiple telomeric associations of a trisomic whole q arm of chromosome 1 in a child with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 24:87-93.
- Rajagopalan H, Lengauer C (2004) Aneuploidy and cancer. *Nat* 432:338-341.
- Rao CV, Yang YM, Swamy MV, Liu T, Fang Y, Mahmood R, Jhanwar-Uniyal M, Dai W (2005) Colonic tumorigenesis in BubR1^{+/-}ApcMin⁺ compound mutant mice is linked to premature separation of sister chromatids and enhanced genomic instability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(12):4365-70.
- Rapi S, Caldini A, Fanelli A, Berti P, Lisi E, Anichini E, Caligiani R, Sbernini F, Taddei G, Amorosi A, Villari D, Susini T (1996) Flow cytometric measurement of DNA content in human solid tumors: a comparison with cytogenetics. *Cytometry* 26(3):192-7.
- Raynaud CM, Sabatier L, Philipot O, Olaussen KA, Soria JC (2008) Telomere length, telomeric proteins and genomic instability during the multistep carcinogenic process. *Crit Rev Oncol Hematol*. May;66(2):99-117. Review.
- Reichmann A, Martin P, Levine B (1981) Chromosomal banding patterns in human large bowel cancer. *Int J Cancer* 28:431-440.
- Reichmann A, Levine B, Martin P (1982) Human large-bowel cancer: correlation of clinical and histological features with banded chromosomes. *In J Cancer* 29:625-629.
- Reichmann A, Martin P, Levine B (1985) Chromosomal banding patterns in human large bowel adenomas. *Hum Genet* 70:28-31.
- Reilly NM, Novara L, Di Nicolantonio F, Bardelli A (2019) Exploiting DNA repair defects in colorectal cancer. *Mol Oncol* 13(4):681-700. Review.
- Remvikos Y, Vogt N, Muleris M, Salmon RJ, Malfoy B, Dutrillaux B (1995) DNA-repeat instability is associated with colorectal cancers presenting minimal chromosome rearrangements. *Genes Chromosomes Cancer* 12(4):272-6.
- Ren J, Sui H, Fang F, Li Q, Li B (2019) The application of ApcMin⁺ mouse model in colorectal tumor researches. *J Cancer Res Clin Oncol* 145(5):1111-1122. Review.
- Ried T, Knutzen R, Steinbeck R, Blegen H, Schrock E, Heselmeyer K, du Manoir S, Auer G (1996) Comparative genomic hybridization reveals a specific pattern of chromosomal gains and losses during the genesis of colorectal tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 15(4):234-45.
- Ried T, Liyanage M, du Manoir S, Heselmeyer K, Auer G, Macville M, Schrock E (1997) Tumor cytogenetics revisited: comparative genomic hybridization and spectral karyotyping. *J Mol Med* 75(11-12):801-14.
- Risques RA, Ribas M, Peinado MA (2003^a) Assessment of cumulated genetic alterations in colorectal cancer. *Histol Histopathol* 18:1289-1299.

- Risques RA, Moreno V, Ribas M, Marcuello E, Capella G, Peinado MA (2003^b) Genetic pathways and genome-wide determinants of clinical outcome in colorectal cancer. *Cancer Res* 63(21):7206-14.
- Roschke AV, Stover K, Tonon G, Schaffer AA, Kirsch IR (2002) Stable karyotypes in epithelial cancer cell lines despite high rates of ongoing structural and numerical chromosomal instability. *Neoplasia* 4(1):19-31.
- Ross DW (2000) Cancer: the emerging molecular biology. *Hosp Pract (Off Ed)* 35(1):63-4, 67-74.
- Rubin H (1994) Experimental control of neoplastic progression in cell populations: Foulds' rules revisited. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(14):6619-23.
- Sameer A, Nissar S, Fatima K (2014) Mismatch repair pathway: molecules, functions, and role in colorectal carcinogenesis. *Eur J Cancer Prev* 23(4):246-57.
- Sandberg AA (1990) *The chromosome in Human Cancer and Leukemia* (2nd edn). Elsevier, New York.
- Satoh A, Toyota M, Ikeda H, Morimoto Y, Akino K, Mita H, Suzuki H, Sasaki Y, Kanaseki T, Takamura Y, Soejima H, Urano T, Yanagihara K, Endo T, Hinoda Y, Fujita M, Hosokawa M, Sato N, Tokino T, Imai K (2004) Epigenetic inactivation of class II transactivator (CIITA) is associated with the absence of interferon-gamma-induced HLA-DR expression in colorectal and gastric cancer cells. *Oncogene* 23(55):8876-86.
- Savelieva E, Belair CD, Newton MA, DeVries S, Gray JW, Waldman F, Reznikoff CA (1997) 20q gain associates with immortalization: 20q13.2 amplification correlates with genome instability in human papillomavirus 16 E7 transformed human uroepithelial cells. *Oncogene* 14(5):551-60.
- Scherer F (2020) Capturing Tumor Heterogeneity and Clonal Evolution by Circulating Tumor DNA Profiling. *Recent Results Cancer Res* 215:213-230. Review.
- Schrock E, Padilla-Nash (2000) Spectral karyotyping and multicolor fluorescence in situ hybridisation reveal new tumor-specific chromosomal aberration. *Semin Hematol* 37:334-347.
- Schweinfest CW, Henderson KW, Suster S, Kondoh N, Papas TS (1993) Identification of a colon mucosa gene that is down regulated in colon adenomas and adenocarcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:4166-4170.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach M E, Beach D, Lowe SW (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88: 593-602.
- Shackney SE, Shankey TV (1997) Common patterns of genetic evolution in human solid tumors. *Cytometry* 29(1):1-27.
- Shats I, Milyavsky M, Tang X, Stambolsky P, Erez N, Brosh R, Kogan I, Braunstein I, Tzukerman M, Ginsberg D, Rotter V (2004) p53-dependent down-regulation of telomerase is mediated by p21waf1. *J Biol Chem* 279(49):50976-85.
- Shay JW, Roninson IB (2004) Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene* 23(16):2919-33.
- Shay JW, Wright WE (2005) Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis* 26(5):867-74.
- Sigston E, Williams B (2017). An Emergence Framework of Carcinogenesis. *Frontiers in oncology* 7, 198.
- Simon JE, Bakker B, Foijer F (2015) CINcere Modelling: What Have Mouse Models for Chromosome Instability Taught Us? pp 39-60. *En Chromosomal Instability in Cancer Cells*. Ghadimi y Ried Eds. Springer.
- Sinicrope FA, Rego RL, Foster N, Sargent DJ, Windschitl HE, Burgart LJ, Witzig TE, Thibodeau SN (2006) Microsatellite instability accounts for tumor site-related differences in clinicopathologic variables and prognosis in human colon cancers. *Am J Gastroenterol* 101(12):2818-25.
- Somarelli JA, Ware KE, Kostadinov R, Robinson JM, Amri H, Abu-Asab M, Fourie N, Diogo R, Swofford D, Townsend JP (2017) PhyloOncology: Understanding cancer through phylogenetic analysis. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1867(2):101-108. Review.

- Søreide K (2007) Molecular testing for microsatellite instability and DNA mismatch repair defects in hereditary and sporadic colorectal cancers--ready for prime time? *Tumour Biol.*;28(5):290-300.
- Sottoriva A, Barnes CP, Graham TA (2017) Catch my drift? Making sense of genomic intra-tumour heterogeneity. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*1867(2):95-100. Review.
- Soussi T, Wiman KG (2007) Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm. *Cancer Cell.* Oct;12(4):303-12. Review.
- Speicher MR, Carter NP (2005) The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet* 6(10):782-92. Review.
- Spencer F, Gerring SL, Connelly C, Hieter P (1990) Mitotic chromosome transmission fidelity mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 124(2):237-49.
- Spruck CH, Won KA, Reed SI (1999) Deregulated cyclin E induces chromosome instability. *Nat* 401(6750):297-300.
- Stoler DL, Chen N, Basik M, Kahlenberg MS, Rodriguez-Bigas MA, Petrelli NJ, Anderson GR (1999) The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(26):15121-6.
- Sundaram M, Guernsey DL, Rajaraman MM, Rajaraman R (2004) Neosis: a novel type of cell division in cancer. *Cancer Biol Ther* 3(2):207-18.
- Tagushi T, Testa JR, Papas TS, Schweinfest CW (1994) Localization of a candidate of colon tumor suppressor gene (DRA) to 7q22-q31.1 by fluorescence *in situ* hybridization. *Genomics* 20:146-147.
- Tanaka K, Yanoshita R, Konishi M, Oshimura M, Maeda Y, Mori T, Miyaki M (1993) Suppression of tumorigenicity of human colon carcinoma cells by introduction of normal chromosome 1p36 region. *Oncogene* 8:2253-2258.
- Tang XX, Biegel JA, Nycum LM, Yoshioka A, Brodeur GM, Pleasure DE, Ikegaki N (1995) cDNA cloning, molecular characterization, and chromosomal localization of NET(EPHT2), a human EPH-related receptor protein-tyrosine kinase gene preferentially expressed in brain. *Genomics* 29(2):426-37.
- Tang R, Changchien CR, Wu MC, Fan CW, Liu KW, Chen JS, Chien HT, Hsieh LL (2004) Colorectal cancer without high microsatellite instability and chromosomal instability: an alternative genetic pathway to human colorectal cancer. *Carcinogenesis* 25(5):841-846.
- Teh BT, Larsson C, Nordenskjold M (1999) Tumor suppressor genes (TSG). *Anticancer Res* 19(6A):4715-28.
- Thiagalingam S, Laken S, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C (2001) Mechanisms underlying losses of heterozygosity in human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(5):2698-702.
- Thibodeau SN, Bren G, Schaid D (1993) Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260(5109):816-9.
- Thorsson V, Gibbs DL, Brown SD, Wolf D, Bortone DS, Ou Yang TH, Porta-Pardo E, Gao GF, Plaisier CL, Eddy JA, Ziv E, Culhane AC, Paull EO, Sivakumar IKA, Gentles AJ, Malhotra R, Farshidfar F, Colaprico A, Parker JS, Mose LE, Vo NS, Liu J, Liu Y, Rader J, Dhankani V, Reynolds SM, Bowlby R, Califano A, Cherniack AD, Anastassiou D, Bedognetti D, Rao A, Chen K, Krasnitz A, Hu H, Malta TM, Noushmehr H, Pedamallu CS, Bullman S, Ojesina AI, Lamb A, Zhou W, Shen H, Choueiri TK, Weinstein JN, Guinney J, Saltz J, Holt RA, Rabkin CE (2018) The immune landscape of cancer. *Cancer Genome Atlas Research Network, Lazar AJ, Serody JS, Demicco EG, Disis ML, Vincent BG, Shmulevich L. Immunity* 48(4):812-830.
- Tiwari A, Saraf S, Verma A, Panda PK, Jain SK. (2018) Novel targeting approaches and signaling pathways of colorectal cancer. An insight. *World J Gastroenterol* 24(39):4428-4435.
- Tomlinson IP, Novelli MR, Bodmer WF (1996) The mutation rate and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(25):14800-3.
- Tomlinson IP, Ilyas M, Johnson V, Davies A, Clark G, Talbot I, Bodmer W (1998) A comparison of the genetic pathways involved in the pathogenesis of three types of colorectal cancer. *J Pathol* 184(2):148-52.

- Tsai YJ, Huang SC, Lin HH, Lin CC, Lan YT, Wang HS, Yang SH, Jiang JK, Chen WS, Lin TC, Lin JK, Chang SC (2018) Differences in gene mutations according to gender among patients with colorectal cancers. *World J Surg Oncol* 16(1):128.
- Tsilimigras DI, Ntanasis-Stathopoulos I, Bagante F, Moris D, Cloyd J, Spartalis E, Pawlik TM (2018) Clinical significance and prognostic relevance of KRAS, BRAF, PI3K and TP53 genetic mutation analysis for resectable and unresectable colorectal liver metastases: A systematic review of the current evidence. *Surg Oncol* 27(2):280-288. Review.
- Tsushimi T, Noshima S, Oga A, Esato K, Sasaki K (2001) DNA amplification and chromosomal translocations are accompanied by chromosomal instability: analysis of seven human colon cancer cell lines by comparative genomic hybridization and spectral karyotyping. *Cancer Genet Cytogenet* 126(1):34-8.
- Umar A, Risinger JI, Hawk ET, Barret JC (2004) Testing guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Nat Reviews* 4: 153-158.
- Uthamacumaran (2017) A biophysical approach to cancer dynamics: Quantum chaos and energy turbulence. *Biosystems* 156-157:1-22.
- Valle L, Vilar E, Tavtigian SV, Stoffel EM (2019) Genetic predisposition to colorectal cancer: syndromes, genes, classification of genetic variants and implications for precision medicine. *J Pathol* 247(5):574-588.
- Vasallo JA, Barrios E (1999) Cáncer colorrectal. En: atlas de Mortalidad por Cáncer en el Uruguay. Montevideo, Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer. 20-1.
- Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT (1991) The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 34:424-425.
- Vecsey-Semjen B, Becker KF, Sinski A, Blennow E, Vietor I, Zatloukal K, Beug H, Wagner E, Huber LA (2002) Novel colon cancer cell lines leading to better understanding of the diversity of respective primary cancers. *Oncogene* 21(30):4646-62.
- Vitre BD, Cleveland DW (2012) Centrosomes, chromosome instability (CIN) and aneuploidy. *Current Opinion in Cell Biology* 24(6), 809–815.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988) Genetic alteration during colorectal tumor development *New Engl J Med* 319(9):525-532.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000) Surfing the p53 network. *Nat* 408(6810):307-10.
- Wallis J, Fox MF, Walsh FS (1994) Structure of the human N-cadherin gene: YAC analysis and fine chromosomal mapping to 18q11.2. *Genomics* 22(1):172-9.
- Wan TSK (2014) Cancer Cytogenetics: Methodology Revisited. *Ann Lab Med.* 34(6): 413–425.
- Wang L, Li L, Zhou HY, Gao XK, Li SJ (1992) t(13q;17p) and del(5q): possibly specific changes in Chinese patients with colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 62:191-196.
- Wang B, Matsuoka S, Carpenter PB, Elledge SJ (2002) 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science* 298(5597):1435-8.
- Wang X, Yang Y, Huycke MM (2017) Microbiome-driven carcinogenesis in colorectal cancer: Models and mechanisms. *Free Radic Biol Med* 105:3-15. Review.
- Wangsa D, Braun R, Schiefer M, Gertz EM, Bronder D, Quintanilla I, Padilla-Nash HM, Torres I, Hunn C, Warner L, Buishand FO, Hu Y, Hirsch D, Gaiser T, Camps J, Schwartz R, Schäffer AA, Heselmeyer-Haddad K, Ried T (2018) The evolution of single cell-derived colorectal cancer cell lines is dominated by the continued selection of tumor-specific genomic imbalances, despite random chromosomal instability. *Carcinogenesis* 39(8):993-1005.
- Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, Ueki T, Satriano R, Haller DG, Benson AB 3rd, Hamilton SR (2001) Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 344(16):1196-206.

- Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, Yamada H, Hayama T, Inoue E, Tamura J, Inuma H, Akiyoshi T, Muto T (2012) Chromosomal instability (CIN) phenotype, CIN high or CIN low, predicts survival for colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 30(18):2256-64.
- Westra JL, Plukker JT, Buys CH, Hofstra RM (2004) Genetic alterations in locally advanced stage II/III colon cancer: a search for prognostic markers. *Clin Colorectal Cancer* 4(4):252-9.
- Wilson RH, Whiteside MC, Russell SE (1997) Molecular genetics of colorectal cancer (Part 2). *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 9(2):79-82.
- Wolf U (1974) Theodor Boveri and his book "On the problems of the origin of malignant tumours" En German J (ed) *Chromosome and Cancer* John Wiley, New York pp 3-20.
- Woodford-Richens KL, Halford S, Rowan A, Bevan S, Aaltonen LA, Wasan H, Bicknell D, Bodmer WF, Houlston RS, Tomlinson IP (2001) CDX2 mutations do not account for juvenile polyposis or Peutz-Jeghers syndrome and occur infrequently in sporadic colorectal cancers. *Br J Cancer* 84(10):1314–1316.
- Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, Leggett BA (2007) Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J Gastroenterol* 13(28):3784-91. Review.
- Yabuta N, Fujii T, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Nishiguchi H, Endo Y, Toji S, Tanaka H, Nishimune Y, Nojima H (2000) Structure, expression, and chromosome mapping of LATS2, a mammalian homologue of the *Drosophila* tumor suppressor gene *lats/warts*. *Genomics*;63(2):263–270.
- Yamagishi H, Kuroda H, Imai Y, Hiraishi H (2016) Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. *Chin J Cancer.* 35:4. Review.
- Yamamoto H, Imai K (2015) Microsatellite instability: an update. *Arch Toxicol* 89(6):899-921. Review
- Yamasaki H, Mesnil M, Nakazawa H (1992) Interaction and distinction of genotoxic and non-genotoxic events in carcinogenesis. *Toxicol Lett* 64-65 Spec No:597-604.
- Yao J, Eu KW, Seow-Choen F, Vijayan V, Cheah PY (1999) Microsatellite instability and aneuploidy rate in young colorectal-cancer patients do not differ significantly from those in older patients. *Int J Cancer* 80(5):667-70.
- Ye J, Wu Y, Gilson E (2010) Dynamics of telomeric chromatin at the crossroads of aging and cancer. *Essays Biochem* 48(1):147-64. Review.
- Yin Y, Tainsky MA, Bischoff FZ, Strong LC, Wahl GM (1992) Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell* 70(6):937-48.
- Yu C, Hong H, Zhang S, Zong Y, Ma J, Lu A, Sun J, Zheng M (2019) Identification of key genes and pathways involved in microsatellite instability in colorectal cancer. *Mol Med Rep* 19(3):2065-2076.
- Yunis JJ (1981) New chromosome techniques in the study of human neoplasia. *Hum Pathol* 12(6): 540-549.
- Zhang H, Cohen SN (2004) Smurf2 up-regulation activates telomere-dependent senescence. *Genes Dev* 18(24):3028-40.
- Zhou W, Goodman SN, Galizia G, Lieto E, Ferraraccio F, Pignatelli C, Purdie CA, Piris J, Morris R, Harrison DJ, Paty PB, Culliford A, Romans KE, Montgomery EA, Choti MA, Kinzler KW, Vogelstein B (2002) Counting alleles to predict recurrence of early-stage colorectal cancers. *Lancet* 359(9302):219-25.
- Zhou CZ, Qiu GQ, Zhang F, He L, Peng ZH (2004) Loss of heterozygosity on chromosome 1 in sporadic colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 10(10):1431-5. *World J Gastroenterol* 10(10):1431-5.
- Zielińska KA, Katanaev VL (2019) Information Theory: New Look at Oncogenic Signaling Pathways. *Trends Cell Biol* (11):862-875. Review.
- Zoratto F, Rossi L, Verrico M, Papa A, Basso E, Zullo A, Tomao L, Romiti A, Lo Russo G, Tomao S (2014) Focus on genetic and epigenetic events of colorectal cancer pathogenesis: implications for molecular diagnosis. *Tumour Biol* 35(7):6195-206. Review.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera en este espacio expresar mi reconocimiento hacia aquellos que en todos los momentos vinculados a este trabajo me enriquecieron, tanto en lo académico como en lo espiritual.

Agradezco a la CC y gente de la Licenciatura de Biología Humana por facilitarme todo para realizar esta carrera que de haber existido al haber ingresado a la UdelaR sin temor a equivocarme hubiera sido mi primera elección.

Un especial agradecimiento a mi tutora de la carrera, la Prof Em Dra Elia Nunes, quien me impulsara a reorientar mis estudios realizados y alcanzar la licenciatura brindándome su tiempo, conocimiento científico y valores humanos.

Quiero expresar también especialmente mi gratitud por el compromiso asumido por la Prof Dra Faride Uturbey en su rol de orientadora por haberme permitido culminar este proceso y haberme brindado su guía permanente no solo en los aspectos técnicos sino el apoyo de una amiga quien no vaciló en señalarme todos los lineamientos que fueron necesarios.

El análisis estadístico guiado por el Prof Enrique Barrios y la Prof Mariela Garau, a los que le agradezco su dedicación y paciencia; constituyó un aporte muy importante a la hora de definir los análisis estadísticos y el valor de los hallazgos obtenidos.

La puesta a punto de los cultivos primarios para el trabajo en su etapa inicial fue hecha en el antiguamente llamado Instituto Nacional de Oncología del Ministerio de Salud Pública MSP donde mis colegas me estimularon enormemente y en particular el Dr. Joshemari Larrañaga se constituyó en pilar fundamental durante el proceso de formación inicial por su espíritu crítico y gran amistad. Agradezco el apoyo logístico que implicó el uso de las instalaciones, equipos y materiales que permitieron comenzar mi proyecto.

Gracias a la gente del Instituto de Genética Médica del Hospital Italiano tuve a mi entera disposición todo lo que fuera necesario para el desarrollo de mi proyecto de pasantía y a la Dra Alicia Vaglio quien no dudó brindarme su apoyo para completar la propuesta presentada.

Estoy muy agradecido con los Servicios quirúrgicos de los Hospitales Militar, Clínicas y Británico, Casa de Galicia y Asociación Española Primera de Socorros Mutuos que me permitieron tomar las muestras biológicas para cumplir con los objetivos del proyecto. El interés científico de todos los cirujanos puesto de manifiesto fue muy motivador. Cabe mencionar el apoyo recibido de los Servicios de Archivos Médicos que contribuyó a completar cabalmente el trabajo.

El Prof Emérito Dr Máximo Drets fue quien me ayudó fundamentalmente en el aprendizaje de la Citogenética Humana y me permitió descubrir este mundo fascinante de la Investigación Biológica. Su devoción al trabajo, temperamento, cualidades intelectuales y su marcado interés por la calidad y la excelencia, dejaron en mí una profunda huella. Este proceso estuvo acompañado por el Dr Gustavo Folle y el resto del equipo, que me guiaron en la formación teórico-práctica en las áreas de Cultivo de Células, Citogenética Humana y Genética Toxicológica del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, constituyéndose en las herramientas de mi posterior desarrollo por lo que les estaré siempre plenamente agradecido.

Ha sido un gran honor haber conocido al Prof Dr Janusz Limon en su visita a la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires y haber hecho un Curso de Cultivo de Tumores Sólidos bajo su dirección y la coparticipación de las Dras Irene Larripa e Irma Slavutzky, lo que significó un paso fundamental en el inicio del estudio citogenético del CCR en el Uruguay; en especial Irma contribuyó enormemente en mi formación como citogenetista de manera incesante.

Mis compañeros del laboratorio de Radiobiología y del laboratorio de Citogenética de la Facultad de Medicina por su enorme apoyo para que logre terminar esta etapa de estudios de manera generosa y desinteresada merecen un enorme reconocimiento y gratitud.

Son muchos los amigos que han acompañado con su ánimo, afecto, apoyo solidario y todo lo que fuera necesario para impulsar mi graduación, a los que deseo agradecer especialmente.

Agradezco a mis padres el esfuerzo que hicieron por mí durante toda su vida incidiendo proactivamente en mi instrucción y educación. Recuerdo su fuerza, firmeza, tenacidad, generosidad y alegría de vivir entre otras de sus características.

Y sobretodo hay quienes merecen un reconocimiento particular por todo el sentimiento que depositaron en cada momento, soportando las ausencias que exige el desarrollo de una carrera, tolerando y apoyando con paciencia, ternura y emocionándose finalmente por los logros que compartimos con mucho cariño. Ellos son mis hijos Adrián y Aline, y en su momento mi ex esposa Laura Graciella, a los que estoy y estaré eternamente agradecido. No cabe duda que la vida es un maravilloso obsequio cuya única justificación para que la podamos empezar a entender con nuestra enorme estrechez intelectual y humana, es por verdadero y puro amor.

Gracias!!!!