

TESIS DOCTORAL

**PAPEL DEL DAÑO GENÓMICO EN EL
CÁNCER COLORRECTAL**

Rosa Ana Risques Fernández

Marzo 2001

PAPEL DEL DAÑO GENÓMICO EN EL CÁNCER COLORRECTAL

Memoria presentada por

ROSA ANA RISQUES FERNÁNDEZ

para optar al título de

DOCTORA EN BIOLOGÍA

Tesis realizada bajo la dirección del
Doctor Miguel A. Peinado Morales
en el Institut de Recerca Oncològica
adscrita al Departament de Biologia Cèl·lular, Fisiologia i Immunologia
Facultat de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona
Programa de Biologia Cèl·lular
Tutora: Rosa Miró

Doctorando

Director

R.A. Risques

M.A. Peinado

Bellaterra, Marzo 2001

ABREVIATURAS

AI: aneuploidy index

AP-PCR: arbitrarily-primed polimerase chain reaction

BFB: breakage-fusion-bridge

CGH: comparative genomic hybridization

CI: cell index

DI: DNA index

FAL: fractional allelic loss

FAP: poliposis adenomatosa familiar

FISH: fluorescence in situ hybridization

FS: forward scatter

GDF: genomic damage fraction

GF: gains fraction

HNPCC: cáncer colorrectal hereditario no polipósico

HR: hazard ratio

inter-SSR-PCR: inter-simple sequence repeat PCR

IP: yoduro de propidio

LF: losses fraction

MMR: mismatch repair system

MS-AP-PCR: methylation-sensitive AP-PCR

MSI: microsatellite instability

MT: monosomic type

NT: normal type

PI: proliferation index

R0: resección quirúrgica radical

RAP-PCR: RNA AP-PCR

ROC: receiver operating characteristic

SS: side scatter

SSCP: single-strand conformation polymorphism

TT: trisomic type

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1. Estadíos de Dukes.

Figura 2. Modelo de progresión tumoral como proceso evolutivo.

Figura 3. Modelo integrado de la progresión del carcinoma colorrectal.

Figura 4. Representación esquemática de un citómetro de flujo.

Figura 5. Fotografía ilustrativa del proceso de microdissección.

Figura 6. Principio de la AP-PCR.

Figura 7. Esquema del funcionamiento del programa de densitometría Phoretix 1D Advanced.

Figura 8. Histogramas utilizados en el análisis de la citometría de flujo.

Figura 9. Figura ilustrativa del análisis por citometría de flujo del contenido de DNA.

Figura 10. Recta que define el límite de variabilidad de la técnica.

Figura 11. Patrones de bandas obtenidos en los tres experimentos de AP-PCR.

Figura 12. Relación entre GDF y AI.

Figura 13. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia total para la clasificación de casos basada en el Aneuploidy Index (AI).

Figura 14. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia total para las clasificaciones de los casos aneuploides basadas en el GDF y en la combinación de GDF y AI.

Figura 15. Curvas de riesgo para tumores diploides y aneuploides en función del GDF.

Figura 16. Curvas de riesgo para tumores aneuploides en función del GDF y del AI.

Figura 17. Curvas de riesgo para tumores aneuploides basadas en la interacción entre diferentes variables.

Figura 18. Localización cromosómica de bandas de AP-PCR mediante el panel de híbridos monosómicos humano/roedor.

Figura 19. Alelotipo de las bandas localizadas cromosómicamente.

Figura 20. Bandas con comportamiento diferencial en casos diploides, aneuploides de baja inestabilidad y aneuploides de alta inestabilidad.

Figura 21. Asociaciones entre la clasificación de origen citogenético y el estadio de Dukes, las mutaciones en p53 y la inestabilidad de microsatélites.

Figura 22. CGH de un tumor diploide localizado en el colon izquierdo.

Figura 23. Análisis por citometría de flujo de cuatro tumores primarios con sus correspondientes metástasis.

Figura 24. Modelo integrado de las vías de progresión en el cáncer colorrectal.

Figura 25. Modelo de Cox para el estadio de Dukes.

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla 1. Sistema de estadio TNM.

Tabla 2. Comparación entre el sistema de estadio de Dukes y el TNM.

Tabla 3. Resumen de los principales factores moleculares con supuesto valor pronóstico en cáncer colorrectal.

Tabla 4. Condiciones de los experimentos de AP-PCR.

Tabla 5. Relación del GDF y el AI con las variables clínico-patológicas y moleculares.

Tabla 6. Análisis univariante de la supervivencia total.

Tabla 7. Análisis multivariante en tumores aneuploides.

Tabla 8. Supervivencia en relación al tratamiento coadyuvante recibido y al Aneuploidy Index.

Tabla 9. Comparación de los modelos multivariantes y univariantes para las variables que se asocian a agresividad en tumores aneuploides.

Tabla 10. Clasificación de los tumores colorrectales en función del daño genómico y propuestas de diferentes tipos de inestabilidad asociados.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Cáncer colorrectal: epidemiología, diagnóstico y pronóstico	1
1.1. Diagnóstico y factores de riesgo	1
1.2. Factores pronósticos	3
1.2.1. Factores clínico-patológicos	3
1.2.2. Medidas de daño genético	6
1.2.3. Factores moleculares	11
2. Progresión tumoral en el cáncer colorrectal	16
2.1. El cáncer como proceso evolutivo	16
2.1.1. Mutación y selección	16
2.1.2. El modelo de Vogelstein	18
2.1.3. Alteraciones genéticas más frecuentes en cáncer colorrectal	20
2.2. Inestabilidad genómica	23
2.2.1. El motor de la progresión tumoral	23
2.2.2. Inestabilidad de microsatélites	27
2.2.3. Inestabilidad cromosómica	29
2.2.3.1. Alteraciones cromosómicas e inestabilidad	29
2.2.3.2. Inestabilidad cromosómica numérica	31
2.2.3.3. Inestabilidad cromosómica estructural	32
2.2.3.4. Causas genéticas de la inestabilidad cromosómica	33
2.2.4. Vías de progresión en cáncer colorrectal	36
2.2.4.1. Vías basadas en estudios moleculares	36
2.2.4.2. Vías basadas en estudios citogenéticos	38
2.2.4.3. ¿Múltiples vías de progresión?	39
PREMISAS E HIPÓTESIS	41
OBJETIVO	43

MATERIAL Y MÉTODOS	45
1. Pacientes y muestras	45
2. Citometría de flujo	46
2.1. Introducción a la técnica	46
2.2. Metodología	47
2.3. Procesamiento de datos	50
3. AP-PCR	52
3.1. Introducción a la técnica	52
3.2. Metodología	55
3.3. Análisis de los patrones de bandas	57
3.4. Cuantificación del daño genómico y detección del límite de variabilidad	59
3.5. Análisis de bandas con cambios recurrentes	60
4. Otros análisis moleculares	63
5. Análisis estadístico	64
5.1. Estadística uni y bivariable	64
5.2. Análisis de la supervivencia	64
5.2.1. Valoración de las medidas de daño genómico como factores pronósticos	65
5.2.2. Análisis multivariante mediante modelos de Cox	66
RESULTADOS	69
1. Ploidía en el cáncer colorrectal	69
2. Daño genómico medido por AP-PCR	71
3. Asociaciones con variables moleculares y clínico-patológicas	74
4. Análisis de supervivencia	77
4.1. Valor pronóstico de las variables analizadas	78
4.1.1. Valor pronóstico de las variables clínico-patológicas y moleculares	78
4.1.2. Valor pronóstico de las variables derivadas de la citometría de flujo	80
4.1.3. Valor pronóstico de las variables derivadas de la AP-PCR	84
4.1.4. Valor pronóstico conjunto del AI y el GDF	85

4.2. Análisis multivariante mediante modelos de Cox	86
4.2.1. Interacción entre GDF y ploidía	87
4.2.2. Interacciones en tumores aneuploides	88
4.2.3. Valor pronóstico neto de las variables que se asocian a asociar a agresividad en tumores aneuploides	91
5. Análisis específico de marcadores obtenidos por AP-PCR	93
5.1. Selección y mapaje de bandas en función de su localización cromosómica y sus asociaciones con variables de interés	93
5.2. Caracterización de los perfiles moleculares de los tumores diploides, aneuploides de bajo daño genómico y aneuploides de alto daño genómico	97
6. Análisis relacionados con la progresión tumoral	99
6.1. Aplicación de la clasificación citogenética	99
6.2. Análisis de la ploidía en la progresión tumoral	103
DISCUSIÓN	105
1. Aproximaciones metodológicas al análisis del daño genómico	105
1.1. Utilidad del AI como nuevo índice de cuantificación de aneuploidía	106
1.2. Ventajas de la AP-PCR en la cuantificación del daño genómico	108
2. Valor pronóstico de las medidas de daño genómico	110
2.1. Consideraciones generales	110
2.2. Valor pronóstico del AI en tumores aneuploides	113
2.3. Valor pronóstico del GDF en tumores aneuploides y relación con mutaciones en p53	114
3. Vías de progresión en el cáncer colorrectal	117
3.1. Vías de progresión basadas en el estudio del daño genómico	117
3.2. Propuesta de modelo integrado de las vías de progresión del cáncer colorrectal	123
4. Papel de la aneuploidía en la diseminación metastásica	125
5. Estudio de los marcadores obtenidos por AP-PCR	127
5.1. Análisis global	127
5.2. Análisis específico	128

CONCLUSIONES	131
APÉNDICE	133
1. Modelos de Cox	133
2. Secuencia de las bandas de mayor interés obtenidas por AP-PCR	137
BIBLIOGRAFÍA	139

INTRODUCCIÓN

1. CANCER COLORRECTAL: EPIDEMIOLOGÍA, DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO

El cáncer de colon es la tercera neoplasia, en orden de frecuencia, en la población mundial. Su incidencia es más elevada en los países occidentales, de tal manera que en Europa ocupa el segundo lugar tras el cáncer de pulmón (Maestro de las Casas et al, 1997). Se estima que a la edad de 70 años al menos un 50% de la población occidental desarrollará alguna forma de cáncer colorrectal (Fahy et al, 1998). Además entre un 22-36% de los casos se diagnostican en etapa avanzada y probablemente en más de la mitad existen micrometástasis a distancia en el momento del diagnóstico (Sastre y Diaz-Rubio, 1998). Tras la cirugía, entre un 20-40% de los pacientes recaen y mueren debido al tumor (Abad et al, 1997).

Es, por tanto, evidente la gran problemática que supone este tipo de cáncer tanto a nivel social como individual y resulta patente la necesidad de aportar nuevos conocimientos que permitan la mejora de las actuaciones que se llevan a cabo para combatirlo. Dada la elevada incidencia del cáncer colorrectal, la mayoría de los esfuerzos se centran en el diagnóstico precoz llevado a cabo en los grupos de riesgo y, fundamentalmente, en la determinación de factores pronósticos que permitan predecir la evolución del tumor y decidir la terapia más adecuada para cada caso.

1.1 DIAGNÓSTICO Y FACTORES DE RIESGO

El diagnóstico precoz del cáncer de colon se lleva a cabo mediante un *screening* cuyo objetivo es la detección y eliminación de adenomas, ya que el adenoma es la principal lesión precursora del carcinoma colorrectal (Hill, 2000). El *screening* reduce la morbilidad y la mortalidad colorrectal gracias, por una parte, al diagnóstico de la enfermedad oculta en un estadio más favorable y, por otra, a la prevención de la enfermedad por la eliminación de las lesiones precursoras (Smith et al, 2000). Las pruebas de *screening* en una población general para una enfermedad tan común como el cáncer colorrectal resultarían muy costosas, por lo que se llevan a cabo fundamentalmente en los grupos de riesgo: personas entre 50 y 70 años, miembros de familias con antecedentes de cáncer colorrectal (en estos casos el cáncer suele presentarse en edades más tempranas de lo habitual), pacientes con poliposis familiar, individuos con colitis ulcerosa y pacientes en

quienes se hayan resecado uno o más carcinomas colorrectales (Maestro de las Casas et al, 1997).

Desde hace décadas se sabe que **el riesgo de padecer cáncer de colon viene determinado por factores ambientales y genéticos** (Hill, 2000). La importancia de los factores ambientales queda claramente demostrada con los datos epidemiológicos. Estos indican que la tasa de incidencia del cáncer colorrectal varía aproximadamente unas 20 veces de unos países a otros, siendo la más alta la de los países desarrollados y la más baja la de la India. Además se ha observado que entre los inmigrantes y sus descendientes las tasas de incidencia alcanzan rápidamente las del país receptor (Potter, 1999). El factor ambiental mejor definido como posible causante de estas observaciones es la dieta. El consumo de vegetales y fibra tiene un efecto protector, mientras que el de carnes y grasas aumenta el riesgo de padecer la enfermedad (Ghadirian et al, 1997; Potter, 1999). Sin embargo estudios recientes no parecen confirmar estas observaciones (Schatzkin et al, 2000; Bonithon-Kopp et al, 2000). Por otro lado, hay evidencias que indican un aumento del riesgo debido a la obesidad y al consumo de tabaco y alcohol y una disminución asociada al ejercicio físico y los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (aspirina y otros) (Potter, 1999; Lieberman, 1998).

Respecto a los factores de riesgo genético, las dos principales enfermedades autosómicas dominantes que predisponen al cáncer colorrectal son la **poliposis adenomatosa familiar (FAP)** y el **cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC)** que representan el 1% y del 5 al 10% de todos los carcinomas colorrectales, respectivamente (Maestro de las Casas et al, 1997). Para la población general el riesgo de padecer un cáncer colorrectal a lo largo de toda la vida es del 5% mientras que para los pacientes con FAP es de más del 95% y para los de HNPCC del orden del 70% (Kinzler y Vogelstein, 1998). Los pacientes con FAP heredan una mutación en el gen APC que les predispone a perder fácilmente las dos copias del gen si se da una segunda mutación en el alelo normal. Como el gen APC funciona controlando la proliferación celular su ausencia permite la formación de adenomas. Por eso estos pacientes se caracterizan por la presencia de múltiples pólipos intestinales, los cuales son precursores de posibles carcinomas. De todas maneras, existe un 25% de pacientes con FAP sin mutación identificada en el gen APC, lo que hace pensar en la existencia de otros genes responsables de un fenotipo muy similar al de FAP (Müller et al, 2000). Por otra parte, los pacientes con HNPCC heredan la pérdida de un alelo de alguno de los genes implicados en el mecanismo de reparación de errores en el DNA conocido como MMR (mismatch repair) system. Los genes del sistema MMR más frecuentemente alterados son el hMLH1

y el hMSH2. La pérdida del segundo alelo hace que la célula sea incapaz de reparar los errores en el DNA dando lugar a aumentos y disminuciones de longitud de las secuencias microsatélites, algunas de las cuales afectan a genes que favorecen la progresión tumoral. Este mecanismo se conoce como inestabilidad de microsatélites (ver apartado 2.2.2) (Müller et al, 2000).

1.2 FACTORES PRONÓSTICOS

Se consideran factores pronósticos o marcadores de riesgo las variables que nos informan acerca del comportamiento biológico del tumor y que nos permiten tomar una actitud más o menos agresiva en cuanto al seguimiento y tratamiento del mismo (Maestro de las Casas et al, 1997). En el cáncer colorrectal son fundamentales ya que dada la elevada incidencia de recurrencia postoperatoria es necesario identificar los subgrupos de pacientes con peor pronóstico con el fin de proporcionarles quimioterapia adyuvante (Gennari et al, 2000; Abad et al, 1997). A nivel práctico, los factores pronósticos del cáncer colorrectal se pueden dividir en tres categorías: variables clínico-patológicas, medidas de daño genómico y marcadores moleculares.

1.2.1 FACTORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS

Estadío de Dukes y sistema TNM

Se han descrito muchos factores clínico-patológicos con valor pronóstico pero sin duda alguna el más importante es el estadío de Dukes (Deans et al, 1992). Desde el momento de su creación en 1935 ha sufrido sucesivas modificaciones (Astler y Coller (1954), Turnbull (1967) y otras) con la intención de añadir información adicional, pero que en algunos casos han creado gran confusión. Debido a la falta de consenso la American Joint Committee on Cancer desarrolló el sistema de estadío TNM para carcinoma colorrectal (Hutter et al, 1986) el cual es más completo pero también más difícil de aplicar (Crissman et al, 1989; Deans et al, 1992). En realidad ambos sistemas incluyen los dos factores pronósticos más importantes que son el grado de infiltración tumoral en la pared intestinal y la presencia de metástasis en los nódulos linfáticos. Numerosos estudios han demostrado tanto en análisis univariados como multivariados que estos parámetros son los que más fuertemente influyen en la supervivencia (Gennari et al, 2000). Actualmente ambas clasificaciones se definen tal y como se indican en la Figura 1 y en la Tabla 1. La

relación entre ambas se muestra en la Tabla 2, donde se puede apreciar claramente la mayor deficiencia del estadio de Dukes, que es la ausencia de información acerca del número y el tipo de nódulos linfáticos implicados (N1,N2 y N3 en el sistema TNM)(Deans et al, 1992). A pesar de esto, **el significado pronóstico y la facilidad comparativa del estadio de Dukes la convierten en la variable más utilizada** y aseguran su función como estándar contra el cual todas las demás variables pronósticas del cáncer colorrectal deberían ser testadas (Deans et al, 1992).

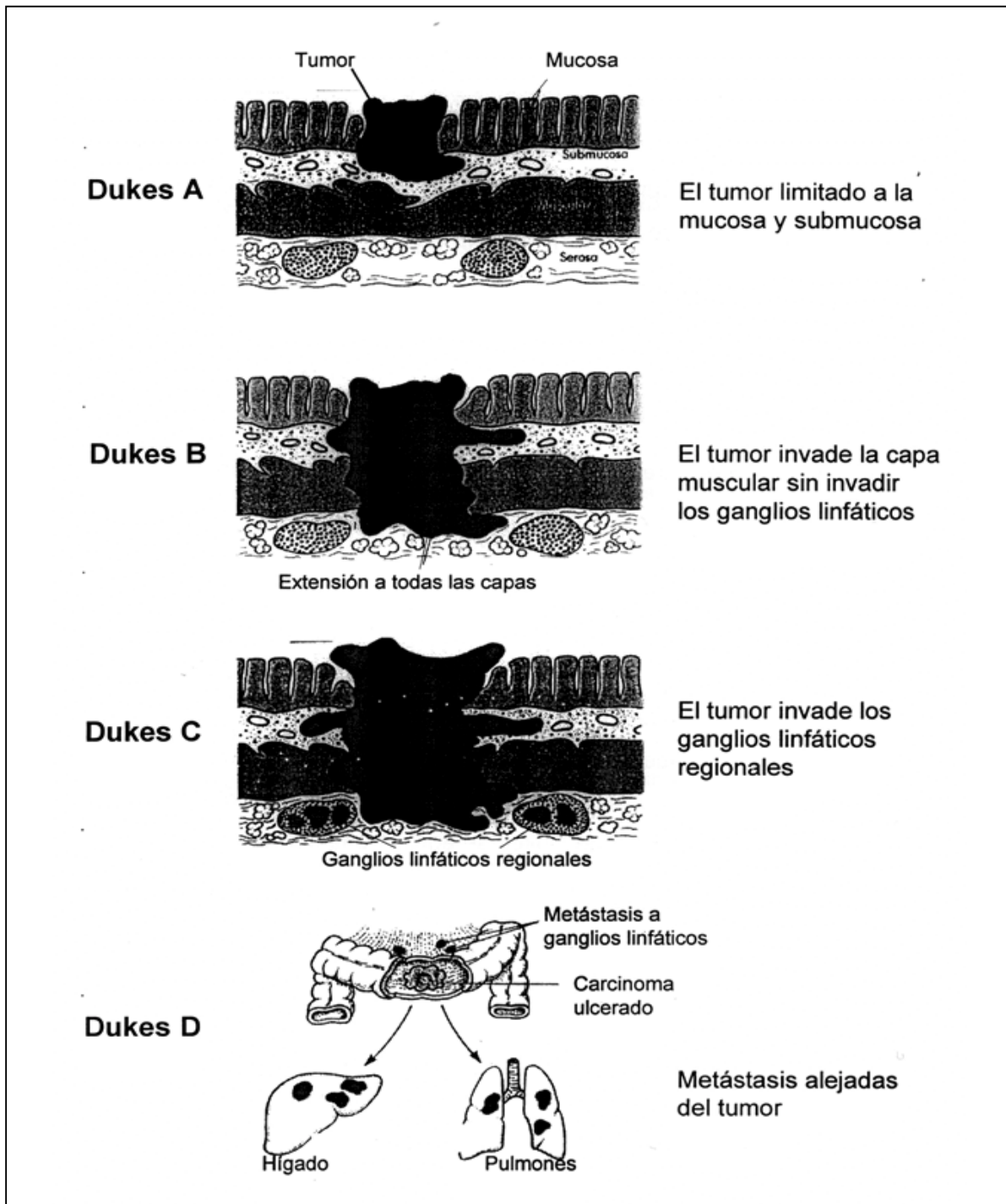


Figura 1. Estadios de Dukes.

Tabla 1. Sistema de estadio TNM.

<i>Tumor primario</i>	
Tx	No se puede determinar.
T0	No hay signos del tumor primario.
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> .
T1	Infiltra la submucosa.
T2	Infiltra la muscular propia.
T3	Si existe serosa: invade la muscular propia hasta la subserosa o la serosa (sin sobrepasarla) o la grasa pericólica (sin sobrepasar el mesenterio). Si no existe serosa (dos tercios distales del recto, pared posterior del colon ascendente o descendente): invade la muscular propia.
T4	Si hay serosa: infiltra el peritoneo o infiltra a su través órganos o estructuras vecinas (incluye la invasión de otro segmento colorrectal a través de la serosa). Si no la hay: invade otros órganos (vagina, próstata, uréter, riñón).
<i>Afectación ganglionar</i>	
Nx	No se pueden determinar.
N0	No hay adenopatías metastásicas.
N1	Metástasis en 1 a 3 ganglios pericólicos o perirrectales.
N2	Metástasis en 4 o más ganglios pericólicos o perirrectales.
N3	Metástasis en cualquier ganglio situado sobre trayectos vasculares.
<i>Metástasis a distancia</i>	
M0	No existen metástasis a distancia.
M1	Existen metástasis a distancia (especificar la localización).

Tabla 2. Comparación entre el sistema de estadios de Dukes y el TNM.

		T1	T2	T3	T4
M0	N0	Estadio I (A)		Estadio II (B)	
	N1	Estadio III (C)			
	N2				
	N3				
M1	Estadio IV (D)				

Grado histológico

Más del 95% de los cánceres colorrectales son adenocarcinomas con diferente grado de diferenciación: bien (10-15%), moderadamente (80%) o pobremente (3-5%) diferenciados (Gennari et al, 2000). Muchos estudios han demostrado relación entre grado histológico y supervivencia y es generalmente aceptada su importancia como factor pronóstico independiente del estadio. Sin embargo el análisis de la diferenciación es muy subjetivo y se da una elevada variabilidad entre observadores. Además no existen unos criterios estrictos para separar los grados histológicos (Gennari et al, 2000; Crissman et al, 1989; Deans et al, 1992). Todo ello le resta valor frente al resto de clasificaciones.

Edad, sexo y localización

El valor pronóstico de estos tres factores clínico-patológicos es controvertido. Se ha sugerido que los pacientes jóvenes (por debajo de 40 años) tienen peor pronóstico, pero podría ser debido a que se diagnostican en estadios más avanzados de la enfermedad. Respecto al sexo, se ha propuesto mejor supervivencia para las mujeres, aunque estudios posteriores no lo han confirmado. Tanto la localización en colon izquierdo como en colon derecho han sido consideradas como desfavorables en diferentes estudios. Por tanto no se recomienda el uso de ninguno de estos tres parámetros para predecir el pronóstico del tumor (revisado en Gennari et al, 2000 y Abad et al, 1997).

1.2.2 MEDIDAS DE DAÑO GENÉTICO

Contenido de DNA (ploidía)

Una de las características más frecuentes de las células tumorales es el contenido anormal de DNA (aneuploidía). Por ello la determinación de esta variable, principalmente **por citometría de flujo** (para más información sobre la técnica consultar el apartado 2 de Material y Métodos) y su utilidad como marcador pronóstico han sido intensamente estudiadas. Sin embargo, a lo largo de los años **las distintas revisiones sobre el tema han ido mostrando el elevado grado de contradicción entre los diferentes trabajos y, por tanto, han descartado su posible aplicación pronóstica a la espera de resultados más concluyentes** (Deans et al, 1992; Bauer et al, 1993; ASCO, 1996; Compton et al, 2000). En general todas las revisiones coinciden en que las discrepancias se deben a la suma de diferentes factores. Los más importantes son: falta de una

metodología estandarizada, variedad en los tipos de tejido (congelado o parafinado), posible contaminación de la muestra con tejido no tumoral, muestras pequeñas, escaso uso de análisis multivariantes (para demostrar el valor pronóstico independiente del estadio de Dukes), establecimiento de puntos de corte arbitrarios y nomenclatura confusa (diploide, no diploide, *near* diploide, aneuploide, tetraploide, *near* tetraploide, aneuploide bajo, aneuploide alto, etc.). Para mejorar esta situación los autores sugieren el uso de muestras grandes, analizadas con métodos consistentes y reproducibles y evaluadas con análisis multivariantes. También recomiendan la utilización de múltiples biopsias debido a la alta heterogeneidad observada y la realización de microdissección para seleccionar la zona de tejido con más alto contenido tumoral. En cuanto a este último aspecto, un grupo de investigadores ha desarrollado una metodología para citometría de flujo basada en la tinción de citoqueratinas, las cuales se encuentran únicamente en las células de origen epitelial y así permiten discriminar en los histogramas la población diploide contaminante compuesta por células del estroma y linfocitos infiltrantes (Frei y Martínez, 1993; Leers et al, 1995; Zarbo et al, 1997). Por tanto, a pesar de los múltiples estudios ya realizados, resulta necesario continuar en esta línea de investigación aplicando nuevas aproximaciones para intentar elucidar cuál es el papel que juega la aneuploidía en la progresión tumoral y, en concreto, en la determinación del pronóstico de los tumores.

Otra aplicación derivada de la citometría de flujo es el **análisis de la actividad proliferativa**, ya sea en forma de fracción de células en fase S o como índice de proliferación celular (considerando también las células en G2/M) (ver apartado 2.3 de Material y Métodos). Aunque no es una medida de daño genético, la incluimos en este apartado porque su estudio casi siempre va asociado a la determinación de la aneuploidía. De hecho, en muchos trabajos se ha comparado el valor pronóstico de ambas determinaciones y algunas revisiones sugieren que es mayor, aunque igualmente no confirmado, en el caso de la actividad proliferativa (Bauer et al, 1993; ASCO, 1996). Los principales problemas que presenta la actividad proliferativa, además de las cuestiones metodológicas mencionadas para el contenido de DNA, son: en primer lugar, su determinación en tumores aneuploides, ya que la existencia de dos picos complica la interpretación de los resultados; y en segundo lugar, la definición de alta y baja actividad proliferativa usando la media muestral. Las revisiones recomiendan el uso de tertiles (baja, media y alta actividad proliferativa) (Bauer et al, 1993; ASCO, 1996), pero **aún no se ha llegado a ningún consenso ni acerca de su determinación ni respecto a su valor pronóstico** (Compton et al, 2000).

Pérdidas alélicas

Una aproximación interesante para medir la frecuencia de deleciones alélicas presentes en el genoma de una célula tumoral fue la que desarrolló el grupo de Vogelstein. Consistía en analizar marcadores de cada uno de los brazos cromosómicos (autosómicos) no acrocéntricos del cariotipo humano. Los marcadores eran fragmentos de DNA del tipo RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) que permitían distinguir si uno de los dos alelos parentales se había perdido (Vogelstein et al, 1989; Kern et al, 1989). La fracción de pérdidas alélicas (**Fractional Allelic Loss, FAL**) se definió como el número de brazos cromosómicos en los que se había observado pérdida alélica dividido por el número de brazos cromosómicos en los que existían marcadores alélicos informativos. Para los tumores analizados la media de brazos cromosómicos con deleciones alélicas fue del 20%. Utilizando este valor como punto de corte fue posible descubrir que **los tumores con mayor frecuencia de deleciones alélicas tenían una mayor probabilidad de recurrencia de la enfermedad y de muerte** (Vogelstein et al, 1989; Kern et al, 1989). Además también se pudo determinar que las deleciones alélicas de 17p y 18q tenían valor pronóstico por sí mismas (ver tabla 3) (Kern et al, 1989). Esta técnica es muy laboriosa y lenta, especialmente si se quiere analizar un número elevado de tumores. Esta razón hace que no sea recomendable y explica la ausencia de trabajos posteriores que la utilicen.

Desequilibrios (ganancias y pérdidas) alélicas

Poco después, en el 1990, Welsh y McClelland desarrollaron una técnica de *fingerprint* de DNA que consiste en la amplificación por PCR de DNA genómico usando *primers* arbitrarios y unos ciclos iniciales de baja astringencia. La técnica, llamada **AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR)**, produce patrones de múltiples bandas, los cuales son reproducibles y permiten la comparación entre diferentes especies (Welsh y McClelland, 1990). La aplicación de esta técnica al estudio del cáncer demostró que **la comparación por AP-PCR del DNA proveniente de tejido tumoral y de su correspondiente normal permitía identificar bandas que sufrían ganancias y pérdidas de intensidad y que correspondían, respectivamente, a ganancias y pérdidas alélicas del DNA tumoral** (Peinado et al, 1992). Además de amplificaciones y deleciones la AP-PCR teóricamente también puede detectar translocaciones y mutaciones puntuales que ocurran en el lugar de *annealing* del *primer* (Navarro y Jorcano, 1999) (para más información sobre la AP-PCR ver apartados 3.1 y 3.2 de Material y Métodos). A diferencia del análisis de FAL, la AP-PCR es una técnica muy simple y relativamente rápida, lo que ha favorecido su uso para

la determinación de daño genómico en muchos tipos de tumores: colorrectal (Peinado et al, 1992; Arribas et al, 1997; Malkhosyan et al, 1998), carcinoma de célula pequeña de pulmón (Kohno et al, 1994) y no de célula pequeña de pulmón (de Juan et al, 1998), carcinoma de páncreas (Achille et al, 1996) y astrocitomas (Saitoh et al, 1998). A pesar de ello, de momento sólo en dos de los estudios publicados se ha determinado el valor pronóstico (Arribas et al, 1997; de Juan et al, 1998). Aún tratándose de tipos de cánceres diferentes y de aproximaciones distintas, en ambos queda claramente demostrado que **los tumores con alto daño genómico tienen menor supervivencia**. En el trabajo de Arribas y colaboradores el daño genómico se cuantificó como el número de bandas con ganancias o pérdidas dividido entre el número de bandas totales. Después se buscó el punto de corte estadísticamente óptimo para dividir los tumores en dos grupos diferentes y se observó que el grupo con mayor daño genómico tenía peor pronóstico (Arribas et al, 1997). Sin embargo en el trabajo de de Juan los tumores se clasificaron en tres categorías de daño genómico: bajo, medio y alto, y se comprobó que los tumores de alto daño genómico tenían menor supervivencia que los de medio y bajo (de Juan et al, 1998). Estos resultados, por tanto, apuntan a un posible valor pronóstico del daño genómico medido por AP-PCR y justifican la realización de experimentos confirmativos con series más amplias de tumores. Además la AP-PCR también ha permitido la identificación de alteraciones en regiones cromosómicas concretas con posible valor pronóstico, como por ejemplo las deleciones encontradas en el brazo corto del cromosoma 4 (tabla 3) (Arribas et al, 1999 (a); Arribas et al, 1999 (b)).

Existen otras dos técnicas relacionadas con la AP-PCR que permiten cuantificar tipos diferentes de daño genómico: la **inter-SSR PCR (Inter-Simple Sequence Repeat PCR)** y la **MS-AP-PCR (Methylation-Sensitive AP-PCR)**. La primera detecta el mismo tipo de alteraciones que la AP-PCR: amplificaciones, deleciones y translocaciones (Basik et al, 1997) y, aunque ha sido utilizada para estimar el número de alteraciones genómicas presentes en el cáncer colorrectal (Stoler et al, 1999) y su relación con algunas variables moleculares (Kahlenberg et al, 1996), su valor pronóstico no ha sido determinado. La segunda técnica permite estudiar tumores con patrones alterados de metilación pero, en lugar de aplicarla al estudio del pronóstico de los tumores, sus autores la han orientado a la identificación de regiones del genoma con metilación diferencial en tejido normal y tumoral (Gonzalvo et al, 1997).

Alteraciones cromosómicas

La **citogenética clásica** ofrece una visión global de las alteraciones que ocurren en el cariotipo de las células tumorales. Es la técnica que proporciona una información más amplia y detallada de las alteraciones que tienen lugar en el tumor, pero presenta el inconveniente de que se necesitan metafases de buena calidad y éstas son difíciles de conseguir en el caso de los tumores sólidos (Mitelman, 2000). A pesar de ello se han llevado a cabo varios estudios en los que se han conseguido cariotipar un número considerable (unos 250) de tumores colorrectales y en algunas de las series se ha podido comprobar que **los pacientes con tumores de cariotipo complejo presentaban menor supervivencia que el resto de pacientes** (Heim y Mitelman, 1995; Mitelman, 2000). Además, es un hecho conocido desde hace tiempo que, en general, los cánceres avanzados muestran más aberraciones cromosómicas que los cánceres en estadios iniciales (Nowell, 1986). La importancia de los estudios citogenéticos en el cáncer colorrectal, sin embargo, no reside en su utilidad como valor pronóstico, ya que es una técnica de difícil aplicabilidad, sino en la información que proporcionan acerca de las vías de progresión de los tumores (ver apartado 2.2.4.2 de Introducción).

Desequilibrios (ganancias y pérdidas) cromosómicos

La hibridación genómica comparada (**Comparative Genomic Hybridization, CGH**) consiste en una hibridación in situ competitiva entre DNA normal y DNA tumoral, cada uno marcado con un fluorocromo e hibridados sobre una metafase normal (Kallioniemi et al, 1993). Esto permite detectar las regiones cromosómicas con ganancia o pérdida de DNA. Como en las técnicas anteriores, existe una doble aproximación: el estudio de las regiones con ganancias y pérdidas recurrentes y el estudio de la cantidad de daño genómico presente en un tumor o en un grupo de tumores. La segunda aproximación, que es la que más nos interesa, se ha aplicado en menos estudios (Georgiades et al, 1999; Ried et al, 1999). Aunque no se hayan llevado a cabo análisis de supervivencia, uno de estos trabajos indica que **el daño genómico en carcinomas colorrectales, medido como el número de alteraciones cromosómicas por caso, aumenta con el estadio tumoral y se asocia con variables típicamente relacionadas con una mayor progresión del tumor** (Ried et al, 1999).

Desregulación de la expresión génica

A diferencia de las alteraciones a nivel genómico, casi no existen estudios que analicen de forma global las alteraciones a nivel de expresión y, menos aún, que correlacionen este análisis con las variables de supervivencia. Sin embargo esto ha sido realizado en nuestro grupo mediante la utilización de una técnica llamada **RAP-PCR (RNA Arbitrarily Primed PCR)**. Como su propio nombre indica, consiste en una AP-PCR partiendo de RNA previamente transcrito a cDNA (Liang y Pardee, 1992; Welsh et al, 1992). La técnica es altamente reproducible y fácilmente aplicable a un número elevado de muestras (Tortola et al, 1998). De la misma manera que en la AP-PCR, en la RAP-PCR se puede cuantificar el número de bandas con ganancias o pérdidas, las cuales, en este caso, corresponden a alteraciones en la expresión de genes. Curiosamente, **los casos con peor pronóstico fueron aquellos con muchas alteraciones en la expresión**, especialmente cuando estas alteraciones correspondían a disminuciones del nivel de expresión. La significación conseguida tanto a nivel univariado como multivariado muestra que la RAP-PCR puede tener aplicación pronóstica (Tortola et al, 1999b).

1.2.3 FACTORES MOLECULARES

El cáncer colorrectal es el modelo mejor conocido de progresión tumoral. La facilidad en la identificación de las fases de desarrollo desde el adenoma hasta el carcinoma metastásico, la existencia de modelos hereditarios y el gran esfuerzo dedicado en los diez últimos años han permitido la identificación de dos principales vías de progresión y la caracterización de algunas de las alteraciones genéticas responsables del desarrollo de estos tumores. Muchas de estas alteraciones se han propuesto como posibles factores pronósticos. **Para dar una idea de la complejidad de la situación en la tabla 3 se expone un resumen de los principales factores moleculares con supuesto valor pronóstico en cáncer colorrectal.** Principalmente se referencian artículos originales (no revisiones) en los que se valora el pronóstico de los factores mediante estadística de supervivencia, excluyendo los estudios en los que esta valoración se lleva a cabo simplemente por el análisis de la relación con metástasis o con estadios avanzados de la enfermedad. También se han priorizado los artículos publicados durante los dos últimos años. La tabla no pretende dar una visión representativa de todos los estudios realizados, sino reflejar la dificultad que supone el análisis de la situación. Otras consideraciones interesantes relacionadas con este tema se exponen en el siguiente cuadro.

1. Muchos de los factores presentan valor pronóstico sólo para un determinado grupo de casos. En la tabla se han incluido los trabajos más generales, pero existen otros en los que la relación con supervivencia se ve limitada a un grupo concreto de tumores. Por ejemplo, el buen pronóstico asociado a la expresión de DCC se ha atribuido tan solo a los tumores diploides o con baja fracción en fase S (Sun et al, 1999). Asimismo, las mutaciones en k-ras se han relacionado con mal pronóstico en tumores de Dukes B y no en Dukes C, mientras que, al contrario, la sobreexpresión de p53 supondría buen pronóstico en Dukes C y no en Dukes B (Ahnen et al, 1998).
2. Aunque el valor pronóstico de cada alteración se suele analizar de forma individual, muchas veces es la asociación conjunta de dos alteraciones lo que predice con mayor significación la evolución de los tumores. Por ejemplo, la expresión de bax se ha propuesto como un marcador de buen pronóstico, pero la mejor supervivencia la muestran los tumores que, además de expresar bax, tienen p53 intacta (Sturm et al, 1999). De la misma manera, la combinación de expresión de bcl-2 y no mutación de p53 se ha descrito como la más favorable respecto al resto de combinaciones (Schwandner et al, 2000). Más aún, un estudio que analiza la expresión de bcl-2, c-myc y p53 ha encontrado que la coexpresión de las tres predice un pronóstico peor que la expresión por separado de cada una de ellas (Bhatavdekar et al, 1997).
3. Los diferentes tipos de mutaciones pueden tener diferentes efectos en el pronóstico. En el caso de ras se han descrito detalladamente los tipos de mutaciones que se asocian a mal pronóstico (Span et al, 1996; Cerottini et al, 1998; Andreyev et al, 1998). Respecto a p53, se ha sugerido que las mutaciones relacionadas con baja supervivencia son las que afectan al dominio L3 de la proteína, el cual interacciona con el DNA (Borresen-Dale et al, 1998) o bien mutaciones que confieren una conformación flexible a la proteína (Webley et al, 2000).
4. Existen otros factores moleculares con posible valor pronóstico y que no se han incluido en la tabla por motivos de simplificación. Para una revisión exhaustiva y reciente del tema se recomienda consultar la publicación del College of American Pathologists: Compton et al. *Prognostic factors in colorectal cancer* (Arch Pathol Lab Med, vol 124, July 2000). Además hay que tener en cuenta que constantemente aparecen artículos en los que se sigue analizando la validez de muchos de los factores incluidos en la tabla, ya que la mayoría son controvertidos. Por otro lado, cada vez surgen más trabajos que proponen nuevos factores moleculares con valor pronóstico en el cáncer colorrectal. Dos ejemplos recientes son la elevada concentración en sangre de interleukina-6 (Belluco et al, 2000) y la sobreexpresión de erbB-3 (Kapitanovic et al, 2000).

En conclusión, resulta evidente que los factores moleculares representan un gran potencial de utilidad pronóstica en el cáncer colorrectal, pero que, por ahora, no hay evidencias suficientes que justifiquen su aplicación de forma rutinaria, excepto en el caso del CEA (antígeno carcinoembrionario) (ASCO, 1996; Compton et al, 2000). El resto de factores moleculares se considera que no mejoran la discriminación conseguida con los marcadores histológicos (estadío de Dukes y sistema TNM) (Hill, 2000). En la clasificación del College of American Pathologists la mayoría de variables que aparecen en la tabla 3 se incluyen en la categoría de factores que aún no han sido suficientemente estudiados como para determinar su valor pronóstico. Sólo se destacan

como factores prometedores la inestabilidad de microsátélites y la pérdida de heterocigosidad de 18q (Compton et al, 2000).

De todas maneras, aunque los marcadores histológicos sean, actualmente, los mejores y más utilizados, es evidente que existe una gran variación en las tasas de recurrencia y muerte dentro de cada estadio. Concretamente, estos sistemas sólo permiten predecir la recurrencia de un 50-75% de los pacientes con cáncer de colon invasivo y no metastático. Esto indica la **necesidad de factores adicionales, independientes y menos subjetivos, que ayuden a la predicción de la evolución de los tumores**. En este sentido, los marcadores basados en la cuantificación global del daño genético o en el análisis de alteraciones genéticas concretas constituyen hoy en día la mejor opción de futuro. Frente a la evidencia, cada vez más clara, de que los tumores siguen diferentes vías de progresión, las clasificaciones histológicas se muestran limitadas debido a su incapacidad para distinguir estas vías (Hill, 2000). Sin embargo los marcadores moleculares y de daño genómico son, precisamente, los parámetros que se usan para definir esas vías y, por tanto, pueden ayudar a entender mejor la progresión de los tumores. La caracterización de las alteraciones genéticas de cada vía y de su efecto en el desarrollo del cáncer permitirán una predicción más concreta y fiable de la evolución del tumor, que es esperable que se traduzca en una mejora en la selección de terapia adyuvante para los pacientes.

Tabla 3. Resumen de los principales factores moleculares con supuesto valor pronóstico en cáncer colorrectal.

Factor molecular	Alteración	Referencias		
		Mal pronóstico	Sin valor pronóstico	Buen pronóstico
INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES				
secuencias microsat.	inserciones, deleciones		Salahshor et al, 1999	Massa et al, 1999 Halling et al, 1999 Wright et al, 2000 Gryfe et al, 2000
PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIS				
18q	LOH	Kern et al, 1989 Jen et al, 1994 Martínez-López et al, 1998 Ogunbiyi et al, 1998 Lanza et al, 1998	Lauren-Puig et al, 1992 Dix et al, 1994 Cohn et al, 1997 Carethers et al, 1998	
17p	LOH	Kern et al, 1989 Lauren-Puig et al, 1992 Houlston y Tomlinson, 1997	Dix et al, 1994 Cohn et al, 1997	
3p	LOH	Iniesta et al, 2000		
4p	LOH	Arribas et al, 1999 (a) y (b)		
8p	LOH	Halling et al, 1999		
GENES SUPRESORES DE TUMORES				
p53	mutaciones	Hamelin et al, 1994 Goh et al, 1995 Houlston y Tomlinson, 1997 Kressner et al, 1999 Kahlenberg et al, 2000	Dix et al, 1994 Tortola et al, 1999a	
	sobre-expresión	Maeda et al, 1997 Buglioni et al, 1999 Schwandner et al, 2000 Bouzourene et al, 2000	Poller et al, 1997 Tollenaar et al, 1998 Kressner et al, 1999 Gallego et al, 2000	Dix et al, 1994
	Ac en suero	Shiota et al, 2000		
DCC	expresión			Shibata et al, 1996 Saito et al, 1999
ONCOGENES				
ras	mutaciones	Span et al, 1996 Houlston y Tomlinson, 1997 Andreyev et al, 1998 Cerottini et al, 1998 Pajkos et al, 2000	Kern et al, 1989 Lauren-Puig et al, 1992 Dix et al, 1994 Tortola et al, 1999a Bouzourene et al, 2000	
myc	sobre-expresión	Kakisako et al, 1999	Erismán et al, 1998	
GENES RELACIONADOS CON APOPTOSIS				
bcl-2	expresión		Tollenaar et al, 1998 Ogura et al, 1999 Bukholm et al, 2000	Buglioni et al, 1999 Schwandner et al, 2000 Manne et al, 2000
bax	expresión		Bukholm et al, 2000	Sturm et al, 1999 Ogura et al, 1999
CICLINAS E INHIBIDORES DE KINASAS DEPENDIENTES DE CICLINA				
ciclina D	sobre-expresión	Maeda et al, 1997	Palmqvist et al, 1998 Handa et al, 1999 Bukholm et al, 2000	
ciclina A	sobre-expresión	Handa et al, 1999		
p21	expresión			Bukholm et al, 2000 Zirbes et al, 2000
p27	sobre-expresión			Palmqvist et al, 1999 Yao et al, 2000 Tenjo et al, 2000

Factor molecular	Alteración	Referencias		
		Mal pronóstico	Sin valor pronóstico	Buen pronóstico
GENES RELACIONADOS CON LA SÍNTESIS DE DNA				
timidilato sintasa	sobre-expresión, actividad enzimática	Bathe et al, 1999 Edler et al, 2000 Takenoue et al, 2000 van Triest et al, 2000		
timidina fosforilasa o PD-ECGF	sobre-expresión, actividad enzimática	Takebayashi et al, 1996 van Triest et al, 2000		Saito et al, 2000
GENES SUPRESORES DE METÁSTASIS				
nm23-H1	expresión	Campo et al, 1994 Berney et al, 1998	Lindmark et al, 1996 Cheah et al, 1998 Tabuchi et al, 1999	
MARCADORES DE PROLIFERACIÓN CELULAR				
PCNA	sobre-expresión	Nakae et al, 1998	Sun et al, 1996	
AgNOR	número elevado	Ofner et al, 1995 Giufre et al, 1997 Nakae et al, 1998	Adachi et al, 1995 Nanashima et al, 1999 Eminovic-Behrem et al, 2000	
MOLECULAS DE ADHESIÓN CELULAR				
CEA	alto nivel preoperativ en sangre	Harrison et al, 1997 Taniguchi et al, 2000 Wang et al, 2000		
	Ac en suero	Albanopoulos et al, 2000		
CD44 estandar	expresión	Bhatavdekar et al, 1998	Ropponen et al, 1998	
CD44v2	expresión	Haruyama et al, 1999		
CD44v3	expresión	Ropponen et al, 1998		
CD44v5	expresión		Wielenga et al, 1998	
CD44v6	expresión, nivel suero	Wielenga et al, 1998 Ropponen et al, 1998 Yamane et al, 1999	Coppola et al, 1998 Haruyama et al, 1999	
CD44v8-10	expresión	Yamaguchi et al, 1996		
e-cadherina	expresión reducida	Dorudi et al, 1995 Mohri et al, 1997	Ilyas et al, 1997	
α -catenina	expresión reducida	Raftopoulos et al, 1998 Ropponen et al, 1999		
OTROS				
uPA	sobre-expresión	Gandolfo et al, 1996 Yang et al, 2000		
metalo-tioneína	expresión	Sutoh et al, 2000	Ofner et al, 1994 Ioachim et al, 1999	
telomerasa	alta actividad	Tatsumoto et al, 2000		

Abreviaturas: LOH (Loss Of Heterozygosity), Ac (anticuerpo), DCC (Deleted in Colorectal Cancer), Rb (retinoblastoma), PD-ECGF (Platelet Derived Endothelial Cell Growth Factor), PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), AgNOR (regiones organizadoras nucleolares teñidas con plata), CEA (antígeno carcinoembrionario), CD44v2,3,5,6,8-10 (diferentes isoformas de CD44), uPA (activador de plasminógeno tipo urocinasas).

2. PROGRESIÓN TUMORAL EN EL CÁNCER COLORRECTAL

2.1 EL CÁNCER COMO PROCESO EVOLUTIVO

2.1.1 MUTACIÓN Y SELECCIÓN

El concepto de progresión tumoral fue descrito por Foulds en 1954. Foulds definió la progresión como la adquisición en múltiples pasos (proceso *multistep*) de cambios que conferirían características malignas a las células. Aunque desde entonces se ha avanzado mucho en el conocimiento del cáncer, sobretodo a nivel molecular, el concepto de progresión *multistep* todavía sigue vigente (revisado por Heppner y Miller, 1998). **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 mismos principios de mutación y selección que gobiernan la evolución de todos los organismos. Por eso decimos que el cáncer es un proceso evolutivo** (Hellman et al, 1997). La forma más simple de explicar este concepto es la ilustrada en la figura 2. Las células pueden sufrir mutaciones debido a la exposición a carcinógenos o bien a errores en los procesos de replicación, reparación o división del DNA. Estas mutaciones somáticas son heredadas por las células hijas. La mayoría son irrelevantes para la vida de la célula o bien son deletéreas debido a la pérdida de un gen crítico para la viabilidad celular. Pero también puede ocurrir que, por casualidad, alguna de estas mutaciones confiera una ventaja de crecimiento a las células descendientes de manera que éstas proliferen más que las células vecinas 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 otra ventaja de crecimiento a ella y a su progenie. Así, por rondas sucesivas de mutación y selección, este clon en expansión podrá adquirir progresivamente las características de invasión, angiogénesis y metástasis que caracterizan a los tumores (revisada por Boland, 1999).

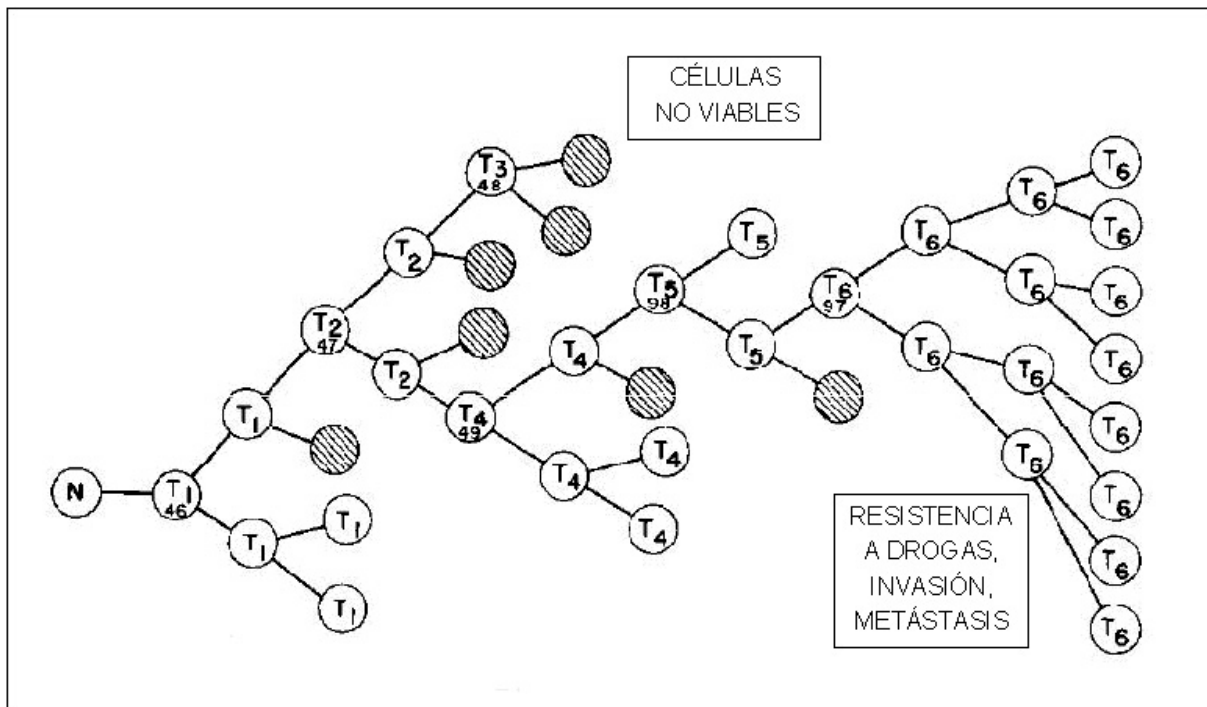


Figura 2. Modelo de progresión tumoral como proceso evolutivo (modificado de Nowell, 1976).

Dado que la causa del cáncer es la acumulación de alteraciones genéticas, durante las dos últimas décadas se han realizado grandes esfuerzos para identificar los genes diana de estas alteraciones. Estos normalmente se clasifican en dos tipos: **oncogenes y genes supresores de tumores**. Hasta la fecha se han identificado alrededor de 100 oncogenes y más de 20 genes supresores de tumores. Los oncogenes promueven el crecimiento celular y los genes supresores de tumores 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 tumores codifican para proteínas que actúan como barreras para la proliferación celular y controlan el mantenimiento de la estructura del DNA. 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 (revisado en Ross et al, 2000). Los estudios de pérdida de heterocigosidad (Loss of Heterozygosity, LOH) permiten identificar zonas del genoma en las que se dan 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 (Knudson, 1971) que la segunda copia del gen también se encuentre mutada. Es decir, el hecho de que en un tumor la mayoría de

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 en esa zona la existencia de un gen supresor que ha perdido su función por delección 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 cáncer colorrectal, en 1988 (Vogelstein et al, 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. A continuación se expone el modelo y después se analizan las alteraciones genéticas más frecuentes en cáncer colorrectal.

2.1.2 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 produce que una o 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 lugar 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 3.

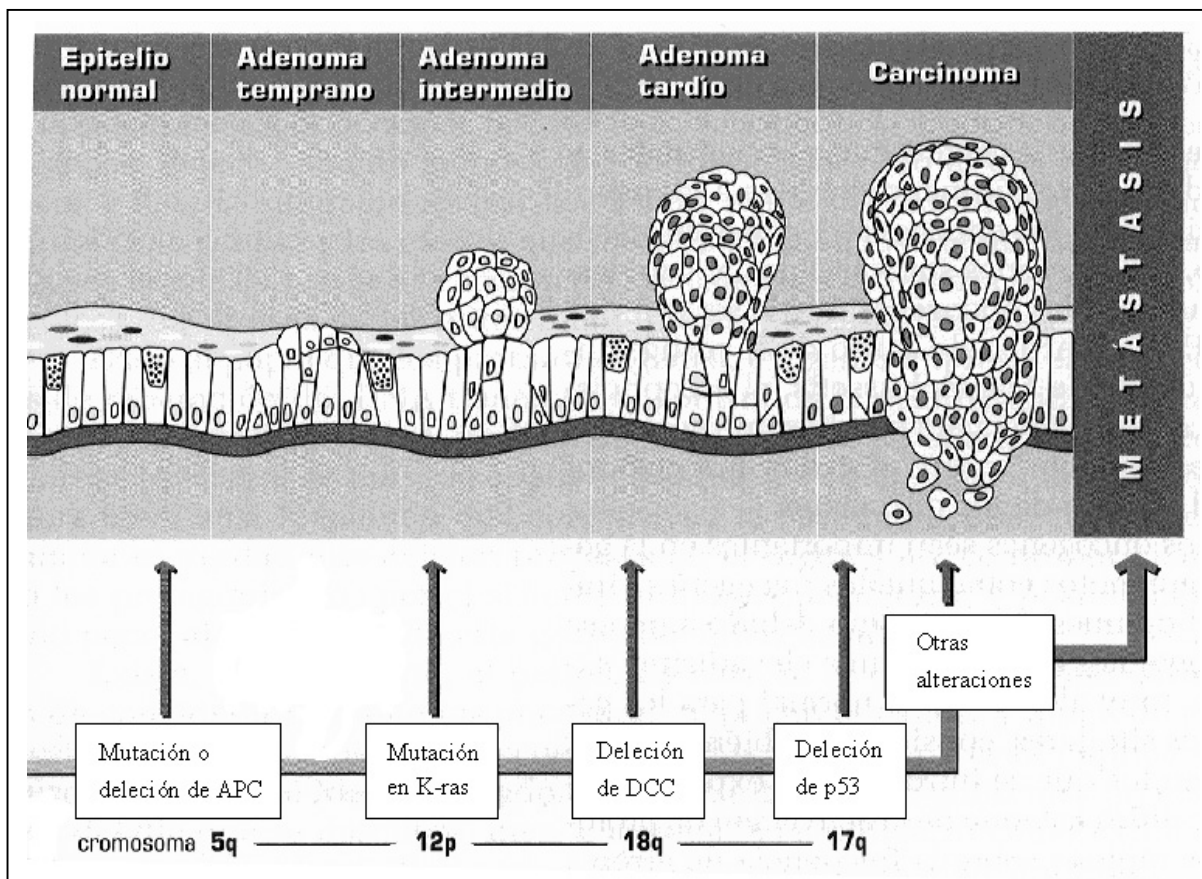


Figura 3. Modelo integrado de la progresión del carcinoma colorrectal (modificado de Muñoz, 1997). La secuencia de cambios genéticos se correlacionó con las etapas específicas de la progresión tumoral siguiendo el siguiente razonamiento. La frecuencia de mutaciones en k-ras era mucho más elevada en adenomas intermedios que en tempranos y seguía siéndolo en etapas avanzadas, por lo que se concluyó que las mutaciones en k-ras ocurrían en la transición de adenoma temprano a intermedio. De la misma manera la frecuencia de pérdidas alélicas de 17p era considerablemente más elevada en carcinomas que en tumores de estadios iniciales, sugiriendo que era una alteración que se daba de forma tardía. El mismo razonamiento sirvió para relacionar la pérdida alélica de 5q con la transición de epitelio normal a adenoma temprano y la de 18q con el paso de adenoma intermedio a tardío (Vogelstein et al, 1988). Eventualmente se pudo asociar un gen supresor a cada una de estas zonas: APC (5q), p53 (17p) y DCC (18q).

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

1. Los tumores colorrectales se originan como resultado de mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores, 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.

Diez 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 esto no implica que en un individuo se tengan que dar todas las alteraciones y, menos aún, en el orden descrito. De hecho, ninguna alteración se encontró presente en todos los tumores y menos del 10% de los carcinomas mostraron las cuatro alteraciones juntas (Shackney y Shankey, 1997). En segundo lugar, el modelo propone la existencia de una vía única de progresión tumoral, pero hoy en día sabemos que existen como mínimo dos vías alternativas (Lengauer et al, 1997) y posiblemente existen más que todavía desconocemos. 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 la clave de esta cuestión: 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 cáncer colorrectal. Por ello el desarrollo de este tema constituye un apartado independiente en esta introducción (apartado 2.2). **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.**

2.1.3 ALTERACIONES GENÉTICAS MÁS FRECUENTES EN CÁNCER COLORRECTAL

En estos diez últimos años ha aumentado mucho el conocimiento de los genes implicados en la progresión del tumor colorrectal. A pesar de que se han descubierto muchos genes nuevos, los cuatro descritos inicialmente como los más importantes siguen conservando un papel prioritario. Las últimas revisiones del tema (Laurent-Puig, 1999; Arends, 2000) subrayan la gran complejidad de sus funciones y el elevado grado de interacción entre ellas. Brevemente se exponen las principales características de cada uno de ellos:

APC: 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. Mutaciones inactivadoras de APC aumentan el nivel 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 et al, 1999). Además β -catenina se asocia a la porción intracelular de cadherina, una proteína transmembrana. La porción extracelular se une a otra cadherina que protuye 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 permitan a las células epiteliales del colon iniciar una proliferación descontrolada (Boland, 1997).

k-ras: aproximadamente el 40% de los carcinomas colorrectales presentan mutación en k-ras. 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 tras 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 recientemente se han publicado otras funciones de k-ras. k-ras hiperactivada puede fosforilar pro-caspasa-9, inhibiendo la apoptosis inducida por el citocromo-c (Arends, 2000).

DCC, SMAD2, SMAD4: las pérdidas alélicas de 18q ocurren en más de un 70% de los cánceres colorrectales (Vogelstein et al, 1988). El primer gen supresor de tumores 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 cáncer colorrectal no es clara y, además, los resultados respecto a las alteraciones de DCC en tumores colorrectales son contradictorios (Laurent-Puig et al, 1999). Paralelamente dos nuevos genes supresores de tumores se descubrieron en 18q: SMAD2 y SMAD4. La prevalencia de mutaciones en cáncer colorrectal son 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 interaccionando específicamente con proteínas de unión al DNA. 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 et al, 1999; Arends, 2000).

p53: 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 cáncer colorrectal del 50% (Greenblatt et al, 1994). 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 (Proliferating Cell Nuclear Antigen) que es una unidad de la DNA polimerasa δ . De esta manera se evita la división de la célula hasta que el daño en el DNA haya sido reparado y así se impide la generación de células hijas con mutaciones. Si el daño en el DNA 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 pueden 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 p53 son de cambio de sentido (*missense*), las cuales producen proteínas anormales que tienen alteradas alguna de sus capacidades, como la de unión al DNA, 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) y por tanto que aumente su concentración, de manera que puede ser detectada por inmunohistoquímica. Sin embargo la asociación entre inmunohistoquímica y mutaciones

en p53 es variable y no todas las mutaciones resultan en estabilización de la proteína, ni toda la proteína estabilizada refleja una mutación del gen (Wilson et al, 1997). Por otra parte, múltiples experimentos demuestran que las mutaciones en p53 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 (Laurent-Puig et al, 1999).

2.2 INESTABILIDAD GENÓMICA

2.2.1 EL MOTOR DE 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 sobretodo a nivel citogenético. Esta y otras observaciones llevaron a Nowell en 1976 a proponer su teoría de la evolución clonal. Esta teoría no es otra que la expuesta en el apartado 2.1.1 y en la figura 2, pero introduciendo el concepto de inestabilidad genómica. Nowell no sólo propuso que la generación de un cáncer es el resultado de un proceso de mutación y selección de los clones más agresivos, sino que esto es posible gracias a **la existencia de un mecanismo de inestabilidad genómica que es el responsable de la 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 (Nowell, 1976). La esencia de su hipótesis es que si para el desarrollo del cáncer son necesarias múltiples alteraciones genéticas, entonces un aumento en la tasa de producción de esas alteraciones producirá 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. También hipotetizó que la existencia de 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.

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 da en los tumores. Por ello postuló la existencia del **'fenotipo mutador'**, es decir, **una alteración que ocurre temprano en el proceso tumoral y que produce un aumento de la tasa de mutación de las células de manera que facilita 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 estabilidad genómica. Entre ellos se encuentran genes implicados en la replicación y la reparación del DNA, 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, de manera que como consecuencia podrían promover la transformación de una célula normal en cancerosa (Cheng y Loeb, 1993).

El problema de seleccionar la inestabilidad

Uno de los problemas con los que se encuentra la teoría de la inestabilidad genómica es explicar por qué se seleccionan las mutaciones en los genes de estabilidad, las cuales no representan ninguna ventaja directa para las células. De acuerdo con la teoría propuesta, las mutaciones que confieren ventajas concretas del crecimiento 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 tener en cuenta que niveles elevados de inestabilidad 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 et al, 1999). Sin embargo, para que la progresión tumoral sea posible es necesario conseguir un cierto nivel de inestabilidad 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 colección enorme de subclones con un elevado potencial de alteraciones que les permite afrontar las presiones de selección** (Cahill et al, 1999).

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'. Recientemente Lengauer y colaboradores han introducido los conceptos de 'estado' y 'tasa' para aclarar ambos términos (Lengauer et al, 1998). Es un hecho que los tumores contienen múltiples alteraciones genéticas (daño genómico), tanto a nivel de secuencia de DNA 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 porque estar causado necesariamente por inestabilidad genómica** (Lengauer et al,1998). Las mutaciones que conducen a la neoplasia pueden estar causadas por factores exógenos (carcinógenos, radiación) o por factores endógenos resultantes de procesos celulares como reacciones de depurinación o deaminación, por daño causado por radicales de oxígeno libres o por errores de la polimerasa (Coleman y Tsongalis, 1999). Por tanto, en teoría, no se puede asumir como una generalidad que la medida de las alteraciones genómicas presentes en los tumores sea una medida directa de la inestabilidad genómica (Cahill et al, 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 de que estas alteraciones son consecuencia de la inestabilidad genómica. Por tanto **la medida global del daño genómico presente en el tumor se puede utilizar como una estima representativa de la inestabilidad genómica subyacente.**

Controversias acerca de la inestabilidad genómica

A pesar del atractivo y la coherencia que presenta la teoría de la inestabilidad genómica, ésta actualmente no estaría tan extendida de no ser 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 et al, 1993). Este tema se desarrollará ampliamente en el siguiente apartado, pero vale la pena destacar aquí que a pesar de la clara evidencia que representa respecto a la existencia de la inestabilidad genómica, ésta sigue siendo todavía controvertida. Una de las críticas más duras a esta teoría fue la realizada en 1996 por Tomlinson y colaboradores. Basándose en modelos matemáticos comprobaron no había necesidad de una tasa aumentada de mutación para causar tumorigénesis, ya que con la selección era suficiente. 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 (Tomlinson et al, 1996). Diferentes estudios han medido la tasa de mutación en células normales y tumorales y han encontrado resultados contradictorios, por lo que en una de las últimas revisiones del tema (Coleman y Tsongalis, 1999) se ha concluido que algunos tumores podrían expresar un fenotipo mutador mientras que otros podrían conseguir múltiples mutaciones en ausencia de un aumento apreciable en la frecuencia de mutación. En la misma línea se encuentran los experimentos que pretenden explicar la conversión de una célula normal en tumoral por la alteración de uno o varios genes. Recientemente se ha publicado un trabajo que muestra que esto se consigue por la expresión ectópica de telomerasa en combinación con dos oncogenes (Hahn et al, 1999). Según esto el planteamiento sobre la existencia de inestabilidad genómica parece innecesaria 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, pero para que éste se de por completo es necesaria la intervención de inestabilidad genética en forma de aneuploidía (Duesberg et al, 1999). Otro estudio ha estimado en 11000 el número de alteraciones genéticas presentes en una célula tumoral y además ha mostrado que en pólipos el número es muy similar. 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 (Stoler et al, 1999). Esta hipótesis es la más aceptada actualmente, pero la controversia en torno al tema pone de manifiesto la necesidad de encontrar resultados concluyentes que, como la inestabilidad de microsatélites, constituyan pruebas inequívocas y ayuden a reconciliar las diferentes observaciones.

Mientras que el papel de la inestabilidad genómica se sigue debatiendo (Cahill et al, 1999), por otro lado se perfila de forma cada vez más clara la existencia de diferentes vías de progresión tumoral. Aunque la única bien establecida es la de 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 (Lengauer et al, 1997). A continuación se exponen ambas y se analiza el papel de la inestabilidad en cada una de ellas.

2.2.2 INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

La primera prueba concluyente de la existencia de un fenotipo mutador fue encontrada en 1992 mediante el análisis por AP-PCR 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 et al, 1992; Ionov et al, 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. Subsecuentes estudios 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 et al, 1993; Thibodeau et al, 1993; Perucho et al, 1994). Al mismo tiempo también se descubrió la presencia de MSI en los cánceres de pacientes con HNPCC (Aaltonen et al, 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 múltiples estudios han encontrado 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 DNA conocido como MMR (mismatch repair) system. Este sistema se descubrió primero en bacterias y levaduras, lo cual facilitó la comprensión del sistema 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 MutL. Uno o más de estos genes se encuentran mutados en la línea germinal de la mayoría de individuos con HNPCC y se han encontrado mutaciones somáticas de estos genes 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 DNA en una línea celular deficiente para ese gen produce la recuperación de la estabilidad de microsatélites (Arzimanoglou et al, 1998). Sin embargo, en muchos casos con MSI no se ha podido identificar ninguna alteración en los genes del sistema MMR, lo que sugiere que existen genes de reparación adicionales o mecanismos alternativos de producción de MSI. Estudios recientes han 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 en 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 DNA 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 la pauta de lectura** que conlleva la creación de una proteína truncada y, 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 estará favoreciendo de forma indirecta la aparición de un cáncer.** Son múltiples los genes cuya función se relaciona con el control del crecimiento y la reparación del DNA y que contienen secuencias microsatélites susceptibles de sufrir mutaciones de cambio de pauta de lectura. Algunos de estos genes que se han encontrado mutados en los tumores con MSI son: TGF β RII (Receptor tipo II del Transforming Growth Factor β), APC, BAX, IGF1IR (Receptor tipo II del Insulin-like Growth Factor), hMSH3 y hMSH6 (Arzimanoglou et al, 1998).

Para que un fenotipo mutador favorezca la progresión tumoral es necesario que ocurra en las etapas iniciales del desarrollo del tumor. Varias líneas de evidencia demuestran que en el caso de la inestabilidad de microsatélites se da esta condición. En primer lugar, se han observado mutaciones clonales en secuencias microsatélite en todas las áreas neoplásicas de tumores de un mismo paciente, incluyendo adenomas. En segundo lugar, se ha encontrado presencia de inestabilidad de microsatélites en foci de criptas aberrantes, que son lesiones microscópicas consideradas el precursor más temprano del cáncer de colon. Además también se ha detectado inestabilidad de microsatélites en enfermedades de inflamación crónica 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 como la baja incidencia de mutaciones en k-ras y p53, el fenotipo pobremente diferenciado, la baja incidencia de metástasis y la 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 et al, 1993).

2.2.3 INESTABILIDAD CROMOSÓMICA

2.2.3.1 ALTERACIONES CROMOSÓMICAS E INESTABILIDAD

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

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

El *screening* de las alteraciones a nivel de secuencia de DNA es difícil debido a la extensión del genoma y al alto grado de resolución requerido para detectarlas. Por eso, aparte de la inestabilidad de microsatélites, se conoce muy poco acerca de las mutaciones puntuales que afectan a las células tumorales. Sin embargo, las alteraciones cromosómicas son muy fácilmente detectables a nivel citogenético y, de hecho, desde hace más de un siglo se conoce su elevada frecuencia en células tumorales (Hansemann, 1890; Boveri, 1914). Además, se han encontrado múltiples evidencias que demuestran que los genomas de las células tumorales son más susceptibles que los de las células normales a alteraciones cromosómicas como roturas, intercambio de cromátidas hermanas, no disyunciones y cambios en la ploidía. 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). A este tipo de inestabilidad genómica la llamaremos **inestabilidad cromosómica**. Desafortunadamente el término 'inestabilidad cromosómica' ha sido utilizado de forma equívoca para designar únicamente las alteraciones cromosómicas de tipo numérico (Lengauer et al, 1997), lo que ha propiciado una gran confusión respecto al tipo de alteraciones que se asocian con la inestabilidad cromosómica. Como veremos a continuación 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.

Para llevar a cabo un estudio que pretenda profundizar en la naturaleza de la inestabilidad cromosómica es imprescindible conocer cómo son las alteraciones cromosómicas que se encuentran en los tumores. En concreto **en el cáncer colorrectal**, igual que en la mayoría de tumores sólidos, existen múltiples alteraciones cromosómicas que no son específicas de la enfermedad y que dificultan el descubrimiento de aquellas que son importantes (Johansson et al, 1996). Sin embargo, estudios citogenéticos de tumores colorrectales (Muleris et al, 1990b) han demostrado que existen algunas alteraciones que son recurrentes como las reorganizaciones del cromosoma 17, que conducen a la pérdida de su brazo corto, y las pérdidas del cromosoma 18. Aparte de algunas otras alteraciones recurrentes menos frecuentes, **existe una gran variabilidad en cuanto a las alteraciones cromosómicas que presentan los tumores** y se pueden encontrar tanto monosomías, trisomías y poliploidías como deleciones, duplicaciones y otros tipos de alteraciones estructurales. A pesar de la variabilidad, el análisis detallado de estas alteraciones ha permitido clasificar los tumores colorrectales en tres tipos distintos que corresponden a tres vías concretas de progresión tumoral (Dutrillaux, 1995) y que se explican detalladamente más adelante (apartado 2.2.4.2 de Introducción).

A nivel citogenético se conocen bien algunos de los posibles mecanismos que originan los diferentes tipos de alteraciones cromosómicas. En concreto, la aneuploidía se debe a no disyunción (las cromátidas hermanas no se separan en mitosis y ambas van a parar a la misma células hija) o a retraso anafásico (una de las cromátidas se retrasa en su movimiento durante la anafase y no se incorpora en la célula correspondiente). La poliploidía se origina por endoreduplicación (dos rondas consecutivas de síntesis de DNA sin pasar por mitosis). Y las alteraciones de tipo estructural se originan normalmente por mecanismos que conllevan rotura de la cadena de DNA y errores en los sistemas de reparación (Clusellas, 1995). 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 ocurren, 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. Desgraciadamente la mayoría de estudios se han limitado al estudio de la aneuploidía, la cual representa sólo una parte de todas las alteraciones estructurales presentes en los tumores.

2.2.3.2 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 et al, 1998). Sin embargo, dos experimentos independientes con líneas celulares han demostrado que **existe una asociación entre aneuploidía e inestabilidad cromosómica numérica** (Lengauer et al, 1997; Duesberg et al, 1998). Paradójicamente las explicaciones que se han dado a estos resultados han sido totalmente contrapuestas en ambos grupos, lo cual advierte de la enorme precaución con la que se tienen que interpretar las dos hipótesis que se exponen a continuación.

Los primeros en demostrar la idea de inestabilidad cromosómica numérica fueron el grupo de Lengauer y colaboradores al comprobar que de las 8 líneas celulares colorrectales que estudiaron sólo las 4 que eran aneuploides presentaban una tasa de ganancia o pérdida cromosómica elevada, la cual se podía interpretar como una 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 genómica subyacente causada posiblemente por la mutación de algún gen implicado en la segregación cromosómica (Lengauer et al, 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 rápido cambiaba éste a lo largo de las generaciones. Es decir, la inestabilidad cromosómica que sufrían las células era proporcional a su grado de aneuploidía. Según ellos esto confirmaba su hipótesis de trabajo que consistía en afirmar que la aneuploidía es la causa de la inestabilidad genética. Esta hipótesis se basa en que para que la segregación simétrica de los cromosomas sea perfecta es necesario tener exactamente dos copias de los genes de mitosis. Si existe aneuploidía y ésta afecta a cromosomas que contienen genes implicados en mitosis conllevará una segregación aberrante y por tanto una desestabilización del cariotipo que irá en aumento a medida

que las células sean cada vez más aneuploides (Duesberg et al, 1998). Las líneas celulares usadas por Lengauer parece ser que también se adaptan a esta hipótesis, ya que a medida que aumenta la aneuploidía aumenta la inestabilidad cariotípica de las células (Duesberg et al, 1998).

Mucho antes de que el grupo de Duesberg llevara a cabo estos experimentos, Holliday (1989) ya había propuesto una teoría muy 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 que ocurran errores posteriores (falta de control en la segregación cromosómica y nuevas aneuploidías) (Holliday, 1989). Diez años después el grupo de Duesberg resume su hipótesis de la siguiente manera: **primera etapa, un carcinógeno o la mutación de un gen genera aneuploidía; y segunda etapa, la aneuploidía desestabiliza el cariotipo e inicia una evolución autocatalítica** en la que se generan cariotipos preneoplásicos y eventualmente neoplásicos (Li et al, 2000).

2.2.3.3 INESTABILIDAD CROMOSÓMICA ESTRUCTURAL

Al igual que la aneuploidía, las alteraciones cromosómicas estructurales no son, por sí mismas, ninguna evidencia de la existencia de una inestabilidad subyacente. Sin embargo, su presencia en las células de pacientes con **síndromes de rotura o fragilidad cromosómica** constituyen un dato inequívoco de que **la existencia de un genoma inestable puede 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 les produce un nivel constitucional de rotura cromosómica elevado (en el caso del xeroderma pigmentosum no es constitucional sino inducido por la exposición a luz ultravioleta) y presentan un alto riesgo de desarrollo de cánceres (Heim et al, 1989). 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.

En cuanto a mecanismos de producción de inestabilidad cromosómica, recientemente se ha sugerido que **los ciclos de rotura-fusión-puente (breakage-fusion-bridge, BFB) pueden constituir un mecanismo de generación de heterogeneidad intratumoral** (Gisselsson et al, 2000). Estos ciclos ocurren si en la mitosis se encuentran presentes cromosomas en anillo, cromosomas dicéntricos o cromosomas implicados en asociaciones teloméricas. Estos cromosomas aberrantes forman puentes en la anafase que se acaban rompiendo y hacen que los extremos sueltos se reúnan y reorganicen originando nuevas variantes en las células hijas de estos cromosomas anómalos. 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 cromosómicas estructurales. Los autores de este trabajo han demostrado que el mecanismo BFB se da con elevada frecuencia en los tumores que muestran abundantes cambios estructurales no específicos y que, además, estos tumores muestran una tasa disminuida de eliminación de las células aberrantes que podría estar relacionada con las mutaciones en p53. Es decir, 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.

2.2.3.4 CAUSAS GENÉTICAS DE LA INESTABILIDAD CROMOSÓMICA

Aparte de las teorías expuestas poco más se conoce acerca de la inestabilidad cromosómica numérica o estructural. Sin embargo se postula que **sus causas podrían estar relacionadas con la presencia conjunta de daño en el DNA** (errores de replicación, fallos en mitosis, carcinógenos, etc.) **y alteraciones en los checkpoints de ciclo celular**. Los *checkpoints* son puntos de control que aseguran el orden de los procesos dentro del ciclo e integran la reparación del DNA con la progresión de las diferentes etapas (Hartwell y Kastan, 1994). Los *checkpoints* se componen de complejas vías de transducción de señales de manera que mutaciones en cualquiera de sus componentes pueden conducir, en presencia de alguna alteración como daño en el DNA, a una progresión aberrante del ciclo y, consecuentemente, a inestabilidad genómica (Funk, 1999). Existen como mínimo tres *checkpoints* que detectan errores y paran el ciclo: los *checkpoints* de daño genómico en las transiciones G1-S y G2-M y el *checkpoint* de mitosis (Muñoz, 1997). Por motivos de simplificación, antes de analizar cada *checkpoint* por separado revisaremos el papel de p53 en la producción de inestabilidad cromosómica ya que sus funciones son tan amplias que participa en todos ellos.

Como ya se ha explicado anteriormente la existencia de daño genómico produce un aumento de **p53** que para el ciclo celular en G1, en G2 o en mitosis, si el daño es reparable, o induce apoptosis, si no lo es (Ko y Prives, 1996). Por tanto es lógico que las mutaciones de p53 tengan efectos tan diversos en la estabilidad del genoma y que se hayan propuesto como **causa de alteraciones cromosómicas tanto numéricas como estructurales**. En cuanto a las alteraciones cromosómicas numéricas, las células en cultivo con p53 inactivada presentan generalmente elevada aneuploidía y las células deficientes en p53 presentan husos mitóticos anormales y paran el ciclo en G2-M. Por otra parte la inactivación de p53 produce la presencia de múltiples centrosomas, lo cual normalmente se asocia con poliploidías. Sin embargo, varias líneas celulares con mutaciones en p53 son diploides y cromosómicamente estables. Además la aneuploidía y la inestabilidad cromosómica aparecen temprano en la tumorigénesis, mientras que las mutaciones en p53 se asocian con estadios tardíos. Esto indica que, aunque las mutaciones en p53 intensifican la inestabilidad cromosómica numérica, parece improbable que sean su causa (Lengauer et al, 1998). En cuanto a las alteraciones cromosómicas estructurales, la deficiencia en p53 aumenta la frecuencia de roturas cromosómicas en células en división (Agapova et al, 1996) lo cual hace a los cromosomas susceptibles de aberraciones estructurales. Además la inactivación de p53 resulta en elevadas tasas de recombinación homóloga (Mekeel et al, 1997) que podría conducir a la presencia de translocaciones. Por último en células con p53 inactivada la amplificación génica ocurre a elevadas frecuencias (Yin et al, 1992; Livingstone et al, 1992).

Aparte de p53, alteraciones en otros genes clásicos implicados en el desarrollo de tumores colorrectales, como son **k-ras** y **c-myc**, también han sido propuestos como causantes de la inestabilidad cromosómica. Se ha comprobado que su introducción en células produce un aumento de las aberraciones genómicas. Sin embargo tanto las mutaciones de p53 como las de k-ras y c-myc se han observado en tumores con inestabilidad de microsatélites, los cuales siguen una vía de progresión diferente y no son aneuploides. Esto indica que, aunque estos genes puedan tener relación con las alteraciones cromosómicas, existen otros que son los responsables del inicio de la inestabilidad cromosómica (Cahill et al, 1999).

El **checkpoint de mitosis** asegura que las cromátidas no se separen hasta que los cromosomas están alineados adecuadamente en el huso mitótico y evita la iniciación de un nuevo ciclo (endorreduplicación) si la mitosis no se ha completado en el ciclo anterior (Hartwell y Kastan, 1994). Dos líneas de evidencia indican que las mutaciones en genes

que participan en este *checkpoint* podrían ser las responsables de la inestabilidad cromosómica. En primer lugar, algunas líneas aneuploides en presencia de agentes disruptores del huso mitótico no paran el ciclo en metafase sino que salen prematuramente de la mitosis y empiezan otra ronda de síntesis de DNA (Cahill et al, 1998). En segundo lugar, en varias líneas celulares colorrectales con inestabilidad cromosómica numérica se han detectado mutaciones en el gen hBub1, que participa en el *checkpoint* mitótico, supuestamente impidiendo el inicio de la mitosis hasta que los cromosomas están adecuadamente unidos al huso mitótico (Cahill et al, 1998). Al gen MAD2 también se le ha atribuido la misma función y se ha descrito que su pérdida produce anomalías en la segregación cromosómica y predispone a la aparición de cáncer (Michel et al, 2001). De todas maneras el papel de los defectos del *checkpoint* mitótico en el desarrollo de aneuploidía se ha visto cuestionado por estudios recientes que, al analizar diferentes tumores, no encuentran mutaciones ni en Bub1 ni en otros genes de este *checkpoint*. Sin embargo son muchas las proteínas que intervienen en la segregación cromosómica y la alteración de cualquiera de ellas podría contribuir a la formación de aneuploidía (Loeb y Loeb, 2000).

Como mínimo hay dos **checkpoints de daño genómico**: uno en la transición G1-S y otro en la transición G2-M. El primero evita que la célula replique DNA dañado y el segundo impide que se de la mitosis si los cromosomas no están intactos. Varias evidencias experimentales sugieren que alteraciones en estos *checkpoints* pueden conducir a inestabilidad cromosómica y a la evolución de tumores. Entre ellas cabe destacar, por una parte, las infecciones de algunos virus que se asocian al desarrollo de cáncer y cuyos productos inactivan proteínas de estos *checkpoints* como p53 y Rb y, por otra, las alteraciones descubiertas en pacientes con ataxia telangiectasia (uno de los síndromes de rotura cromosómica que predispone a cáncer) que afectan al gen ATM (ataxia telangiectasia mutated), el cual es necesario para la inducción óptima de p53 tras la exposición a radiaciones ionizantes (Hartwell y Kastan, 1994). Aparte de p53, Rb y ATM otros genes implicados en el *checkpoint* de daño genómico que se han asociado con tumorigénesis son ATR (gen relacionado con ATM), BRCA1, BRCA2 y ciclina E (Spruck et al, 1999). La inestabilidad cromosómica que resulta de errores en este *checkpoint* se asocia con una recombinación mitótica aumentada y con segregación cromosómica aberrante, de manera que esta última no sólo se origina, como pudiera parecer, por errores del *checkpoint* mitótico. Los cromosomas que contienen DNA dañado son susceptibles de alteraciones estructurales debido a las roturas en cadena simple o doble. Pero además estos cromosomas pueden segregarse inadecuadamente porque las

cromátidas hermanas estén todavía conectadas por DNA o uniones DNA-proteína (Lengauer et al, 1998).

Tanto las mitosis multipolares como un número anormal de **centrosomas** se han observado frecuentemente en cánceres, entre ellos el de colon. La causa del elevado número de centrosomas se desconoce, pero un candidato es la kinasa aurora2/STK15, la cual afecta al número de centrosomas y a la segregación cromosómica cuando se expresa exógenamente en células de mamíferos y, además, se ha encontrado altamente expresada y ocasionalmente amplificada en cánceres humanos. La kinasa asociada a centrosoma PLK1 tiene propiedades similares y también está altamente expresada en algunos cánceres. Como se ha dicho anteriormente, p53 también constituye otro gen candidato (Lengauer et al, 1998). Experimentos recientes han mostrado que probablemente lo que dirige la duplicación de los centrosomas es el complejo Cdk2-ciclina E en unión con otras proteínas que se encuentran expresadas en pacientes con cáncer y cuya expresión en ratón produce un número extra de centrosomas (Pennisi, 1999).

A pesar de estas pistas, las bases moleculares de la inestabilidad cromosómica están aún por definir en la mayoría de cánceres humanos. **El hecho de que alteraciones en tantos genes puedan conducir a inestabilidad cromosómica sugiere que probablemente ésta tendrá un origen heterogéneo**, con muchos genes, cada uno de ellos implicado en una pequeña proporción de casos (Lengauer et al, 1998). Precisamente la gran variación de genes que pueden dar lugar a inestabilidad cromosómica puede ser la causa de que ésta sea mucho más frecuente que la inestabilidad de microsatélites (Loeb y Loeb, 1999).

2.2.4 VÍAS DE PROGRESIÓN EN CÁNCER COLORRECTAL

2.2.4.1 VÍAS BASADAS EN ESTUDIOS MOLECULARES

En función de los estudios moleculares llevados a cabo hasta el momento, se consideran **dos vías preferenciales de progresión tumoral en el cáncer colorrectal: la vía de la inestabilidad de microsatélites y la vía de la inestabilidad cromosómica**. Aunque se puede dar cierto solapamiento entre ellas normalmente esto no ocurre, lo que sugiere que las dos formas de inestabilidad aumentan la tasa de mutación suficientemente como para producir tumorigénesis (Loeb y Loeb, 1999). El análisis detallado de ambas vías de

progresión tumoral y su posterior comparación ha permitido la observación de que, **aunque por diferentes caminos, las dos conllevan la alteración de los mecanismos cruciales de control del 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 microsatélites la inactivación de este sistema se da por mutaciones intragénicas de ambos alelos de APC debida a la presencia de secuencias microsatélite en su zona 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 et al, 1999).

Múltiples estudios han intentado caracterizar ambas vías de progresión en diferentes series de tumores colorrectales. Mientras que en algunos la definición de los dos grupos se basaba en el único criterio de presencia o ausencia de inestabilidad de microsatélites (considerando que el grupo con inestabilidad cromosómica lo constituían los tumores sin inestabilidad de microsatélites) (Breivik et al, 1997; Olschwang et al, 1997), en otros se intentaba medir el grado de inestabilidad cromosómica mediante técnicas como el análisis de pérdida de heterocigosidad (Tomlison et al, 1998), la citometría de flujo (Yao et al, 1999) y la hibridación genómica comparada (Georgiades et al, 1999). La heterogeneidad de las diferentes aproximaciones se ve reflejada en la variabilidad de los resultados obtenidos. Mientras que algunos encuentran que los genes alterados en tumores MSI+ y MSI- podrían ser más diferentes de lo que previamente se pensaba (Olschwang et al, 1997), otros afirman que existe un gran solapamiento en el espectro de mutaciones (Tomlison et al, 1998). También hay estudios que sugieren que las diferentes vías de progresión están condicionadas por factores relacionados con el sexo (Breivik et al, 1997) o la edad (Ionov et al, 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 por ahora desconocida o sin inestabilidad (Yao et al, 1999; Georgiades et al, 1999; Martín et al, 1999).

2.2.4.2 VÍAS BASADAS EN ESTUDIOS CITOGENÉTICOS

Ante la falta de consenso de los criterios moleculares para la definición de las vías de progresión de los tumores colorrectales, encontramos una propuesta atractiva en los estudios citogenéticos llevados a cabo por el grupo de Dutrillaux. Hace más de diez años que estos autores definieron 3 patrones de progresión tumoral colorrectal basándose en la comparación de metafases de tumores individuales y reconstruyendo su evolución clonal. Los tres patrones son: **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; **tipo trisómico (TT)** (20-25% de los tumores), caracterizado por la presencia de trisomías y la ausencia de poliploidías y de alteraciones estructurales; y **tipo normal (NT)** (5-7% de los tumores), con cariotipo estable (Muleris et al, 1988; Muleris et al, 1990b). Se podría pensar que los cariotipos normales pertenecen a células no tumorales, pero el carácter maligno de estos tumores se demostró al poder ser xenografiados 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 endorreducción lleva a la formación de subclones hipotetraploides (Dutrillaux, 1995). Por ello se distinguieron los subtipos monosómico *near* diploide y monosómico poliploide, pero como no se encontraron 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 en 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 et al, 1995).

2.2.4.3 ¿MÚLTIPLES VÍAS DE PROGRESIÓN?

Nuevos experimentos siguen aportando datos que aumentan todavía más la complejidad de la interpretación de la progresión tumoral colorrectal. **Recientemente se ha propuesto la existencia de un tipo de tumor colorrectal que se originaría debido a mutaciones de las 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 cáncer. 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 fenómeno se le conoce como defecto *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 la inactivación de la segunda copia de estos genes se da en las células estromales o en las epiteliales y, de ser en las primeras, se tendrá que elucidar cuál es el mecanismo de esta nueva alternativa de progresión tumoral (Kinzler y Vogelstein, 1998).

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 de los que disponemos hoy día 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 ideas que aparecen más claras tras los últimos años de investigación 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 la evolución progresiva del cáncer colorrectal, está siendo sustituida por propuestas más concretas que definen diferentes modelos de progresión para diferentes grupos de tumores. **El estudio del daño genómico presente en los tumores puede ayudar a identificar los diferentes tipos de inestabilidad genómica que intervienen y a caracterizar posibles vías de progresión tumoral.**