

RESULTADOS

1. PLOIDÍA EN EL CÁNCER COLORRECTAL

Tras el análisis de cada una de las muestras el citómetro de flujo proporciona unos archivos *list mode* que están compuestos por histogramas y datos que permiten el análisis de la ploidía de la muestra así como la caracterización del ciclo celular y otros parámetros celulares. Los histogramas que aparecen en estos archivos pueden ser seleccionados por el usuario en función de los objetivos del estudio. En nuestro caso los histogramas analizados fueron los que se muestran en la figura 8.

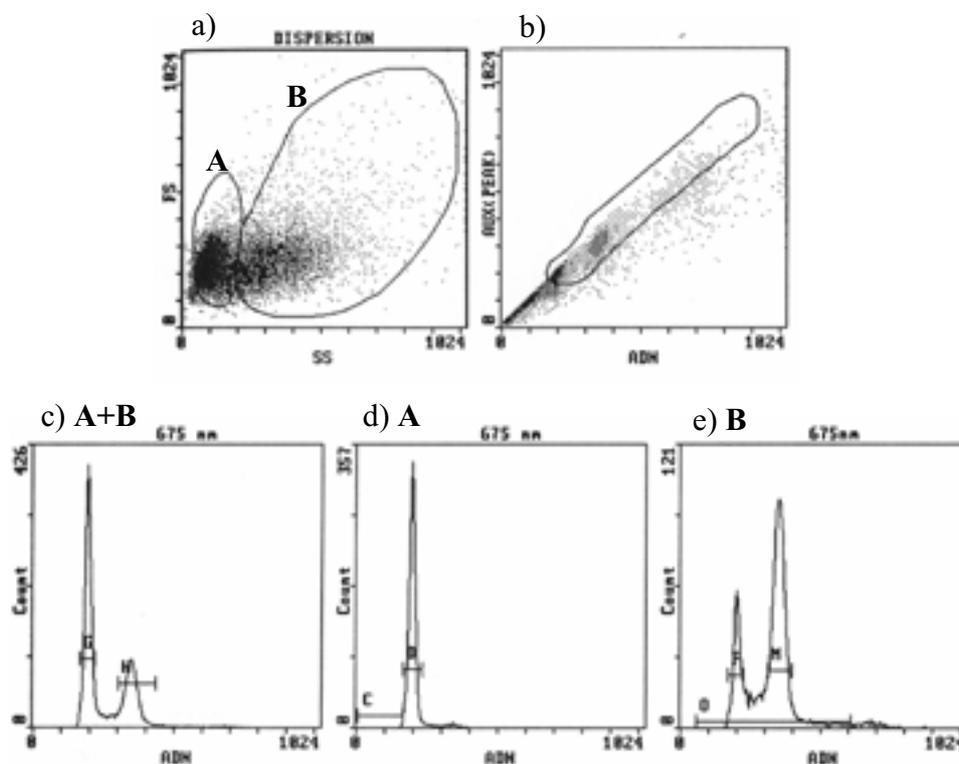


Figura 8. Histogramas utilizados en el análisis de la citometría de flujo. a) Distribución de puntos en función de las señales de luz FS y SS, que miden, respectivamente, tamaño y granularidad. Estas características celulares permiten separar la población de linfocitos infiltrantes (A) de la población de células tumorales (B). b) Relación entre altura (abcisas) y amplitud (ordenadas) de la señal de fluorescencia para cada núcleo. La zona seleccionada incluye los núcleos sujetos a estudio. Los puntos situados debajo de la diagonal corresponden a dobletes de núcleos y los que se encuentran más cerca del origen de coordenadas indican la existencia de restos celulares. c) d) y e) Histogramas que muestran el contenido de DNA de la población total (A+B), de linfocitos infiltrantes (A) y de células tumorales (B), respectivamente. Consisten en distribuciones de frecuencias en las que se indica el número de células (ordenadas) existentes para una determinada intensidad de fluorescencia (abcisas). El DNA index (DI) se calcula dividiendo el valor del pico de DNA aneuploide observado en el histograma e) entre el valor del pico de DNA diploide observado en el histograma d).

Ya se ha explicado en la sección de Materiales y Métodos que en este estudio el análisis de la ploidía se llevó a cabo mediante el cálculo del DI y de dos nuevos parámetros que tenían en cuenta la proporción de células aneuploides presentes en los tumores: el Cell Index (CI) y el Aneuploidy Index (AI). Ya que para el cálculo de estos parámetros es necesario poseer la máxima precisión en la determinación del porcentaje de células presentes en cada pico, los resultados obtenidos en los archivos *list mode* se procesaron posteriormente con el programa Mod Fit, el cual proporciona una mayor fiabilidad gracias al uso de modelos matemáticos. La figura 9 muestra un ejemplo de los datos producidos por el programa y de su posterior aplicación a los cálculos del CI y el AI. El tumor del ejemplo es triploide (DI=1.5), pero el pico de células aneuploides en G0/G1 sólo representa el 50% de todas las células tumorales en G0/G1 presentes en el tumor (CI=0.5). Si corregimos el grado de aneuploidía del tumor por el porcentaje de células que lo presentan, éste se reduce en proporción (AI=1.25). De esta manera, **la gran variabilidad existente entre tumores respecto a la cantidad de células aneuploides que presentan se ve reflejada en una modificación proporcional sobre su grado de aneuploidía.**

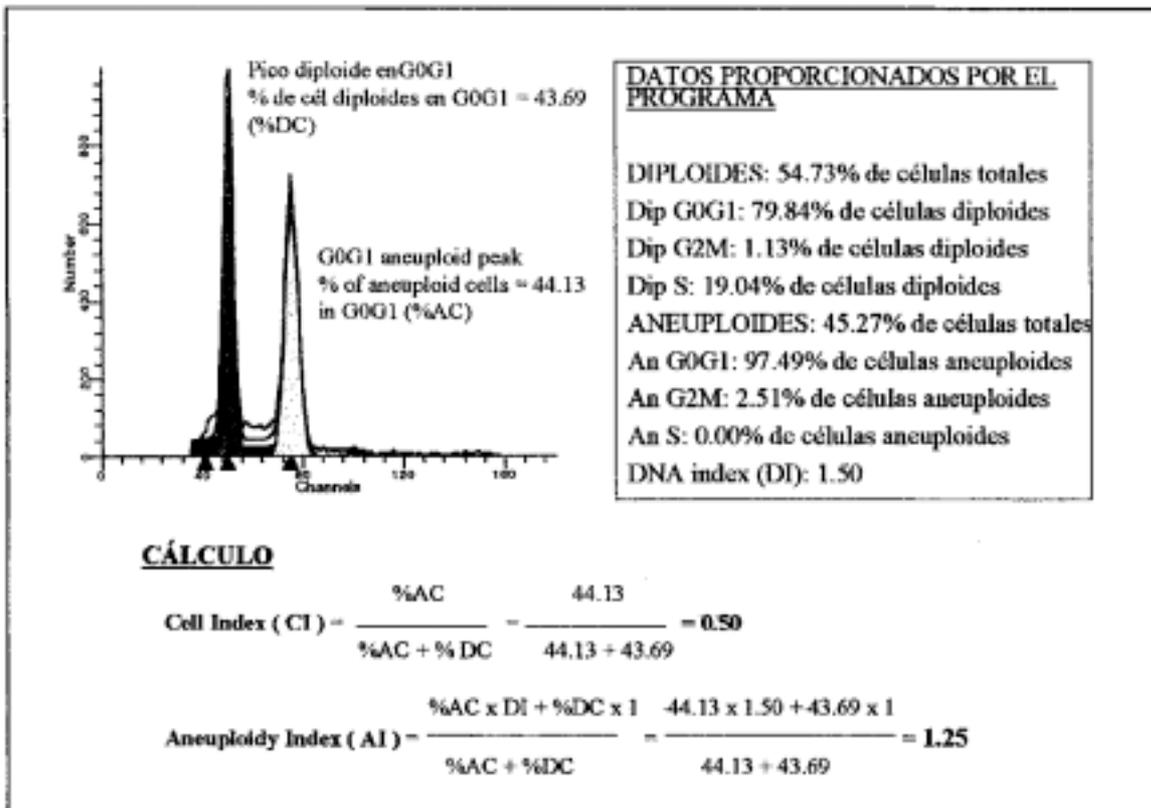


Figura 9. Figura ilustrativa del análisis por citometría de flujo del contenido de DNA. El gráfico y los datos se generaron mediante el programa Mod Fit (ver Material y Métodos). Los tres índices de aneuploidía se calcularon con las fórmulas que se indican.

De los 131 tumores analizados por citometría de flujo, 39 (29.8%) resultaron ser diploides y 92 (70.2%) aneuploides. Entre los aneuploides se encontraron 19 (20.6%) *near* diploides, 1 hipodiploide (DI=0.79) y 5 multiploides, uno de ellos con una población hipodiploide. Los dos tumores con poblaciones hipodiploides se descartaron del estudio debido a que era un número insuficiente de casos para constituir un grupo específico. Por tanto para el análisis estadístico se dispuso de 129 casos. En los casos multiploides el CI y el AI se calcularon considerando todas las poblaciones aneuploides y como DI se usó el valor más alto de contenido de DNA. Los 90 tumores que constituían el grupo aneuploide mostraron las siguientes medias (\pm SD) para los tres índices analizados: **DI=1.57 \pm 0.31** (rango: 1.10-2.28), **CI=0.38 \pm 0.20** (rango: 0.02-0.81), **AI=1.20 \pm 0.17** (rango: 1.00-1.84). En los tumores *near* diploides el cálculo del CI fue aproximado ya que existía solapamiento en la distribución de las poblaciones diploide y *near* diploide. Por este motivo estos tumores no se consideraron para el análisis del CI. Sin embargo, sí que se incluyeron para el estudio del AI, ya que la inexactitud del CI tiene muy poco efecto en el cálculo del AI debido a que estos tumores muestran valores de DI muy bajos. **El análisis de regresión lineal entre DI y CI reveló ausencia de correlación entre ambas variables** ($r=-0.091$, $P=0.449$) lo que refuerza la idea de que **ambos índices proporcionan información complementaria**. Como era de esperar, tanto el DI como el CI correlacionaron con el AI. Por los motivos explicados en el apartado 2.3 de Material y Métodos, los parámetros de proliferación sólo se determinaron en los tumores diploides. Las medias (\pm SD) fueron: fracción de células en fase S: 12.77 \pm 5.39 (rango: 3.71-28.00), índice de proliferación: 0.23 \pm 0.12 (rango: 0.05-0.55).

2. DAÑO GENÓMICO MEDIDO POR AP-PCR

Determinación del límite de variabilidad

Ya ha sido demostrado previamente que la AP-PCR es una técnica reproducible (Arribas et al, 1997). Sin embargo, con el fin de objetivar al máximo el análisis de las alteraciones, se llevaron a cabo experimentos de reproducibilidad intraensayo para determinar el límite de variabilidad de la técnica dentro de este estudio (ver apartado 3.4 de Material y Métodos). Los resultados se representan conjuntamente en un **gráfico que muestra la relación entre la desviación estándar y la intensidad media de la banda** (figura 10). Se observa que las bandas con más intensidad muestran más desviación estándar. Por

esta razón, se consideró el límite de variabilidad como una recta proporcional a la intensidad de las bandas. **Tomando como referencia la recta de regresión, el límite de variabilidad de la técnica es la recta paralela por debajo de la cual se encuentran el 95% de los puntos.** De esta manera, dada una intensidad de banda determinada, sustituyéndola en esta recta (valor en abcisas) encontramos la diferencia de intensidad tumor menos normal (valor en ordenadas) a partir de la cual podemos considerar un cambio real con el 5% de probabilidad de error. Todas las diferencias de intensidad por debajo de ese valor tienen un 95% de probabilidad de que se deban a variaciones de la técnica.

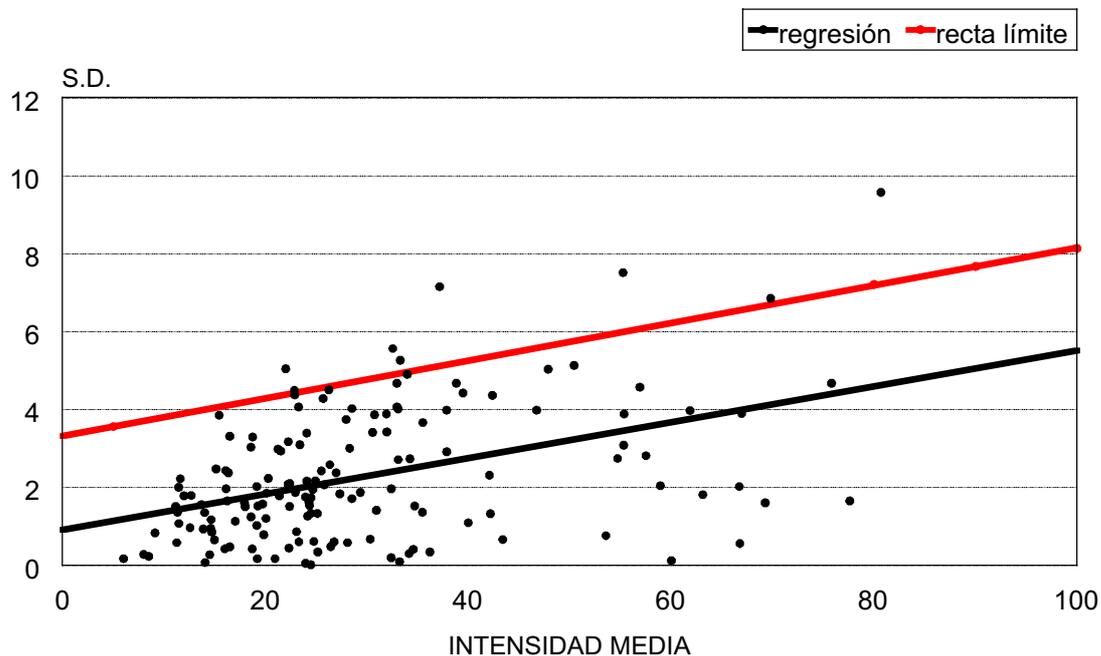


Figura 10. Recta que define el límite de variabilidad de la técnica. La relación entre la desviación estándar y la intensidad media de un conjunto de bandas analizadas repetidamente dentro de un experimento permite determinar cuál es el límite de variabilidad de la técnica. Este límite es una recta cuya pendiente se debe a la mayor desviación estándar que presentan en conjunto las bandas de alta intensidad. Si los cambios de intensidad de las bandas tumorales respecto a las normales no superan este límite no se puede descartar que sean debidos a variabilidad de la técnica. Por tanto solo se contabilizaron los cambios superiores a ese límite.

Análisis de los patrones de bandas

La figura 11 muestra un ejemplo de patrón de bandas para cada uno de los tres *primers* analizados y la aplicación del límite de variabilidad para la determinación de alteraciones.

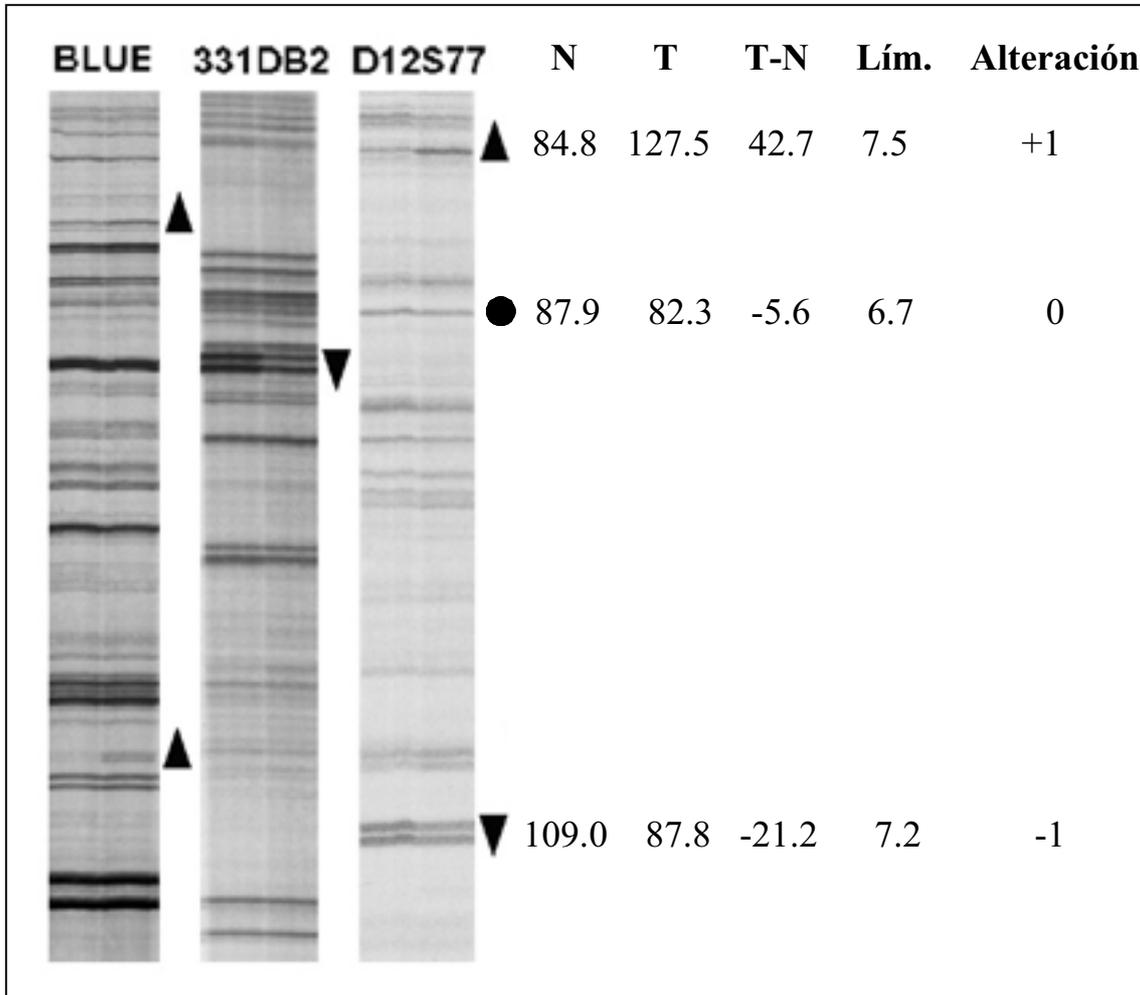


Figura 11. Patrones de bandas obtenidos en los tres experimentos de AP-PCR. Flechas hacia arriba: ganancias de intensidad; flechas hacia abajo: pérdidas de intensidad; punto: sin cambio de intensidad. Se muestran los valores de intensidad relativa para el tejido normal y tumoral, la resta de ambos valores y el límite de variabilidad correspondiente a la intensidad de cada banda tras aplicar la recta de la figura 10. Las bandas en las que la diferencia de intensidad tumor menos normal supera en valor absoluto el límite de variabilidad correspondiente se considera que están alteradas en el tejido tumoral. Las alteraciones se indican como 1: ganancias de intensidad; y -1: pérdidas de intensidad.

En total se analizaron **181 bandas** (58 del primer 331DB2, 80 del primer BLUE y 43 del primer D12S77). El número de bandas analizado para cada caso fue diferente debido a representaciones polimórficas y a diferencias en la resolución de algunos experimentos que imposibilitaron incluir todas las bandas previamente definidas. La media fue de 140 bandas (rango: 73-177). Los 113 tumores analizados por AP-PCR mostraron las siguientes medias (\pm SD) para los tres parámetros analizados: **GDF=0.174 \pm 0.085** (rango: 0.015-0.388), **LF=0.086 \pm 0.044** (rango: 0.007-0.211), **GF=0.088 \pm 0.045** (rango: 0.000-0.215). La regresión lineal entre el GF y el LF resultó ser muy significativa ($P<0.0001$).

3. ASOCIACIONES CON VARIABLES MOLECULARES Y CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Se estudió la relación de las variables derivadas de la citometría de flujo y de la AP-PCR entre ellas y con el resto de variables clínico-patológicas y moleculares incluidas en el estudio. Estas son: sexo, edad, localización del tumor (izquierda o derecha), estadio de Dukes, grado de invasión del tumor (T), invasión en nódulos linfáticos (N), metástasis (M), inestabilidad de microsatélites (MSI), mutaciones en p53 y mutaciones en k-ras.

Daño genómico medido por citometría de flujo

Los casos aneuploides mostraron un mayor porcentaje (51.3%) de mutaciones en p53 que los casos diploides (28.9%) y esta relación resultó ser estadísticamente significativa ($P=0.029$). La separación de los casos en diploides y aneuploides no proporcionó ninguna otra asociación significativa. A continuación se estudió la relación de los tres índices descritos para cuantificar aneuploidía (DI, CI y AI) con el resto de variables. Ya que los tumores diploides presentan valores constantes para estos índices (DI=1, CI=0, AI=1), el estudio se llevó a cabo sólo para los casos aneuploides ($n=90$). De los tres índices el AI fue el que resultó estar más relacionado con algunas de las variables de interés (tabla 5). En concreto, **valores elevados de AI se asocian a localización del tumor en el colon izquierdo** ($P=0.077$), **estadios de Dukes avanzados** ($P=0.043$) y **presencia de metástasis** ($P=0.021$). Altos valores de CI también se asociaron a la presencia de metástasis ($P=0.023$) y a estadios de Dukes avanzados ($P=0.069$). Sin

embargo para el DI no se encontró ninguna relación significativa con las variables estudiadas.

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

VARIABLE	n ₁	GDF (media±SD)	P	n ₂	AI (media±SD)	P
SEXO						
Mujeres	52	0.179±0.002	ns	41	1.186±0.153	ns
Hombres	61	0.169±0.008		49	1.216±0.182	
EDAD						
<= 67 años	54	0.170±0.005	ns	39	1.208±0.158	ns
> 67 años	59	0.176±0.004		51	1.198±0.179	
LOCALIZACIÓN						
Derecha	33	0.146±0.005	0.028	26	1.152±0.126	0.077
Izquierda	80	0.185±0.006		64	1.222±0.181	
ESTADIO DE DUKES						
A,B	58	0.176±0.004	ns	51	1.174±0.163	0.043
C	38	0.179±0.008		29	1.212±0.141	
D	17	0.150±0.007		10	1.319±0.234	
T (grado de invasión)						
1,2	20	0.184±0.006	ns	12	1.188±0.184	ns
3	51	0.159±0.001		40	1.218±0.179	
4	42	0.186±0.008		38	1.190±0.157	
N (invasión nódulos linfáticos)						
0	64	0.171±0.003	ns	54	1.185±0.169	ns
1	31	0.164±0.009		23	1.213±0.142	
2	18	0.198±0.009		13	1.254±0.212	
M (metástasis)						
no	96	0.178±0.006	ns	80	1.188±0.155	0.021
sí	17	0.150±0.007		10	1.319±0.234	
MSI (inestab. de microsát.)						
no	107	0.176±0.005	ns	87	1.205±0.171	ns
sí	6	0.119±0.007		3	1.113±0.066	
MUTACIÓN EN p53						
no	57	0.153±0.002	0.002	39	1.212±0.193	ns
sí	49	0.202±0.007		41	1.220±0.153	
MUTACIÓN EN ras						
no	70	0.179±0.005	ns	53	1.204±0.161	ns
sí	42	0.162±0.004		35	1.187±0.150	

n₁: número de casos con datos para AP-PCR (n total=113). n₂: número de casos aneuploides (n total=90).

Daño genómico medido por AP-PCR

El GDF aumenta significativamente en los tumores localizados en el colon izquierdo ($P=0.028$) y en los tumores con mutación en p53 ($P=0.002$) (tabla 5). Las mismas asociaciones se encontraron cuando se estudió separadamente el GF y el LF (localización en colon izquierdo: $P=0.055$ y $P=0.023$, respectivamente; mutación en p53: $P=0.004$ y $P=0.003$, respectivamente). La elevada correlación encontrada entre GF y LF (ver apartado 2 de Resultados) y la gran coincidencia observada con los resultados obtenidos para el GDF nos llevaron a considerar innecesario el estudio por separado del GF y el LF. Por tanto, la mayoría de los análisis estadísticos realizados a partir de este momento se refieren tan solo al GDF. Cuando se analizó la relación del GDF con el resto de variables separando los casos diploides y aneuploides se observó que altos valores de GDF correlacionaban con mutaciones en p53 tanto en tumores diploides como en aneuploides, pero, sin embargo, la asociación con tumores localizados en el colon izquierdo sólo resultó significativa en los tumores aneuploides.

Relación entre las variables derivadas de la citometría de flujo y las variables derivadas de la AP-PCR

Se encontró una ligera tendencia a que los tumores aneuploides mostraran mayor GDF (media=0.183) que los tumores diploides (media=0.155), pero esta diferencia no alcanzó significación estadística ($P=0.100$). Por otra parte, **en los tumores aneuploides la regresión lineal del GDF respecto a las variables que cuantifican el grado de aneuploidía mostró que no existe relación lineal con ninguna de ellas** (GDF vs AI, $P=0.135$; GDF vs CI, $P=0.515$; GDF vs DI, $P=0.761$). En la figura 12 se presenta el diagrama de puntos GDF vs AI.

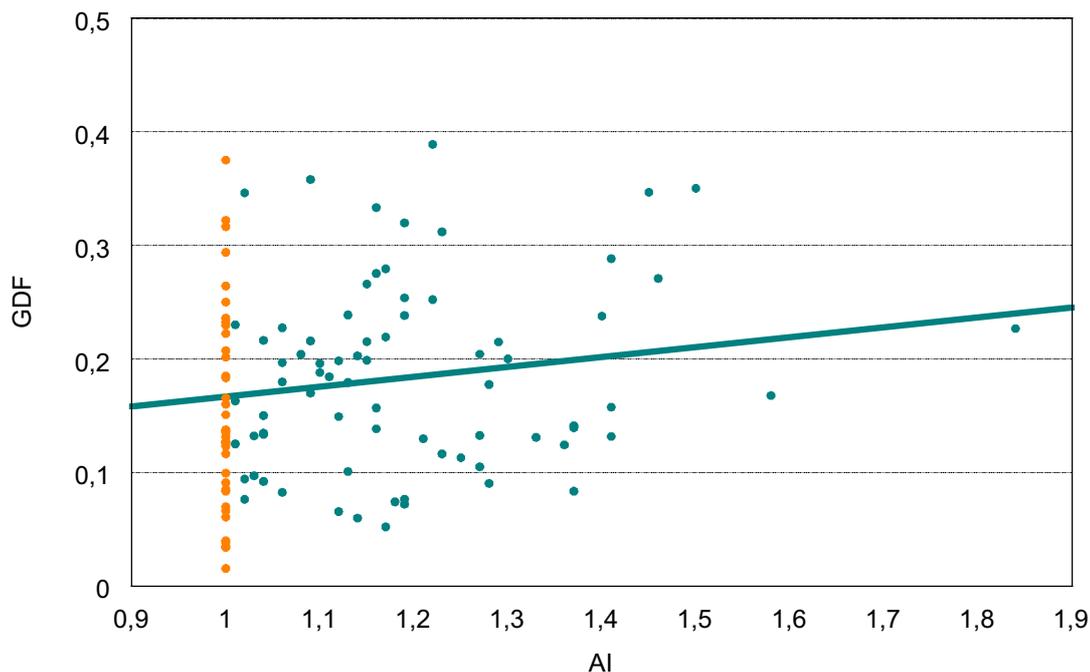


Figura 12. Relación entre GDF y AI. Puntos naranjas: tumores diploides; presentan AI=1 y valores de GDF a lo largo de todo el rango. Puntos verdes: tumores aneuploides; no existe relación entre los valores de AI y de GDF.

4. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

Tal y como se ha explicado en material y métodos, la muestra de tumores considerada para el análisis de supervivencia se seleccionó en función del subobjetivo propuesto:

- **valoración de las medidas de daño genómico como factores pronósticos:** pacientes con resección quirúrgica radical (R0) (n=108).
- **análisis multivariante mediante modelos de Cox:** todos los casos incluidos en el estudio (n=129).

4.1 VALOR PRONÓSTICO DE LAS VARIABLES ANALIZADAS

4.1.1 VALOR PRONÓSTICO DE LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y MOLECULARES

Antes de proceder al análisis del valor pronóstico de las medidas de daño genómico se llevó a cabo dicho análisis para las variables clínico-patológicas y moleculares incluidas en el estudio. **Las dos variables que mostraron mayor asociación con supervivencia fueron el estadio de Dukes y la invasión en nódulos linfáticos** (tabla 6). También se ha sugerido valor pronóstico a las mutaciones en los genes p53 y k-ras, pero en la población analizada (108 casos R0) no se encontró relación con supervivencia para ninguno de los dos genes por separado ni tampoco cuando ambos se consideraron conjuntamente. Esto ya se había observado previamente en otros estudios llevados a cabo en esta misma población (Tortola et al, 1999). También se analizó el valor pronóstico de todas las variables de forma independiente para tumores diploides y aneuploides. **Mientras que en los diploides el estadio de Dukes y la invasión en nódulos linfáticos mantuvieron su valor pronóstico, en los aneuploides sólo la invasión en nódulos linfáticos conservó una elevada significación** (tabla 6). Respecto al valor pronóstico de la invasión de nódulos linfáticos, es necesario destacar una diferencia fundamental entre lo que ocurre en tumores diploides y en aneuploides. **En los tumores diploides la invasión de los ganglios linfáticos, independientemente de su número, causa una disminución drástica de la supervivencia mientras que en los tumores aneuploides la supervivencia se mantiene elevada hasta que no se ha invadido un número considerable de ganglios (3 o más)** (tabla 6). Estos resultados indican que el mecanismo de progresión de los tumores diploides es diferente del de los aneuploides ya que la agresividad de los dos tipos de tumores se asocia a diferentes características invasivas. Estos datos también indican la importancia de contabilizar el número de ganglios linfáticos invadidos (lo cual no se hace en el estadio de Dukes) y la necesidad de usar esta variable para testar el valor pronóstico de nuevos parámetros (por este motivo se incluye en los tests de Cox que se realizan en este apartado). El resto de las variables no mostró asociación con pronóstico en ninguno de los dos subgrupos de casos.

Tabla 6. Análisis univariante de la supervivencia total.

Factor Pronóstico	Análisis univariante				
	Categorías	No de casos	Supervivencia 5 años (%±SE)	Hazard Ratio (Cox)	Log-rank P
Estadio de Dukes	A-B	69	86.0±4.3	4.0	<0.001
	C	39	55.5±8.0		
Invasión en nódulos linfáticos	Ninguno	69	86.0±4.3	3.0	<0.001
	De 1 a 3	28	63.2±9.2		
	Más de 3	11	36.3±14.5		
Estado de ploidía	Diploide	32	71.8±7.9	0.8	0.763
	Aneuploide	76	76.3±5.0		
GDF	≤0.20	60	77.3±5.5	1.8	0.135
	>0.20	32	64.8±8.5		
Tumores diploides					
Estadio de Dukes	A-B	21	95.2±4.6	23.0	<0.001
	C	11	27.2±13.4		
Invasión en nódulos linfáticos	Ninguno	21	95.2±4.6	21.0	<0.001
	De 1 a 3	7	28.5±17.0		
	Más de 3	4	25.0±21.6		
GDF	≤0.20	20	70.0±10.2	0.5	0.505
	>0.20	10	80.0±12.6		
% de células en fase S	≤13.94	20	85.0±7.9	3.3	0.078
	>13.94	11	54.5±15.0		
Tumores aneuploides					
Estadio de Dukes	A-B	48	81.6±5.9	2.2	0.064
	C	28	66.8±9.0		
Invasión en nódulos linfáticos	Ninguno	48	81.6±5.9	1.5	0.006
	De 1 a 3	21	75.1±9.6		
	Más de 3	7	28.5±17.0		
GDF	≤0.20	40	84.3±5.9	3.0	0.017
	>0.20	22	57.7±10.7		
DNA index (DI)	≤1.48	31	90.2±5.3	4.4	0.009
	>1.48	45	66.9±7.3		
Cell index (CI)	≤0.17	7	100	26.4	0.061
	>0.17	51	67.0±6.8		
Aneuploidy Index (AI)	≤1.14	36	91.6±4.6	4.3	0.004
	>1.14	40	62.1±8.1		
GDF/AI	bajo GDF bajo AI	25	96.0±3.9	13.9	<0.001
	alto GDF y/o	37	56.5±8.6		

4.1.2 VALOR PRONÓSTICO DE LAS VARIABLES DERIVADAS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO

La clasificación de los tumores basada en el estado de ploidía (diploides vs. aneuploides) no mostró ninguna asociación con supervivencia (tabla 6). Para completar esta clasificación inicial teniendo en cuenta el grado de aneuploidía de los tumores se decidió dividir los casos en tres grupos: '**diploides**', '**baja aneuploidía**' y '**alta aneuploidía**'. La separación entre baja y alta aneuploidía se llevó a cabo de forma independiente para cada uno de los tres índices usando como punto de corte el valor obtenido en el análisis de curvas ROC. Estos valores fueron **AI>1.14** (área debajo de la curva: 0.675, sensibilidad: 80%, especificidad: 57%), **DI>1.48** (área debajo de la curva: 0.663, sensibilidad: 85%, especificidad: 50%) y **CI>0.17** (área debajo de la curva: 0.529, sensibilidad: 100%, especificidad: 18%).

Las curvas de Kaplan-Meier de supervivencia total obtenidas con cada uno de los tres índices fueron muy similares, siendo la más significativa la clasificación basada en el AI (figura 13a). Sorprendentemente, **los tumores diploides mostraron una supervivencia intermedia entre los tumores de baja y alta aneuploidía**, lo que explica la falta de significación del análisis de supervivencia de tumores diploides vs. aneuploides. La separación de los tumores en función del estadio de Dukes (figura 13b y 13c) proporcionó nuevos datos para entender el motivo de esta disminución en la supervivencia de los tumores diploides. Los tumores diploides en estadios de Dukes tempranos (A y B) mostraron una supervivencia elevada (figura 13b), como se les atribuye normalmente, ya que se consideran tumores con buen pronóstico. Sin embargo, **en el estadio de Dukes C la supervivencia de los tumores diploides disminuyó drásticamente**, siendo incluso peor que la de los tumores aneuploides con alto AI (figura 13c). Esto sugiere que los tumores diploides son capaces de progresar y de producir la muerte del individuo de una manera independiente a la de los tumores aneuploides (es decir, no relacionada con un aumento del contenido de DNA) y, por este motivo, a partir de este momento se decidió considerarlos como un grupo aparte. El análisis de la relación entre la proliferación celular y la supervivencia en tumores diploides mostró que los tumores con un elevado porcentaje de células en fase S (superior al punto de corte obtenido mediante las curvas ROC = 13.94%) tenían cierta tendencia a experimentar peor pronóstico (tabla 6), pero esta relación no es independiente del estadio de Dukes (no se muestran los datos).

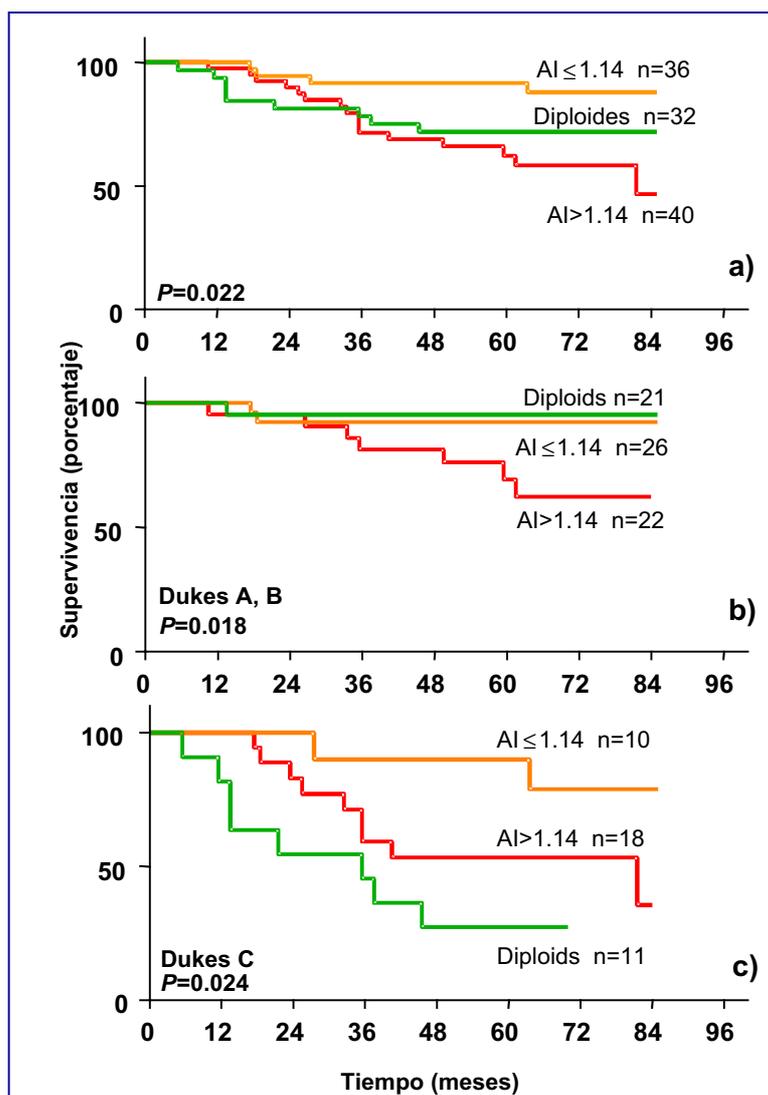


Figura 13. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia total para la clasificación de casos basada en el Aneuploidy Índice (AI). El punto de corte se determinó tras el análisis de curvas ROC (>1.14). Las curvas se han realizado con todos los tumores (a), con los tumores en estadio de Dukes A y B (b) y con los tumores en estadio de Dukes C (c).

Seleccionando sólo los tumores aneuploides se pudo comprobar que valores elevados de cualquiera de los tres índices relacionados con la medida de la aneuploidía (DI, CI y AI) se asocian con una disminución de la supervivencia en el análisis univariante (tabla 6). Sin embargo, en el análisis multivariante sólo el AI muestra un valor pronóstico independiente del estadio de Dukes y de la invasión en nódulos linfáticos (tabla 7). Estos resultados indican que los dos factores analizados, porcentaje de células aneuploides (CI) y contenido de DNA (DI), contribuyen de forma independiente a determinar el pronóstico de los tumores aneuploides. Por este motivo, cuando se combinan los dos factores en un solo índice, el AI, es cuando se obtiene mayor información, demostrado

por mejores asociaciones con las variables clínico-patológicas (apartado 3 de Resultados) y por una mejor significación del test log rank. Además **el AI es clínicamente útil debido a que supera la capacidad pronóstica del estadio de Dukes y complementa la capacidad pronóstica del número de ganglios linfáticos invadidos** (tabla 7).

Tabla 7. Análisis multivariante en tumores aneuploides.

Tumores aneuploides (Análisis de Cox multivariante)				
Variable	Categorías	Hazard ratio	95% CI	P
Estadio de Dukes	A-B	1.9	0.7-4.6	0.155
	C			
Aneuploidy Index (AI)	≤1.14	3.9	1.3-11.9	0.014
	>1.14			
Invasión en nódulos linfáticos	Ninguno	1.1	0.4-3.3	0.762
	De 1 a 3	6.2	2.0-19.5	0.001
	Más de 3			
Aneuploidy Index (AI)	≤1.14	5.1	1.6-15.9	0.004
	>1.14			
Estadio de Dukes	A-B	2.3	0.8-6.1	0.087
	C			
GDF	≤0.20	3.2	1.2-8.5	0.018
	>0.20			
Invasión en nódulos linfáticos	Ninguno	1.6	0.5-5.2	0.401
	De 1 a 3	3.9	1.2-12.4	0.021
	Más de 3			
GDF	≤0.20	2.7	1.0-7.5	0.046
	>0.20			
Estadio de Dukes	A-B	1.6	0.6-4.4	0.290
	C			
GDF/AI	bajo GDF bajo AI alto GDF y/o AI	12.9	1.6-97.9	0.013
Invasión en nódulos linfáticos	Ninguno	1.0	0.3-3.3	0.918
	De 1 a 3	4.1	1.2-13.1	0.016
	Más de 3			
GDF/AI	bajo GDF bajo AI alto GDF y/o AI	13.8	1.8-105.2	0.011

Por otra parte, **el análisis del grado de aneuploidía en función del AI** (alto o bajo) en los diferentes estadios de Dukes (figura 13b y 13c) **permitió identificar un subgrupo de pacientes con tumores en estadio temprano que, sin embargo, se asocian a mal pronóstico**. En la población analizada, la tasa de supervivencia a los 5 años de los pacientes con Dukes A-B es del 86% y la de los pacientes con Dukes C del 55.5% (tabla 6), lo cual concuerda con datos publicados con anterioridad (Deans et al, 1992). Sin embargo, dentro de los casos con Dukes A-B encontramos dos subgrupos con pronóstico muy distinto: los tumores diploides y los tumores con bajo grado de aneuploidía ($AI \leq 1.14$), que tienen una tasa de supervivencia aproximada al 95%, y los tumores con alto grado de aneuploidía ($AI > 1.14$), que presentan una supervivencia a los 5 años de tan solo un 68%. Por otro lado, dentro de los pacientes con Dukes C, aquellos con bajo grado de aneuploidía ($AI \leq 1.14$) tienen una supervivencia a los 5 años del 80%, cifra comparable a la esperada para tumores de estadios tempranos.

Para descartar posibles errores en estas observaciones debido a la influencia que ejerce sobre la supervivencia la administración de terapias adyuvantes, los resultados se reevaluaron tras clasificar los casos en función de la terapia. De los 69 pacientes con Dukes A-B sólo 4 (uno de ellos con alto AI) recibieron terapia coadyuvante (tabla 8). Todos ellos estaban vivos al finalizar el seguimiento. Sin embargo, algunos de los pacientes con Dukes A-B no tratados murieron. El 70% (7/10) de estos pacientes presentaban tumores con alto AI, porcentaje significativamente superior ($P=0.021$) al que presentaron los pacientes que continuaron vivos, que fue de un 25% (14/55) (tabla 8). Los análisis de supervivencia univariante y multivariante de este subgrupo de pacientes no tratados mostraron resultados similares a los obtenidos para todos los casos R0 (datos no mostrados). Si se hubiese utilizado el AI como criterio con valor pronóstico, los pacientes se habrían podido reclasificar en 21 pacientes con alto riesgo y 44 pacientes con bajo riesgo. En el primer grupo murieron el 33% de los pacientes (7/21) y en el segundo tan solo el 7% (3/44). En pacientes con tumores R0 Dukes C se administró terapia adyuvante salvo contraindicaciones y, a posteriori, se observó que los pacientes no tratados tenían tendencia a ser de avanzada edad (media de edad para pacientes tratados 61 ± 14 , $n=18$; para pacientes no tratados: 71 ± 13 , $n=22$; $P=0.025$). Debido al bajo número de casos no es posible llegar a conclusiones fiables en este apartado.

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

Estado al final del seguimiento	Tratados		No tratados ^a	
	Vivos	Muertos con enfermedad	Vivos	Muertos con enfermedad
Diploides	3	0	17	1
Bajo AI	0	0	24	2
Alto AI	1	0	14	7

Solo se consideran los pacientes con tumores en estadio de Dukes A-B y sin enfermedad residual (R0).

^aNo se incluye un paciente con un tumor hipodiploide y muerto con enfermedad. Chi-cuadrado considerando solo los pacientes no tratados, $P=0.021$.

4.1.3 VALOR PRONÓSTICO DE LAS VARIABLES DERIVADAS DE LA AP-PCR

En primer lugar se determinaron los puntos de corte de las tres variables derivadas de la AP-PCR (GDF, GF Y LF) mediante el análisis por curvas ROC de los 108 tumores con resección quirúrgica radical. Los valores obtenidos fueron: **GDF>0.20** (área debajo de la curva: 0.553, sensibilidad: 48%, especificidad: 70%), **GF>0.11** (área debajo de la curva: 0.570, sensibilidad: 44%, especificidad: 72%) y **LF>0.09** (área debajo de la curva: 0.540, sensibilidad: 48%, especificidad: 69%). La población se dividió en dos grupos para cada una de las variables y se calcularon las curvas de Kaplan-Meier y el test log rank en cada caso. Para las tres variables se obtuvieron unos resultados prácticamente idénticos (no se muestran los datos) por lo que se decidió, de acuerdo con el criterio establecido en el apartado 3, simplificar el análisis utilizando únicamente el GDF. En la tabla 6 se puede observar que **cuando se consideran todos los tumores la relación del GDF con la supervivencia no alcanza la significación estadística**. En base a los resultados obtenidos en el apartado anterior se decidió estudiar el papel del GDF por separado en los casos diploides y aneuploides. En los diploides el GDF no muestra relación con supervivencia, pero sí en los aneuploides (tabla 6 y figura 14a). **Los tumores aneuploides con alto GDF tienen peor pronóstico que los tumores aneuploides con bajo GDF** ($P=0.017$). Además el análisis multivariante demostró que el valor pronóstico del GDF es ligeramente superior al estadio de Dukes, aunque ligeramente inferior al de la invasión en nódulos linfáticos (tabla 7). De todas maneras **el valor pronóstico del GDF es independiente de ambas variables**.

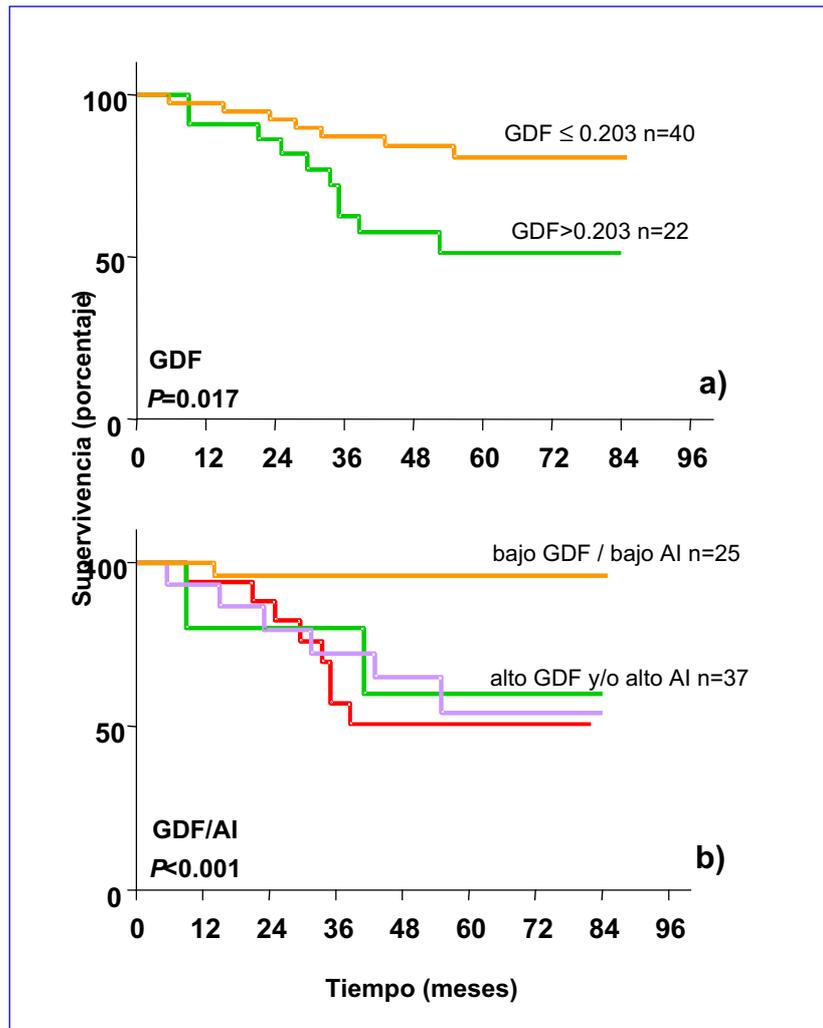


Figura 14. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia total para las clasificaciones de los casos aneuploides basadas en el GDF (a) y en la combinación de GDF y AI (b). El punto de corte del GDF se determinó tras el análisis de curvas ROC (>0.20). Para clasificar los casos en las 4 categorías resultantes de combinar alto/bajo GDF/AI se utilizaron los respectivos puntos de corte obtenidos con las curvas ROC para cada una de las dos variables.

4.1.4 VALOR PRONÓSTICO CONJUNTO DEL AI Y EL GDF

Dado que tanto el AI como el GDF presentan una clara asociación con supervivencia en el subgrupo de los pacientes con tumores aneuploides y dado que previamente se había comprobado que no existe relación entre ambas (apartado 3 de Resultados) se decidió agruparlas en una sola variable (GDF/AI) para ver si ésta mejoraba aún más el valor pronóstico de cada una de ellas por separado. La nueva variable incluía las 4 categorías resultantes de combinar los grupos de alto y bajo AI y GDF basados en sus respectivos puntos de corte. En la figura 14b se aprecia claramente que la categoría de bajo AI y bajo GDF mantiene una supervivencia muy elevada (porcentaje de supervivencia a los 5 años

del 96.0 ± 3.9) en comparación con las otras tres categorías. Ya que éstas tienen un comportamiento muy similar (en este sentido es importante destacar que la combinación de alto AI y alto GDF no implica un resultado peor que la presencia de cada una de ellas por separado) se agruparon en una sola categoría denominada 'alto AI y/o alto GDF'. El porcentaje de supervivencia a los 5 años de los pacientes pertenecientes a este grupo es del 56.5 ± 8.6 y el riesgo de morir es 13.9 veces más elevado que el de los pacientes con bajo AI y bajo GDF (tabla 6). Comparando los test de log rank (tabla 6) vemos que **el valor pronóstico de la variable combinada GDF/AI es superior al de cada una de las variables por separado. Además el análisis multivariante demostró que la variable GDF/AI tiene un valor pronóstico superior al del estadio de Dukes y a la invasión en nódulos linfáticos e independiente en ambos casos** (tabla 7).

Por tanto, a la luz de estos resultados se podría proponer una clasificación de los tumores colorrectales en base a su daño genómico como: **diploides, aneuploides de bajo daño genómico (bajo GDF y bajo AI) y aneuploides de alto daño genómico (alto GDF y/o alto AI)**. Los tumores aneuploides de bajo y alto daño genómico corresponden respectivamente a tumores de mejor y peor pronóstico, mientras que los tumores diploides incluyen casos de buen pronóstico y casos de mal pronóstico.

4.2 ANÁLISIS MULTIVARIANTE MEDIANTE MODELOS DE COX

Una vez comprobado el valor pronóstico del AI y del GDF en la población de pacientes R0, que son aquellos susceptibles de una mejor clasificación con fines terapéuticos, se pasó a analizar cómo se influyen mutuamente las variables que se asocian a la agresividad de los tumores. Esto supone **elaborar modelos multivariantes para determinar, por un lado, el valor pronóstico neto de cada variable y, por otro, las interacciones estadísticas. Determinar el valor pronóstico neto significa analizar simultáneamente dos o más variables en un modelo y evaluar que variables aportan información pronóstica o si alguna variable queda explicada por otra. Estudiar una interacción consiste en explorar si el valor pronóstico de una variable se modifica según el valor de otra variable**. Para ello se llevaron a cabo estudios de supervivencia basados en **modelos de Cox**, los cuales permiten determinar el valor pronóstico neto y las interacciones entre múltiples variables y, además, permiten tratar las variables como cuantitativas y, por tanto, aprovechar al máximo la información que contienen. En estos análisis se incluyeron todos los casos presentes en el estudio (n=129) con el fin de optimizar al máximo los tests estadísticos.

4.2.1 INTERACCIÓN ENTRE GDF Y PLOIDÍA

Ya hemos visto antes que el estado de ploidía (diploides vs. aneuploides) no tiene relación con supervivencia y que el GDF, cuando se consideran casos diploides y aneuploides conjuntamente, tampoco. Sin embargo, en los casos aneuploides valores elevados de GDF correlacionan con mal pronóstico. La elaboración de modelos de Cox univariados para las variables ploidía y GDF utilizando todos los casos confirmaron la falta de valor pronóstico de ambas. Por otra parte, la comparación del modelo ajustado con las dos variables respecto al modelo que incluye el término de interacción entre ambas resultó significativa ($P=0.015$), lo que indica que **el efecto del GDF sobre la supervivencia es diferente para tumores diploides y aneuploides**. La representación gráfica de esta interacción (figura 15) permite entender el sentido de esta diferencia. **Para los tumores aneuploides el aumento del GDF se relaciona con un aumento aproximadamente lineal del riesgo de muerte** ($HR=1.42$, $P=0.077$), lo cual coincide con los análisis previos. Sin embargo, **para los tumores diploides esta relación es opuesta: el aumento del GDF se asocia a una disminución del riesgo de muerte** ($HR=0.60$, $P=0.100$). Aunque esta asociación no es estadísticamente significativa, la tendencia de la gráfica es clara y, en cualquier caso, indica que, sorprendentemente, los tumores diploides con peor pronóstico son aquellos que tienen menos alteraciones genómicas (medidas por AP-PCR).

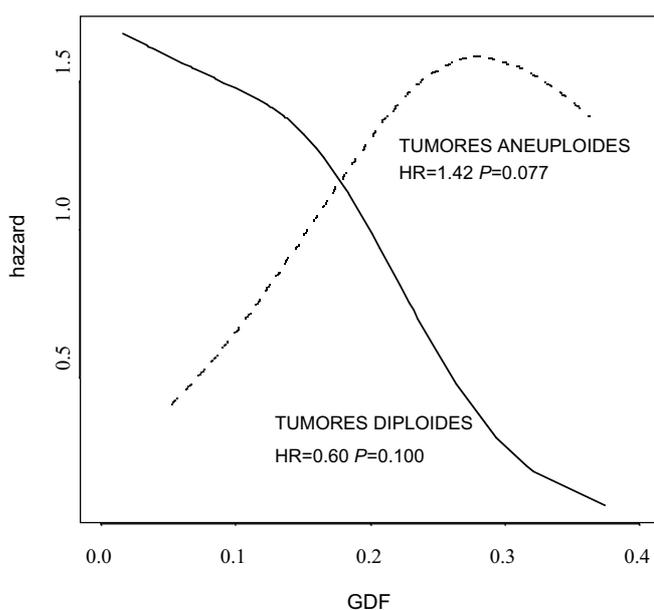


Figura 15. Curvas de riesgo para tumores diploides y aneuploides en función del GDF. Para cada grupo de casos se indica el riesgo relativo (HR) y la significación (P) del modelo correspondiente. Los valores de GDF fueron multiplicados por 10 para permitir la interpretación del modelo y, por tanto, los riesgos relativos se interpretan como el aumento de riesgo asociado al incremento del GDF en 10 unidades (ver Apéndice 1).

Para intentar aportar más datos a esta observación se realizaron modelos de Cox , para los tumores diploides, de todas las variables clínico-patológicas incluidas en el estudio, pero únicamente se obtuvo un resultado significativo para el estadio de Dukes ($P < 0.001$), la invasión en nódulos linfáticos ($P = 0.001$) y cierta tendencia con el porcentaje de células en fase S ($P = 0.082$). La inestabilidad de microsatélites no aportó ningún dato útil debido a que sólo 4 tumores diploides mostraron este tipo de inestabilidad, de los que 1 correspondía a un paciente que murió. También se elaboraron modelos combinados del GDF con el resto de variables y se estudiaron todas las interacciones, pero no se obtuvo ninguna asociación que aportara información al estadio de Dukes. En resumen, **podemos decir que existe un subgrupo dentro de los tumores diploides que presentan estadios de Dukes avanzados y muy mal pronóstico y que no muestran alteraciones genómicas importantes, como mínimo del tipo detectado por AP-PCR, ni características diferenciales respecto al resto de tumores que hayamos podido identificar.**

4.2.2 INTERACCIONES EN TUMORES ANEUPLOIDES

Funciones de riesgo del AI y el GDF

Antes de analizar las interacciones del GDF y del AI dentro de los tumores aneuploides es necesario estudiar cuáles son las funciones de riesgo de estas dos variables. Hemos visto en el apartado 4.1 que valores elevados de AI y de GDF se relacionan con una menor supervivencia de los tumores aneuploides. Cuando en lugar de dividir los casos en dos grupos (alto y bajo), se analiza la evolución del riesgo de muerte en función del incremento progresivo de cada una de las variables también se observa que valores elevados de las dos variables se asocian a un mayor riesgo y que esta asociación es estadísticamente significativa (GDF, $P = 0.076$; AI, $P = 0.026$) (figura 16a y 16b). Pero esta técnica, además, permite analizar si la relación entre la variable cuantitativa y el riesgo es lineal o no. Se probaron modelos lineales y cuadráticos y no se observaron diferencias estadísticamente significativas, por lo que se decidió trabajar con modelos lineales para el cálculo de riesgos. De todas maneras, para asegurarnos de que la relación entre las variables y el riesgo era realmente lineal se realizaron representaciones gráficas de modelos cuadráticos usando un método de suavizado del tipo *splines*, el cual permite que la función adquiriera cierta curvatura (figura 16a y 16b). Se observó que las funciones de riesgo del AI y del GDF presentan ligeras curvaturas en sus extremos finales, lo cual se debe a una distorsión producida por el bajo número de casos con valores elevados de las

variables. Sin embargo, como la mayoría de los casos se sitúan en la primera mitad de la gráfica, la cual es claramente lineal, **la asunción de linealidad es correcta**. Cuando esto sucede los *hazard ratio* se interpretan como el aumento del riesgo que se produce al aumentar la variable cuantitativa en una unidad (10 unidades en este caso porque el AI y el GDF han sido reescalados para la realización de los modelos) (ver Apéndice 1). Es decir, **al aumentar el AI de 1.1 a 1.2 el riesgo de muerte aumenta en un 22%**. De la misma manera, **al aumentar el GDF de 0.10 a 0.20 el riesgo de muerte aumenta en un 42%**.

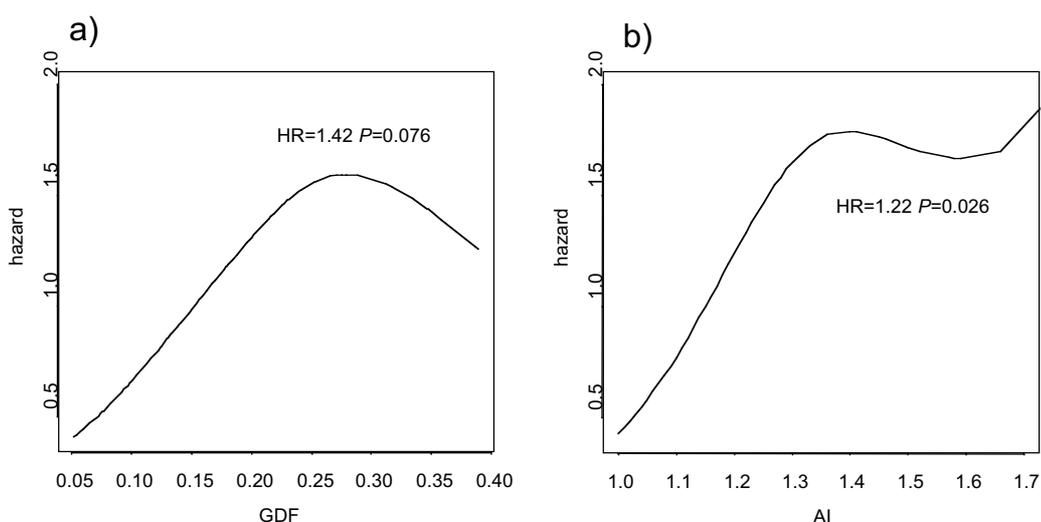


Figura 16. Curvas de riesgo para tumores aneuploides en función del GDF (a) y del AI (b). Las curvas representadas corresponden a modelos cuadráticos, mientras que los riesgos relativos (HR) y las significaciones (P) corresponden a modelos lineales (ver texto).

Interacción entre GDF y AI

Antes de analizar la interacción entre estas dos variables hay que analizar el tipo de relación que tienen. Como el modelo ajustado para las dos variables aporta significación a los modelos univariantes de cada una de ellas (test de razón de verosimilitud GDF+AI vs AI: $P=0.088$, GDF+AI vs GDF: $P=0.030$) podemos decir que **GDF y AI influyen en la malignidad de los tumores de forma independiente**. Para explorar las posibles interacciones entre el GDF y el AI, ya que ambas variables son cuantitativas, se utilizó el recurso de dividir las en dos grupos en función de la mediana y de comparar las funciones de riesgo de cada una en base a los grupos formados en la otra. Cuando los casos se dividieron por el GDF no se obtuvo ningún tipo de interacción entre las dos variables, ya que el elevado riesgo de muerte producido por el aumento del AI se da tanto en tumores de bajo GDF como de alto GDF. Sin embargo, cuando se analizó el GDF en función de

los grupos de AI sí que se encontró interacción ($P=0.003$) (figura 17a). **El incremento del GDF sólo se asocia a mayor riesgo de muerte en los tumores con bajo AI** y, en concreto, este riesgo se inicia en el momento en que el tumor alcanza un 20% de alteraciones (en la gráfica se observa claramente un punto de inflexión alrededor de este valor).

Interacción entre AI y p53

Se analizaron todas las interacciones existentes entre el GDF y el AI con las variables de interés incluidas en el estudio con la intención de ver si el valor pronóstico del GDF o del AI se veía modificado en algún grupo de casos. La interacción más importante que se encontró fue entre las variables p53 y AI ($P=0.032$) (figura 17b). **El valor pronóstico del AI sólo se observa en los casos en los que p53 no está mutada.** En estos casos, valores bajos de AI se asocian a buen pronóstico, pero en el momento en que el AI supera el valor de 1.3 el riesgo de muerte de estos tumores se dispara. **Si p53 está mutada, valores elevados de AI no aumentan el riesgo.**

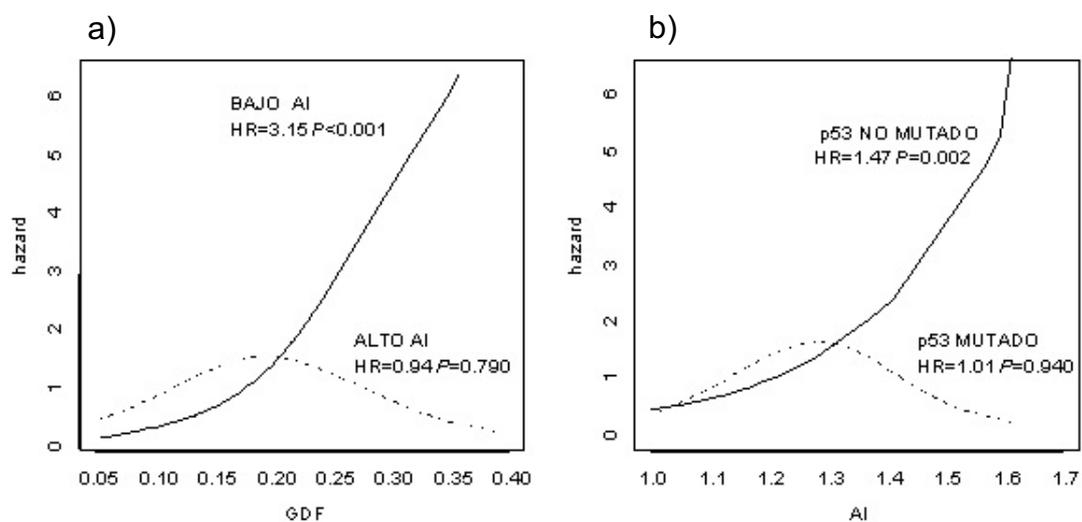


Figura 17. Curvas de riesgo para tumores aneuploides basadas en la interacción entre diferentes variables. (a) Modificación del riesgo de muerte asociado al aumento del GDF en función de los niveles de AI. (b) Modificación del riesgo de muerte asociado al aumento del AI en función de la presencia de mutaciones en p53.

4.2.3 VALOR PRONÓSTICO NETO DE LAS VARIABLES QUE SE ASOCIAN A AGRESIVIDAD EN TUMORES ANEUPLOIDES

Se elaboraron todos los **modelos de Cox univariantes** correspondientes a las variables clínico-patológicas y moleculares de mayor interés (localización del tumor, estadio de Dukes, invasión en nódulos linfáticos y mutaciones en p53 y en k-ras). Éstos resultaron ser estadísticamente **significativos para el estadio de Dukes** ($P < 0.001$), **para la invasión en nódulos linfáticos** ($P < 0.001$) y **para las mutaciones en p53** ($P = 0.015$). Curiosamente p53 no había mostrado relación con supervivencia cuando se estudiaron los tumores aneuploides R0 (apartado 4.1.1 de Resultados). Sin embargo, al incluir también los casos con enfermedad residual se observa que las mutaciones de p53 se asocian a mayor riesgo de muerte. La localización del tumor y las mutaciones en k-ras no afectan el riesgo de muerte de los pacientes.

A continuación se realizaron los **modelos multivariantes** resultantes de combinar el AI y el GDF con cada una de las otras variables. Sólo resultaron significativos aquellos modelos que, aparte del AI y el GDF, incluían el estadio de Dukes, la invasión en nódulos linfáticos y las mutaciones en p53. Como la invasión en nódulos linfáticos se relaciona con supervivencia en menor grado que el estadio de Dukes (en un modelo multivariante de ambas la invasión en nódulos linfáticos pierde su significación), decidimos analizar únicamente los modelos que incluían el estadio de Dukes, las mutaciones en p53, el GDF y el AI. **La finalidad de este análisis es determinar cuál es el valor pronóstico neto de cada una de las variables** y los resultados se muestra en la tabla 9. En primer lugar se muestra la significación de los modelos univariantes realizados con cada una de las variables y, a continuación, se analiza si para cada variable localizada en una fila la inclusión de una segunda variable localizada en columnas (modelo multivariante) aporta información. Los modelos multivariantes se comparan con los univariantes mediante el test de razón de verosimilitud. Cuando éste es significativo indica que la segunda variable introducida añade información a la primera y, por tanto, sus valores pronósticos son independientes. Por ejemplo, el test de razón de verosimilitud que compara Dukes con Dukes+p53 tiene una significación de 0.017, lo que indica que p53 aporta información a la predicción de supervivencia que hace el estadio de Dukes.

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

MODELOS UNIVARIANTES		MODELOS MULTIVARIANTES (TEST DE RAZÓN DE VEROSIMILITUD)			
variables	P	+ DUKES	+ p53	+ GDF	+ AI
DUKES	<0.001	-	0.017	0.047	NS
p53	0.015	<0.001	-	NS	0.046
GDF	0.076	<0.001	0.032	-	0.030
AI	0.026	<0.001	0.026	0.088	-

Las conclusiones más importantes que se extraen de esta tabla son:

- **El estadio de Dukes es la variable que mejor predice el riesgo de muerte.** Siempre que se introduce como segunda variable incrementa considerablemente la capacidad predictiva del modelo. Esto se debe a que en este análisis se consideran los tumores con metástasis (estadio de Dukes D), los cuales tienen un riesgo de muerte elevadísimo.
- A pesar de la capacidad predictiva del estadio de Dukes, **las mutaciones en p53 y el GDF muestran una relación con supervivencia que no está explicada por el estadio de Dukes.**
- El valor pronóstico del AI está incluido dentro del estadio de Dukes y el valor pronóstico del GDF está incluido dentro de las mutaciones en p53. Esto no es de extrañar ya que previamente se había comprobado que existía una clara relación entre el estadio de Dukes y valores elevados de AI, por un lado, y mutaciones en p53 y valores elevados de GDF, por otro (ver tabla 5). Es decir, **cuando se consideran todos los tumores, el AI y el GDF muestran menor relación con el riesgo de muerte que el estadio de Dukes y las mutaciones en p53, respectivamente.**
- La información sobre el riesgo de muerte que proporcionan AI y p53 es independiente. Esta observación concreta es consecuencia de una observación más general que resume los resultados de la tabla: **el estadio de Dukes (y en menor grado el AI) y las mutaciones en p53 (y en menor grado el GDF) predicen de forma independiente y complementaria el riesgo de muerte de los tumores aneuploides.**

5. ANÁLISIS ESPECÍFICO DE MARCADORES OBTENIDOS POR AP-PCR

Los marcadores obtenidos por AP-PCR son las bandas que aparecen en los distintos *fingerprints*, las cuales se pueden identificar de acuerdo con la posición relativa que ocupan unas respecto a otras. Prácticamente todas las bandas estudiadas presentan alteraciones en más de un tumor, sin embargo tan sólo 6 sufren cambios en más de un 40% de los tumores. Si consideramos ganancias y pérdidas de intensidad por separado, únicamente 4 bandas presentan pérdidas y 5 bandas presentan ganancias en más de un 25% de los casos. Por tanto, **ninguna de las alteraciones que hemos encontrado se da de forma generalizada en la mayoría de casos**. Por otra parte, se observan distintos comportamientos mutacionales característicos: bandas que presentan arbitrariamente ganancias y pérdidas de intensidad en un número elevado de tumores, bandas con ganancias recurrentes y bandas con pérdidas recurrentes.

La información contenida en las bandas de AP-PCR se ha utilizado con dos propósitos:

- la identificación de regiones genómicas con cambios recurrentes y potencialmente asociadas a alteraciones en genes relevantes para el cáncer (apartado 5.1)
- la caracterización de los perfiles moleculares de los distintos grupos de tumores según la clasificación por daño genómico (diploides, aneuploides de bajo daño genómico y aneuploides de alto daño genómico (apartado 5.2)

5.1 SELECCIÓN Y MAPAJE DE BANDAS EN FUNCIÓN DE SU LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA Y SUS ASOCIACIONES CON VARIABLES DE INTERÉS

Localización cromosómica

Se llevó a cabo por paneles de híbridos monosómicos humano / roedor analizados con los *primers* de AP-PCR (figura 18). No todas las bandas del DNA humano pueden ser identificadas de forma definitiva en los híbridos, por lo que de las 181 bandas analizadas sólo se pudo determinar la localización de 84.

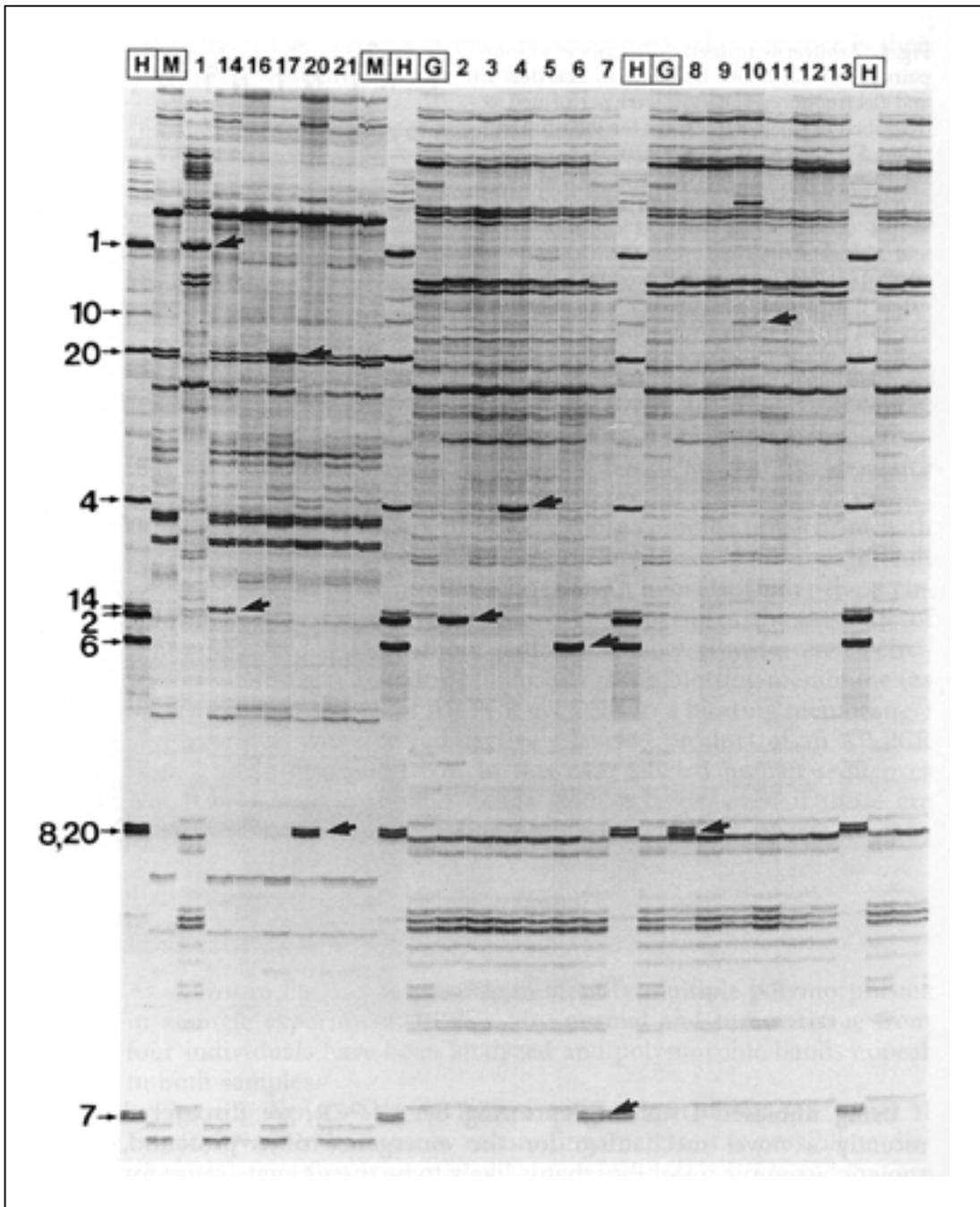


Figura 18. Localización cromosómica de bandas de AP-PCR mediante el panel de híbridos monosómicos humano/roedor. Los carriles marcados con letras corresponden a DNA genómico humano (H), de hamster (G) y de ratón (M). Los números de los carriles indican el cromosoma humano presente en las células híbridas. Las flechas muestran las secuencias humanas que aparecen en el fingerprint de roedor de los híbridos. Los números en el margen izquierdo indican el número del cromosoma en el que se encuentra localizada cada banda.

El número de bandas localizadas en cada cromosoma disminuyó proporcionalmente al tamaño de estos, lo que demuestra la naturaleza aleatoria de los fragmentos amplificados en la reacción de AP-PCR. Hay que tener en cuenta que algunas de las bandas son dobletes (posiblemente las dos cadenas de la misma secuencia) y que se consideraron de forma independiente ya que constituyen un control interno de la técnica. La representación del porcentaje de casos en los que cada banda presenta ganancias y pérdidas (alelotipo) permite obtener una **visión global de las alteraciones que ocurren en el genoma de los tumores analizados**, especialmente si las bandas se organizan en función de su localización cromosómica (figura 19).

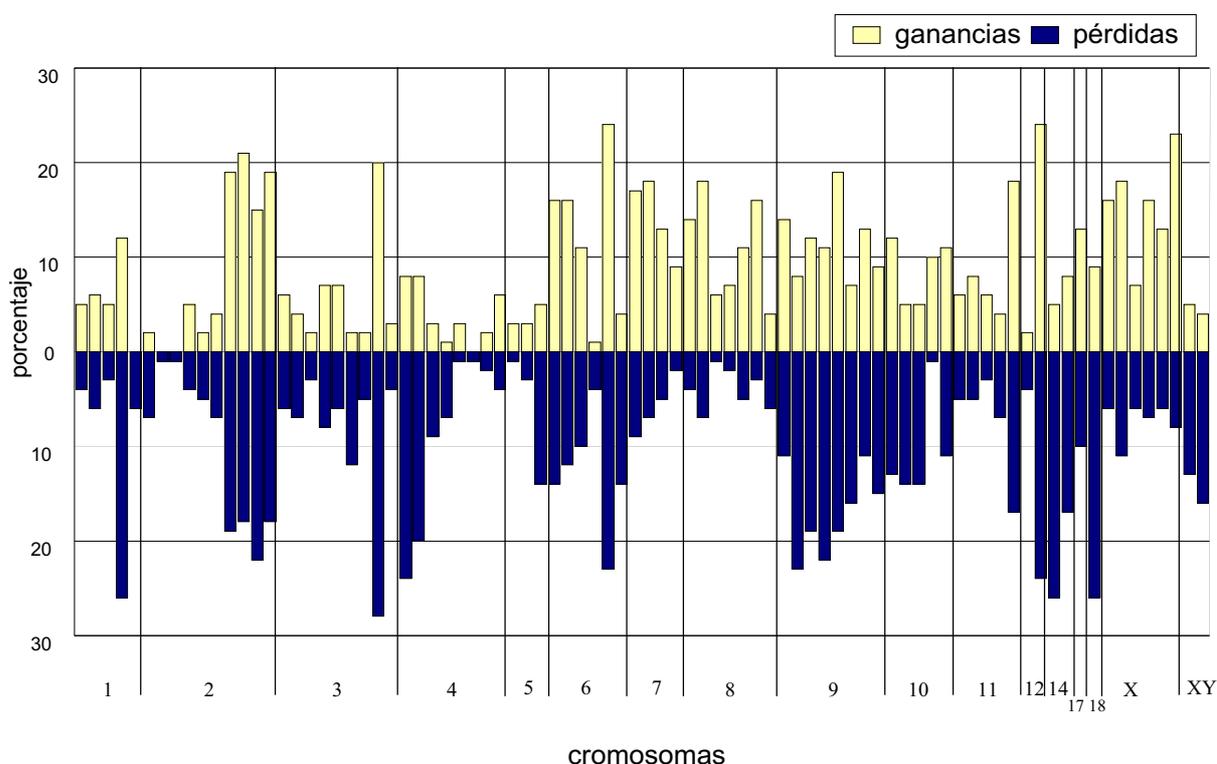


Figura 19. Alelotipo de las bandas localizadas cromosómicamente. Barras superiores: porcentaje de casos en los que las bandas presentan ganancias. Barras inferiores: porcentaje de casos en los que las bandas presentan pérdidas.

Observando el alelotipo se pueden identificar fácilmente las diferencias entre las alteraciones que sufren los distintos cromosomas. Las más evidentes son:

- ganancias frecuentes en la mayoría de bandas de los cromosomas 7, 8 y X
- elevada frecuencia de bandas con cambios arbitrarios en los cromosomas 2, 6 y 9
- pérdidas importantes en bandas concretas de los cromosomas 4, 14 y 18
- existencia de bandas aisladas con alto porcentaje de cambios arbitrarios en cromosomas mayoritariamente estables como el 3 o el 11

Asociación con las variables de interés

Se analizó la relación de cada una de las bandas con todas las variables incluidas en el estudio. Las bandas que proporcionaron resultados más interesantes fueron las siguientes:

- **banda 91/92 (cromosoma 9):** presenta arbitrariamente ganancias y pérdidas de intensidad en un número elevado de tumores (aproximadamente en un 20% de los tumores presenta ganancias de intensidad y en un 20% pérdidas). Tanto las ganancias como las pérdidas se asocian a mutaciones en p53, a elevado GDF y a elevado AI. Los tumores aneuploides que presentan alteraciones en esta banda muestran una disminución de la supervivencia. Sorprendentemente las ganancias son mucho más frecuentes en mujeres.
- **banda 55/56 y banda 78 (cromosoma 8):** presentan ganancias de intensidad en aproximadamente un 15% de los tumores y se asocian a peor pronóstico.
- **banda 46 (cromosoma X):** presenta ganancias de intensidad en un 16% de los tumores, pero si seleccionamos sólo los tumores aneuploides de alto daño genómico (ver apartado 5.2) este porcentaje asciende al 25%. Los tumores aneuploides con ganancias de intensidad en esta banda muestran peor pronóstico.

Un estudio detallado del valor pronóstico de estas bandas permitió averiguar que la banda 91/92 no aportaba ninguna información adicional a la obtenida con el GDF y el AI, mientras que el resto de bandas sí lo hacían. La información de las bandas 55/56 y 78 era redundante, por lo que para este análisis se decidió escoger la banda 78, que era la que mostraba mejor valor pronóstico. Las **bandas 46 y 78** presentaban un valor pronóstico independiente y, además, **no había coincidencia entre los casos aneuploides que mostraban ganancias de intensidad para alguna de las dos bandas** (20 casos de 67). Estos casos **tenían muy mal pronóstico** (sólo para R0: log rank $P=0.001$), el cual era independiente del estadio de Dukes ($P=0.002$), de la invasión de nódulos linfáticos ($P=0.001$), del GDF ($P=0.007$) y del AI ($P=0.003$). Además estos casos tenían una media de edad mucho más avanzada (ANOVA $P=0.004$).

Selección y mapaje de bandas de interés

Basándonos en los resultados expuestos en el apartado anterior decidimos centrar el estudio en el análisis de **las bandas contenidas en los cromosomas 8, 9 y X**. Se procedió al clonaje, a la secuenciación y a la búsqueda de homología de las 13 bandas que se encuentran localizadas en estos cromosomas (4 en el cromosoma 8, 4 en el cromosoma 9 y 5 en el cromosoma X). Después se realizó la localización subcromosómica mediante el uso de paneles de híbridos irradiados analizados con los correspondientes *primers* de las reacciones de AP-PCR o bien con los *primers* deducidos a partir de la secuencia de las bandas. Debido a inconvenientes técnicos sólo se consiguió mapar de forma inequívoca una banda del cromosoma 8 (en **8q13.2** (D8S1776)), dos bandas del cromosoma 9 (una en **9p24.1** (D9S2065) y otra en **9q22.31-9q22.33** (D9S2019)) y tres bandas del cromosoma X (una en **Xp11.3** (DXS877) y dos en **Xp21.2 - Xp21.3** (DXS9746 y DXS1214)). La secuencia de estas bandas se muestra en el apéndice 2. La importancia de estas regiones en la progresión del cáncer colorrectal se discute en el apartado 5.2 de Discusión.

5.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS PERFILES MOLECULARES DE LOS TUMORES DIPLOIDES, ANEUPLOIDES DE BAJO DAÑO GENÓMICO Y ANEUPLOIDES DE ALTO DAÑO GENÓMICO

Uno de los objetivos más importantes de este trabajo es clasificar los tumores en función del daño genómico. A la luz de nuestros resultados la clasificación de los tumores que tiene un mayor sentido biológico es la siguiente: **tumores diploides, aneuploides de bajo daño genómico y aneuploides de alto daño genómico** (ver apartado 4.1.4 de Resultados). En este apartado **se analizan los marcadores moleculares obtenidos en la AP-PCR que sufren alteraciones diferenciales en los tres grupos de casos**. Estos marcadores pueden aportar información acerca del tipo de alteraciones genéticas que sufren los grupos de tumores y, por tanto, pueden ayudar a caracterizar el perfil molecular de cada uno de ellos. Para ello se realizó el alelotipo por separado de los tumores diploides, los aneuploides de bajo daño genómico y los aneuploides de alto daño genómico. Luego se compararon banda por banda y a continuación se seleccionaron aquellas que presentaban diferencias en alguno de los tres grupos. Los resultados se muestran en la figura 20.

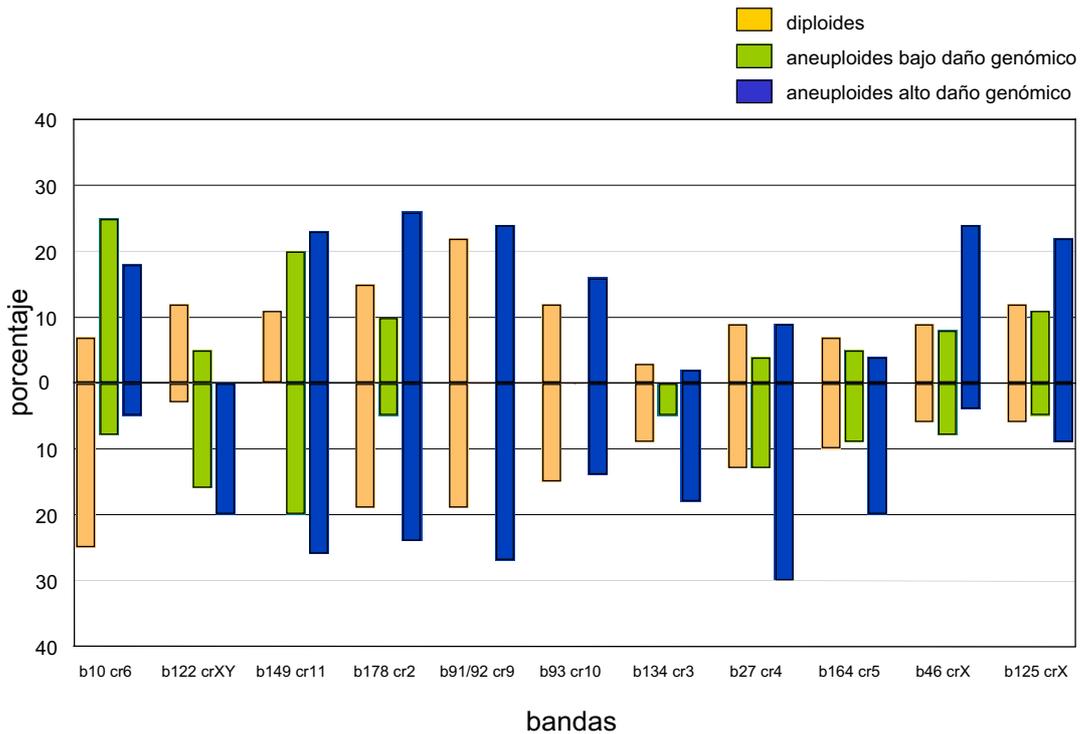


Figura 20. Bandas con comportamiento diferencial en casos diploides (naranja), aneuploides de bajo daño genómico (verde) y aneuploides de alto daño genómico (azul). Barras superiores: porcentaje de casos en los que las bandas presentan ganancias. Barras inferiores: porcentaje de casos en los que las bandas presentan pérdidas.

No son abundantes las bandas que presentan alteraciones diferentes entre tumores diploides y aneuploides. En la figura se destacan las tres más claras y se puede apreciar su heterogeneidad: la banda 10 presenta pérdida de intensidad en diploides y ganancia en aneuploides, la banda 122 se comporta de forma inversa y la banda 149 prácticamente no se altera en diploides mientras que es muy inestable en aneuploides. Por tanto, a nivel molecular resulta complejo establecer diferencias entre los tumores diploides y los aneuploides. Por otro lado, destaca la ausencia total o casi total de alteraciones de las bandas 178, 91/92 y 93 en los tumores aneuploides de bajo daño genómico, que contrasta con la elevada frecuencia de cambios en los tumores diploides y aneuploides de alto daño genómico. Este comportamiento es muy interesante sobre todo desde el punto de vista de los tumores aneuploides, ya que son bandas que se asocian a la presencia de daño genómico (ya sea del tipo GDF o AI) y, por tanto, podrían jugar algún papel en la progresión de los casos aneuploides hacia la malignidad. Por el mismo motivo también resultan interesantes las bandas que en tumores diploides y aneuploides de bajo daño genómico presentan muy pocas ganancias (bandas 46 y 125) o pérdidas (bandas 134, 27 y 164) de intensidad y aumentan su frecuencia de alteraciones cuando

se trata de tumores aneuploides de alto daño genómico. **Estos datos sugieren que la clasificación de los tumores en base al daño genómico además de identificar comportamientos biológicos distintos también permite obtener perfiles moleculares concretos de cada clase de daño.**

6. ANÁLISIS RELACIONADOS CON LA PROGRESIÓN TUMORAL

6.1 APLICACIÓN DE LA CLASIFICACIÓN CITOGENÉTICA

Con la intención de profundizar en las diferentes vías de progresión tumoral existentes en el cáncer colorrectal decidimos analizar nuestra serie de tumores en función de la clasificación citogenética llevada a cabo por el grupo de Dutrillaux (1995) (ver apartado 2.2.4.2 de Introducción). Aunque no disponíamos del análisis del cariotipo de los tumores, **los datos referentes a la localización del tumor y a la presencia de aneuploidía nos permitieron realizar una clasificación aproximada a la citogenética.** Según ésta, los tumores localizados en el colon izquierdo son monosómicos, mientras que los localizados en el colon derecho son en su mayoría de cariotipo normal o trisómicos, aunque también se encuentran algunos monosómicos (Muleris et al, 1990b). Los tumores del recto se consideran aparte. Por otro lado, mientras que los tumores monosómicos podrían responder a contenido de DNA por citometría de flujo tanto diploide como aneuploide, los tumores de cariotipo normal serían diploides y los tumores trisómicos aneuploides. Hay que tener en cuenta que el límite de detección de la citometría de flujo se encuentra en ganancias de dos a tres cromosomas y, por tanto, estaríamos produciendo cierto error al considerar como tumores de cariotipo normal los tumores trisómicos con ganancias de uno o dos cromosomas. Teniendo en cuenta estas limitaciones, decidimos establecer la clasificación de la siguiente manera:

1. **tumores Normal Type-like (NT-like):** tumores diploides localizados en el colon derecho (14 casos, 10.9%)
2. **tumores Trisomic Type-like (TT-like):** tumores aneuploides localizados en el colon derecho (26 casos, 20.2%)
3. **tumores Monosomic Type-like (MT-like):** tumores localizados en el colon izquierdo (diploides y aneuploides) (40 casos, 31%)
4. **tumores localizados en el recto** (49 casos, 38%)

Al principio los tumores MT-like diploides y aneuploides se consideraron como categorías separadas, pero al comprobar que sus características eran muy similares decidimos juntarlos en un solo grupo. En el estudio de Muleris et al (1990b) los porcentajes de cada tipo de tumor sin contar los localizados en el recto fueron: NT 11%, TT 13% y MT 76%. En nuestro trabajo, descartando los tumores de recto, los porcentajes encontrados de tumores NT-like, TT-like y MT-like fueron 17.5%, 32.5% y 50% respectivamente. La principal diferencia reside en que aumenta el porcentaje de TT-like y disminuye el de MT-like. Esto es debido a que dentro de los tumores TT-like incluimos todos los tumores aneuploides que se encuentran a la derecha y no todos ellos son trisómicos, ya que también se han descrito tumores monosómicos en esta localización (Muleris et al, 1990b).

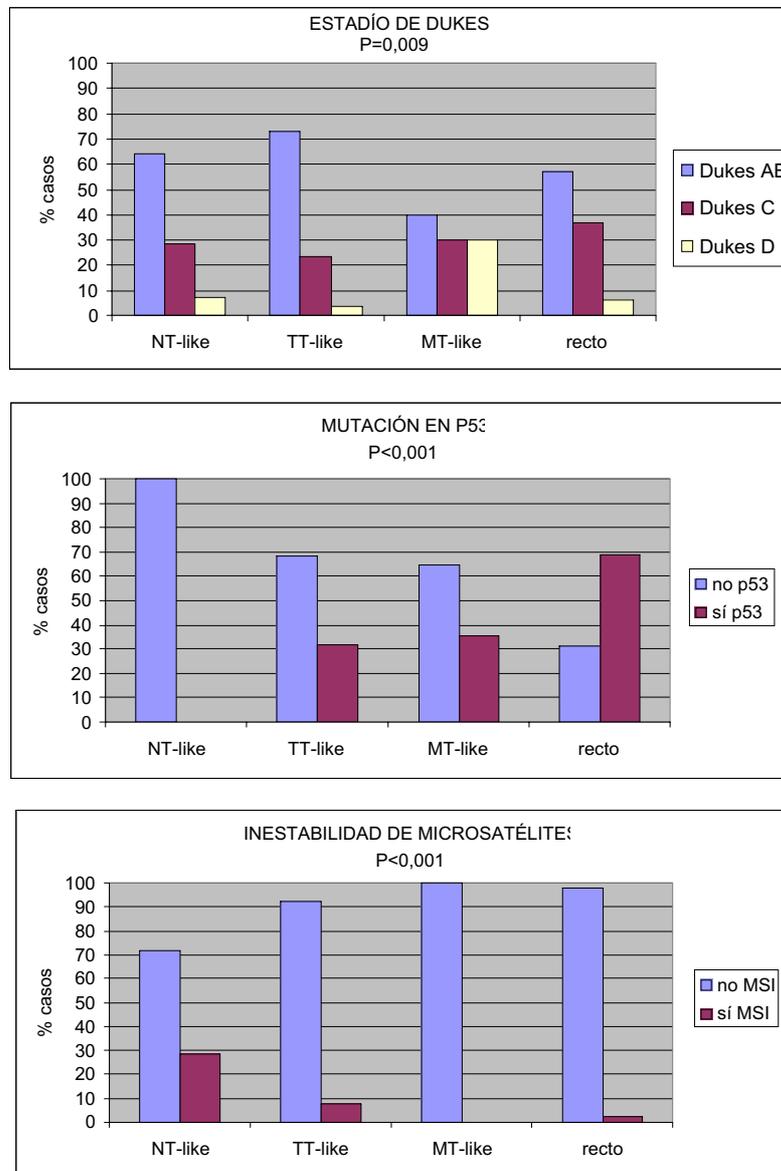


Figura 21. Asociaciones entre la clasificación de origen citogenético y el estadio de Dukes (a), las mutaciones en p53 (b) y la inestabilidad de microsátélites (c).

Al estudiar las asociaciones con el resto de variables pudimos comprobar que, efectivamente, **estos grupos presentaban unas características clínicas y moleculares diferenciales entre ellos** (figura 21). Tal y como ya había sido descrito, los tumores con inestabilidad de microsatélites pertenecían a los grupos NT-like y TT-like, aunque también se encontró uno en el recto. Respecto a las mutaciones en p53 encontramos algunas discrepancias con los datos publicados. Mientras que los tumores NT-like no muestran ninguna mutación, los tumores TT-like y los MT-like presentan un porcentaje muy parecido (alrededor del 32%). Curiosamente los tumores localizados en el recto muestran un porcentaje de mutaciones muy elevado (casi un 70%). También se encuentran diferencias respecto al estadio de Dukes. En este caso los tumores TT-like y NT-like muestran una distribución muy similar y son los tumores MT-like los que claramente se diferencian debido a que se encuentran en estadios de Dukes más avanzados. No se encontró ninguna diferencia significativa entre el grado de GDF ni el nivel de supervivencia de los cuatro grupos.

Para validar la aplicación de esta clasificación en nuestra serie de tumores sería necesario llevar a cabo estudios específicos a nivel cromosómico. Como hemos dicho antes, los tumores no se analizaron citogenéticamente, pero sí que se realizaron **dos aproximaciones de carácter cromosómico** que aportaron datos de interés:

1. Se estudiaron las **bandas de AP-PCR** que presentaban comportamiento diferencial entre tumores TT-like y MT-like y se encontraron tres de ellas que se **localizaban en los cromosomas 1, 9 y 14 y que** se comportaban tal y como se había predicho a nivel citogenético, es decir, con pérdidas mucho más frecuentes en los tumores monosómicos que en los trisómicos.
2. Se analizaron **por hibridación genómica comparada cuatro tumores supuestamente monosómicos** debido a su localización en el colon izquierdo. Dos de ellos eran aneuploides y dos diploides (por citometría de flujo). Los resultados de la hibridación genómica comparada mostraron que los cuatro **presentaban las alteraciones características de tumores monosómicos** (la figura 22 muestra el perfil de uno de los tumores diploides).

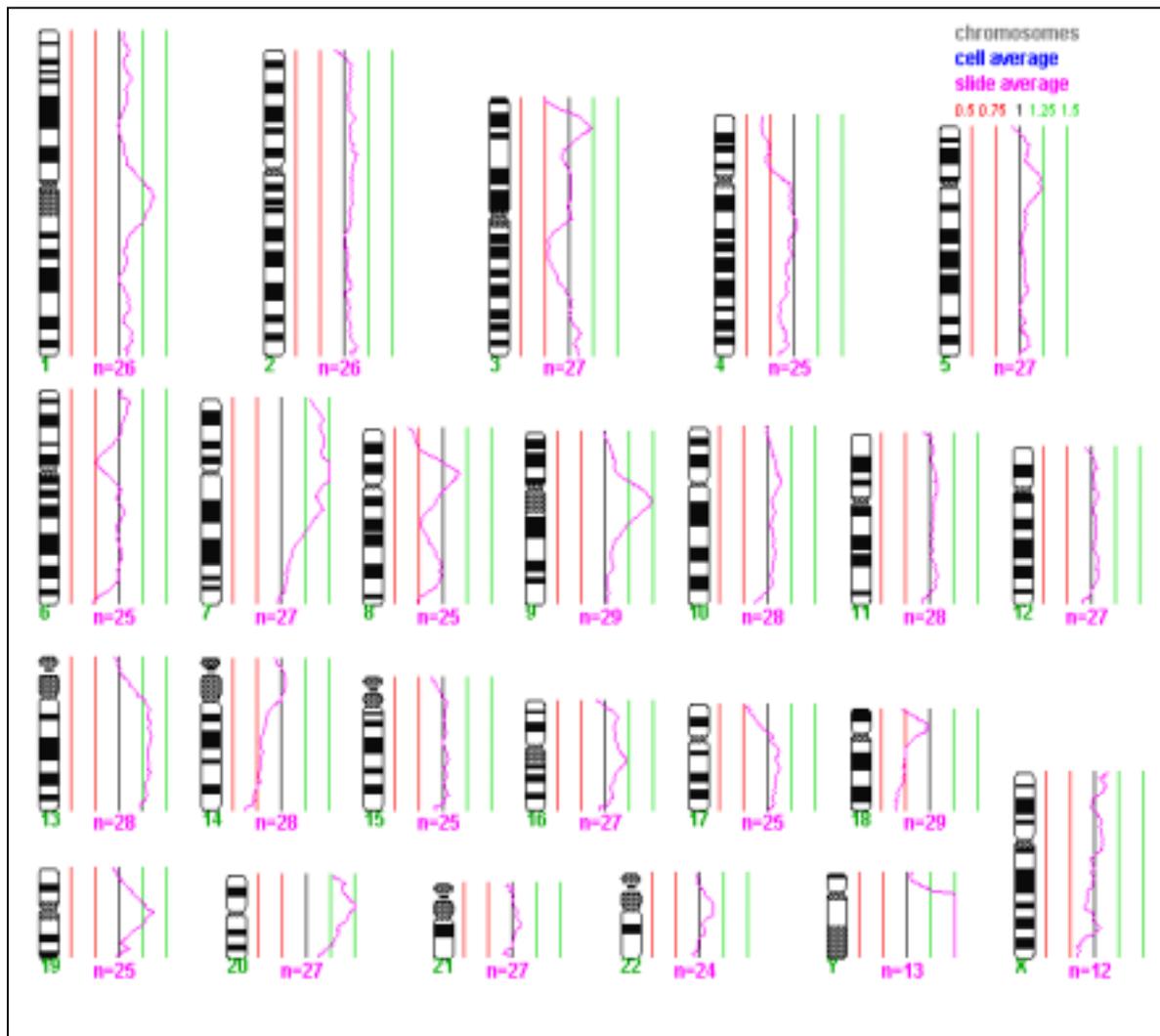


Figura 22. CGH de un tumor diploide localizado en el colon izquierdo.

En conjunto podemos decir que **la adaptación de la clasificación de Dutrillaux a nuestra serie de tumores tiene un sentido biológico y que aporta información adicional a los resultados previamente obtenidos en este estudio.** Sería necesario llevar a cabo nuevos análisis estadísticos que determinaran el grado de solapamiento entre las diferentes vías de progresión definidas, pero el tamaño de muestra de este estudio es insuficiente para la realización de nuevas subclasificaciones.

6.2 ANÁLISIS DE LA PLOIDÍA EN LA PROGRESIÓN TUMORAL

La utilidad que hemos observado del AI como factor pronóstico sugiere que tanto el porcentaje de células aneuploides como su contenido en DNA reflejan la agresividad del tumor. **Para estudiar cuál es el papel de la aneuploidía en el proceso metastático se analizó el contenido de DNA de 23 tumores primarios (8 diploides y 15 aneuploides) con sus correspondientes metástasis.** Todos los tumores diploides ($n=8$) se diseminaron sin prácticamente cambiar el *estatus* de ploidía. En seis casos el tumor primario y la metástasis fueron exclusivamente diploides (figura 23a) y en los dos casos restantes las metástasis presentaban una pequeña proporción de células tetraploides (figura 23b). Respecto a los tumores aneuploides ($n=15$), no se observaron diferencias entre los valores de los tres índices en tumores primarios y sus correspondientes metástasis (DI de tumores: 1.64 ± 0.39 , DI de metástasis: 1.50 ± 0.38 ; CI de tumores: 0.31 ± 0.28 , CI de metástasis: 0.24 ± 0.31 ; AI de tumores: 1.25 ± 0.22 , AI de metástasis: 1.18 ± 0.26). De los 15 casos, 11 originaron metástasis con poblaciones tanto diploides como aneuploides (figura 23c) y sólo dos tumores, aquellos con los valores de AI más altos, produjeron metástasis compuestas en su mayoría por células aneuploides (figura 23d). Finalmente, es necesario destacar que en dos casos originados a partir de tumores primarios con poblaciones aneuploides las metástasis estaban compuestas exclusivamente de células diploides. Por tanto se puede concluir que **el estado de ploidía de los tumores primarios se mantiene de manera muy similar en las metástasis.** Además, **dado que la mayoría de metástasis presenta una población de células diploides es presumible que se hayan originado a partir de células tumorales diploides**, independientemente del contenido de DNA del correspondiente tumor primario.

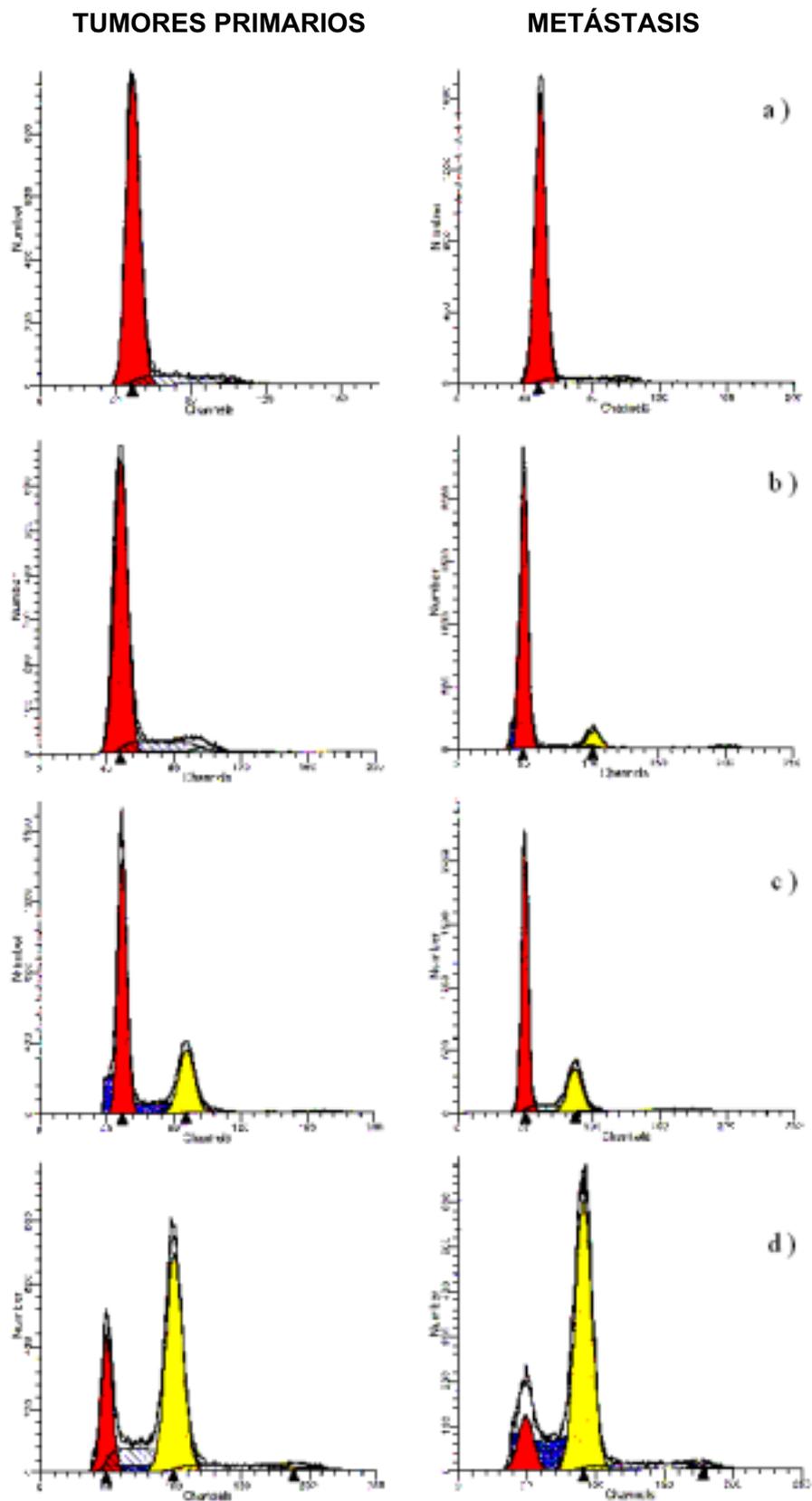


Figura 23. Análisis por citometría de flujo de cuatro tumores primarios (izquierda) con sus correspondientes metástasis (derecha). Los histogramas se generaron mediante el programa Mod Fit (ver Material y Métodos). El estado de ploidía de las muestras es: a) tumor primario y metástasis diploides; b) tumor primario diploide con un bajo porcentaje de células tetraploides en la metástasis; c) y d) en el tumor primario y en la metástasis coexisten poblaciones de células diploides y aneuploides.

DISCUSIÓN

La inestabilidad genómica presente en los tumores es la responsable de la producción de heterogeneidad genética. Esta heterogeneidad implica la existencia de múltiples variantes celulares que emergen a lo largo de la evolución tumoral y entre las cuales sólo las mejor adaptadas a la supervivencia son seleccionadas (Nowell, 1976). Este proceso de mutación y selección constituye la base de la progresión tumoral y es responsable de la ineficacia de muchos de los tratamientos habitualmente utilizados contra el cáncer (Leith y Dexter, 1986). Se ha postulado la existencia de diferentes mecanismos de producción de inestabilidad genómica, lo que probablemente implicaría la existencia de diferentes vías de progresión tumoral (Loeb y Loeb, 2000).

La consecuencia directa de la inestabilidad genómica presente en los tumores es el daño genómico, de manera que la cuantificación y caracterización del segundo nos da una estimación de la primera. Además, diferentes estudios que han llevado a cabo la cuantificación del daño genómico con diferentes metodologías han demostrado que existe una relación entre el aumento del daño genómico y la malignidad de los tumores (ver apartado 1.2.2 de Introducción). Por estos motivos, el estudio del daño genómico reviste una doble importancia: por una parte, como marcador pronóstico de la enfermedad y, por otra, como elemento esencial para entender las diferentes vías moleculares que llevan al desarrollo del cáncer.

1. APROXIMACIONES METODOLÓGICAS AL ANÁLISIS DEL DAÑO GENÓMICO

Existen diferentes técnicas para evaluar el daño genómico presente en los tumores. Como el daño genómico puede ser de naturaleza muy distinta, la mejor manera de clasificar estas técnicas es en base a las alteraciones que analizan (ver apartado 1.2.2 de Introducción). **En este estudio nos hemos centrado en el análisis del daño genético por** dos de estas técnicas: la **citometría de flujo** y la **AP-PCR**, ya que se consideraron que eran las que mejor combinaban los requisitos de fácil aplicabilidad, dada la intención de procesar un elevado número de muestras, y máxima obtención de información (complementariedad). Además, en ambos casos, estudios previos han sugerido un posible valor pronóstico del daño genómico medido por estas técnicas (Bauer et al, 1993; Arribas et al, 1997).

1.1 UTILIDAD DEL AI COMO NUEVO ÍNDICE DE CUANTIFICACIÓN DE ANEUPLOIDÍA

El valor pronóstico de la determinación del contenido de DNA por citometría de flujo ha sido intensamente estudiado sin llegar a ninguna conclusión válida debido a la contradicción entre los diferentes resultados obtenidos (ASCO, 1996; Compton et al, 2000). Para explicar estas discrepancias se han sugerido diferentes factores de carácter metodológico (Bauer et al, 1993), pero nosotros creemos que, además, existe otra **explicación** de carácter conceptual: el **uso inapropiado del contenido de DNA de la población más aneuploide (DNA index) como medida de la aneuploidía del tumor**. Este índice se basa en las evidencias experimentales que sugieren que las células más aneuploides son las que poseen el mayor potencial maligno (Lengauer et al, 1997; Duesberg et al, 1998) resultando en un aumento de la agresividad tumoral (Cifone y Fidler, 1981). Sin embargo, otros estudios han demostrado que las células más invasivas (metastáticas) no surgen, necesariamente, de la población más aneuploide (Tollenaar et al, 1997; Scott et al, 1998), dejando abierta la posibilidad de que la población que presenta un cariotipo altamente anormal pueda representar un grupo de células aberrantes no necesariamente viable (Scott et al, 1998). Por otra parte, está ampliamente aceptado que los tumores son heterogéneos y se ha demostrado que es la heterogeneidad más que el grado de aneuploidía lo que se asocia con peor pronóstico en diferentes tipos de tumores (revisado en Heppner y Miller, 1998). Según esto, para tener una estimación precisa del grado de aneuploidía de un tumor sería necesario llevar a cabo el análisis de múltiples muestras, lo cual es laborioso, caro y probablemente difícilmente realizable desde el punto de vista de su aplicación clínica.

En este estudio hemos desarrollado un nuevo índice que, aunque no es tan preciso como el muestreo múltiple, **es una medida aproximada de la aneuploidía global del tumor**. Considerando que el tamaño de la subpoblación aneuploide puede variar considerablemente de un tumor a otro, **el Aneuploidy Index (AI) tiene en cuenta no sólo el contenido anormal de DNA de la subpoblación aneuploide (DNA index clásico) sino también su extensión en el tumor**. Debido a que engloba ambos aspectos, **este índice es más probable que refleje mejor la inestabilidad cromosómica intrínseca del tumor que el DNA index**. Se calcula fácilmente como el DNA index corregido respecto a las áreas de los picos diploide y aneuploide. Para minimizar el error en el cálculo del AI producido por la contaminación de células normales, el análisis de la ploidía se llevó a cabo en áreas seleccionadas del frente de infiltración del tumor. Un mapaje exhaustivo permitió descartar las zonas de tejido

necrótico o con alto componente inflamatorio, lo cual permite afirmar que **la mayoría de células que contribuyen al pico diploide son neoplásicas**. Sin embargo, a pesar del enriquecimiento en células tumorales, todas las muestras contienen una pequeña población de células no tumorales, principalmente linfocitos infiltrantes, los cuales son fácilmente detectables en los histogramas debido a que presentan diferentes propiedades de dispersión de la luz. Esta población, que constituye un control interno diploide, fue excluida del análisis de células tumorales. Para confirmar con mayor seguridad que las células seleccionadas eran de origen epitelial, varios de los casos que habían sido analizados previamente a partir de parafinas y de los que se disponía también de material congelado en OCT fueron procesados usando una técnica de doble tinción de citoqueratinas y DNA (esta técnica no produce resultados satisfactorios al aplicarla en tumores parafinados y por ese motivo se usaron tumores congelados). Las células altamente inmunoreactivas y, por tanto, de origen epitelial, mostraron unos *ratios* diploide/aneuploide muy similares a los obtenidos en el análisis de tumores parafinados, demostrando la validez de los análisis realizados.

Esta nueva manera de cuantificar la aneuploidía se basa en la idea de que la estimación de la agresividad del tumor asociada a inestabilidad genómica debe considerar el daño genético de todas las subpoblaciones celulares del tumor. En este sentido, Lengauer et al (1998) desarrollaron los conceptos de 'estado' y 'tasa' para explicar el significado de la inestabilidad genómica en la evolución del tumor (ver apartado 2.2 de Introducción). **La 'tasa' aneuploide** (el parámetro que determina el grado de inestabilidad) **está mejor definida por el AI porque mide el grado de anormalidad** (contenido de DNA) **pero teniendo en cuenta su ocurrencia relativa** (proporción relativa de células diploides/aneuploides). Por tanto, un incremento en la tasa de mutación (más alteraciones cromosómicas por célula y una mayor proporción de células aneuploides) resultaría en un aumento de la heterogeneidad tumoral y, en consecuencia, potenciaría la progresión tumoral (Lengauer et al, 1998). En el mismo sentido, la heterogeneidad a nivel de ploidía, como un resultado de la inestabilidad cromosómica, ha sido asociada con peor pronóstico en el cáncer colorrectal (Cosimelli et al, 1998; Flyger et al, 1999).

1.2 VENTAJAS DE LA AP-PCR EN LA CUANTIFICACIÓN DEL DAÑO GENÓMICO

El GDF cuantifica la fracción de alteraciones presentes en un tumor y detectadas por AP-PCR, las cuales pueden corresponder a amplificaciones y deleciones de fragmentos de DNA, así como translocaciones y mutaciones puntuales que ocurran en el lugar de *annealing* del *primer* (Peinado et al, 1992). La caracterización de las secuencias alteradas muestra, sin embargo, que la mayoría de las alteraciones detectadas por AP-PCR corresponden a desequilibrios alélicos. La aleatoriedad de los fragmentos amplificados, demostrado por el hecho de que se distribuyen al azar en los diferentes cromosomas y en número proporcional al tamaño de éstos, indica que **la AP-PCR es una técnica adecuada para obtener una estimación global del daño genómico.**

Otra aproximación conceptualmente similar a la AP-PCR es el estudio de la FAL. La FAL contabiliza pérdidas alélicas que ocurren a lo largo de todo el genoma mediante el análisis de marcadores de RFLP localizados en todos los brazos cromosómicos (Vogelstein et al, 1989; Kern et al, 1989) (ver apartado 1.2.2 de Introducción). **La AP-PCR presenta tres ventajas importantes respecto al análisis de la FAL.** En primer lugar es una técnica mucho más **rápida y sencilla** de aplicar. Mientras que con la AP-PCR bastan 3 reacciones de PCR para obtener más de 100 marcadores informativos distribuidos al azar por el genoma, con la FAL se necesita un experimento por marcador. En segundo lugar, la AP-PCR permite la **cuantificación de pérdidas y ganancias alélicas**, de manera que la información obtenida es mucho más completa. En tercer lugar, **las alteraciones detectadas por AP-PCR son proporcionales al daño que existe en el tumor**, mientras que en la FAL las pérdidas en cromosomas pequeños están sobrevaloradas. A pesar de los inconvenientes de la FAL, esta aproximación fue aplicada con éxito en un grupo considerable de tumores y sirvió para demostrar la asociación entre daño genómico y mal pronóstico. Más tarde la aplicación de la AP-PCR en series amplias de tumores ha permitido confirmar esta asociación y profundizar en su significado.

El análisis de las alteraciones a nivel cromosómico es otra posibilidad a considerar a la hora de cuantificar el daño genómico de los tumores. A este nivel nos encontramos con tres técnicas útiles: la citogenética clásica, el FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) y la CGH. La **citogenética clásica** presenta la ventaja de ofrecer una visión global de todas las alteraciones cromosómicas que ocurren en las células tumorales, pero tiene la desventaja de que sólo se puede realizar en células en cultivo y que, además, **la obtención de metafases de calidad a partir de tumores sólidos es difícil.** Por otro lado, el **FISH** permite el análisis tanto de células en división como en interfase, incluyendo

muestras parafinadas, pero **no es una técnica propiamente de screening de alteraciones**, sino que está dirigida a analizar alteraciones específicas (Heim et al, 1995). Por último, la **CGH** presenta la ventaja de que, simplemente partiendo de DNA tumoral y DNA normal, permite una visión global de las amplificaciones y deleciones que ocurren en los diferentes cromosomas (Kallioniemi et al, 1993). Respecto a la citogenética clásica presenta el inconveniente de que no puede detectar las reorganizaciones equilibradas y de que el resultado que se obtiene no refleja la heterogeneidad tumoral, si no que es una media teórica de las alteraciones presentes en el tumor. Si la comparamos con la AP-PCR, la cual también es una técnica de *screening* del daño genómico global del tumor, observamos que **el tamaño mínimo de las alteraciones detectadas por CGH (10 Mb) es sensiblemente superior al de la AP-PCR (aproximadamente 200 pb)**. También hay que tener en cuenta que la CGH es una técnica cara y que requiere metodología sofisticada. Por todos estos motivos la CGH no fue una técnica de elección a la hora de realizar el estudio, pero sí que se consideró como una posibilidad muy útil para confirmar hipótesis (tal y como se ha hecho en el caso de los tumores trisómicos y monosómicos, ver apartado 6.1 de Resultados) y, tras la obtención de estos resultados parece conveniente extender su aplicación a un mayor número de tumores con la finalidad de completar y confirmar las conclusiones obtenidas.

Por último hay que tener en cuenta que en el estudio del daño genómico se han abierto muchas posibilidades gracias al desarrollo de la **tecnología de microarrays**. Las microarrays aplicadas al estudio del cáncer consisten en la hibridación competitiva de mRNA o DNA total de tejido normal y tumoral sobre una matriz de múltiples puntos (hasta 14000) que contienen parte de la secuencia de genes del genoma humano. Aunque es una técnica todavía en desarrollo, ya han aparecido trabajos que identifican patrones alterados, tanto a nivel de mRNA como de DNA, en diferentes tipos de tumores (Pollack et al, 1999; Alon et al, 1999; Alizadeh et al, 2000; Hernandez et al, 2000). Es previsible que en un futuro próximo las microarrays constituyan una **herramienta muy útil para el estudio del daño genómico presente en los tumores**.

2. VALOR PRONÓSTICO DE LAS MEDIDAS DE DAÑO GENÓMICO

2.1 CONSIDERACIONES GENERALES

Antes de entrar a discutir el valor pronóstico del AI y del GDF en los tumores colorrectales aneuploides es necesario aclarar algunas cuestiones de carácter general que pueden ayudar a comprender mejor algunos aspectos de este estudio.

Separación de los tumores en diploides y aneuploides

A lo largo de los análisis llevados a cabo hemos ido encontrando **diferentes datos** que **parecen indicar que los tumores diploides presentan unas características de progresión diferentes de los aneuploides**. El primer dato que nos sorprendió fue la disminución drástica en la supervivencia de los tumores diploides al pasar de los estadios de Dukes A-B a Dukes C, lo cual parece indicar que cuando los tumores diploides son capaces de invadir los ganglios linfáticos ya son altamente malignos y poseen una gran capacidad para causar la muerte del individuo. Además, el estudio del número de ganglios linfáticos invadidos reveló que la disminución en la supervivencia tenía lugar con la invasión de un único ganglio linfático, a diferencia de los tumores aneuploides, en los que la mayor mortalidad se asociaba a la invasión de un número elevado (más de 3) ganglios linfáticos. Por tanto, **estos resultados sugieren la existencia de un mecanismo muy eficiente de invasión y diseminación que actúa en los tumores diploides y que es substancialmente diferente del que se da en tumores aneuploides**. Otro dato que confirmó la independencia en la progresión de los tumores diploides respecto a la de los aneuploides fue el efecto diferencial del GDF sobre la supervivencia de ambos grupos. El aumento del GDF produce un aumento del riesgo de muerte en los tumores aneuploides mientras que se asocia a un mejor pronóstico en los diploides. Esta asociación con mejor pronóstico probablemente indica que la vía que siguen los tumores diploides para invadir y metastatizar es independiente, no tan solo de la existencia de aneuploidía, sino también de desequilibrios alélicos. Recientemente se ha publicado un trabajo que también estudia por citometría de flujo una serie de tumores colorrectales y que, coincidiendo con nuestros resultados, encuentran un subgrupo de tumores diploides sin inestabilidad de microsatélites y con muy mal pronóstico al que le atribuyen la posibilidad de constituir una vía de progresión tumoral independiente (Hawkins et al, 2001).

A la vista de estos resultados **parece evidente que los tumores diploides siguen una vía de progresión tumoral diferente de la de los tumores aneuploides y que, por tanto, a la hora de investigar el valor pronóstico de diferentes variables es conveniente considerarlos como un grupo separado.** Estos resultados también advierten del error de considerar todos los tumores diploides como tumores de buen pronóstico y contribuyen a solucionar las contradicciones acerca del valor pronóstico del estado de ploidía (Bauer et al, 1993; ASCO, 1996). De acuerdo con estos resultados, **la separación de los tumores en diploides y aneuploides no tiene valor pronóstico per se, sino que sirve para diferenciar dos vías distintas de progresión tumoral en las que se encuentran tumores con diferentes grados de agresividad.** Las causas de esta agresividad son los distintos factores pronósticos a determinar. Para los tumores aneuploides hemos podido identificar dos factores pronósticos claros: el AI y el GDF, sin embargo para los tumores diploides no hemos encontrado ninguna variable que supere la capacidad predictiva del estadio de Dukes. Se sabe que dentro de los tumores diploides abundan los que pertenecen a la vía de inestabilidad de microsatélites, la cual constituye un mecanismo molecular de progresión tumoral bien definido (Thibodeau et al, 1993; Perucho et al, 1994). Sin embargo, precisamente los tumores pertenecientes a esa vía muestran mejor pronóstico (Halling et al, 1999; González-García et al, 2000; Gryfe et al, 2000).

Selección de las variables con valor pronóstico reconocido

Cualquier nuevo parámetro del que se sospeche una posible utilidad pronóstica tiene que ser comparado con las variables de valor pronóstico reconocido, debido a que si la información que aporta ya está incluida en esas variables no resulta de ninguna utilidad. **La variable con mayor valor pronóstico reconocido es el estadio de Dukes.** Sin embargo, en base a nuestros datos tenemos que hacer unas cuantas puntualizaciones. **El estadio de Dukes tiene elevado valor pronóstico especialmente debido a los tumores en estadio de Dukes D,** los cuales presentan metástasis y, consecuentemente, muy mal pronóstico, tanto si son diploides como aneuploides. Por tanto, si en el estudio se incluyen todos los tumores, la variable de referencia más adecuada para estudiar pronóstico es el estadio de Dukes. Sin embargo, **precisamente por la alta asociación entre metástasis y mortalidad, a la hora de estudiar el valor pronóstico de variables se recomienda usar solamente los casos con resección quirúrgica radical (R0),** tal y como se ha hecho en este estudio. En esta situación el valor pronóstico del estadio de Dukes es muy distinto en tumores diploides y en aneuploides. Mientras que en los diploides la relación entre el estadio de Dukes y la supervivencia sigue siendo altamente

significativa, en los aneuploides el estadio de Dukes pierde valor pronóstico. En cambio, la invasión en nódulos linfáticos mantiene una alta significación. Esto es debido a que en los tumores aneuploides existe una diferencia considerable entre la supervivencia de los tumores Dukes C con invasión de pocos ganglios (de 1 a 3) (75%) y los tumores Dukes C con invasión de muchos ganglios (más de 3) (28%). Por tanto **en los tumores R0 aneuploides la variable más adecuada para testar valor pronóstico es el número de ganglios linfáticos invadidos.**

Valoración del uso de modelos de Cox

Para profundizar en la comprensión de los efectos de las distintas variables consideradas sobre la supervivencia en este estudio hemos llevado a cabo dos aproximaciones distintas: la valoración de las medidas de daño genómico como factores pronósticos y el análisis multivariante para determinar cómo se influyen mutuamente las variables que se asocian a la agresividad de los tumores. La aplicación de los modelos de Cox en la segunda parte del estudio ha permitido el hallazgo de resultados interesantes que no habían sido detectados en la primera aproximación. Estos modelos, además de determinar las interacciones entre variables, han sido especialmente útiles en el análisis de las variables de medida de daño genómico, ya que han permitido que éstas se mantuvieran como cuantitativas. Los puntos de corte usados en la primera parte del estudio son interesantes desde el punto de vista de la aplicación clínica, pero para un estudio fiable desde el punto de vista estadístico se recomienda trabajar con variables cuantitativas y modelos de Cox (Simon y Altman, 1994; Altman et al, 1994). Aunque los modelos de Cox presentan la limitación de que suponen proporcionalidad en los riesgos (ver apéndice), una vez que ésta se ha evaluado, constituyen la mejor herramienta para modelar supervivencia. En conclusión, **el uso de modelos de Cox en este estudio ha permitido aportar rigor estadístico a los resultados y ha ampliado la capacidad de obtención de información de los datos disponibles.** Dado que en la mayoría de trabajos relacionados con el daño genómico los análisis de supervivencia se limitan a la primera aproximación aquí expuesta, creemos que este estudio puede servir de ejemplo para mostrar las ventajas de la aplicación de técnicas estadísticas adecuadas.

2.2 VALOR PRONÓSTICO DEL AI EN TUMORES ANEUPLOIDES

De las tres variables estudiadas relacionadas con la aneuploidía de los tumores (DI, CI y AI), el AI es la que mostró mejor asociación con supervivencia, de manera que **los tumores con altos valores de AI son los que presentan un peor pronóstico**. Probablemente esta asociación indica que el AI es un parámetro adecuado para medir la inestabilidad genómica del tumor, de manera que cuanto mayor es ésta, más alta es la malignidad del tumor y peor el pronóstico del paciente. La explicación más lógica sería que **los tumores que son capaces de producir un mayor número de células aneuploides (CI) con un mayor grado de alteraciones genéticas (DI) tienen más probabilidades de que se originen clones distintos, y ocasionalmente más agresivos, dentro del tumor**. Esta idea encaja perfectamente con la observación de que es la heterogeneidad genética acumulada en el tumor lo que determina su potencial maligno (Heppner y Miller, 1998). En contraste, los tumores con un número reducido de células aneuploides (bajo CI) pero con altos valores de DI, como ocurre a menudo, tendrían menos inestabilidad genómica global y, por tanto, menos potencial para la progresión. Además la baja proporción de células aneuploides podría ser consecuencia de su reducida viabilidad. El hecho de que el DI sólo considere la alteración del contenido de DNA de la población más aneuploide puede ser la causa de que su valor pronóstico hoy en día siga siendo controvertido (Compton et al, 2000). **La existencia de asociación de forma independiente de valores elevados de DI y CI con mal pronóstico y la ausencia de correlación entre ambas variables (DI y CI) indica que las dos juegan un papel importante en la determinación del pronóstico de los tumores aneuploides**. Por esta razón, **la combinación de ambas en un solo parámetro, el AI, ofrece la mejor significación estadística**. La idea de que valores elevados de AI se asocian a una mayor agresividad no sólo se ve reflejada en la supervivencia de los pacientes, sino también en las características clínico-patológicas de los tumores, ya que estos se relacionan con estadíos avanzados de Dukes y con metástasis, así como con localización izquierda. Esta asociación con Dukes no hay que considerarla como la causa del valor pronóstico del AI, ya que está probado que en los tumores R0 la predicción de supervivencia del AI es independiente de la del estadio de Dukes y también de la invasión en nódulos linfáticos. Sin embargo, cuando se consideran todos los tumores, la fuerte relación entre metástasis, elevado AI y mortalidad hace que el AI pierda su significación frente al estadio de Dukes.

Respecto al valor pronóstico del AI independiente del estadio de Dukes es importante señalar que **la aplicación de este índice permite identificar un subgrupo de pacientes con tumores en estadio temprano que, sin embargo, se asocian a mal pronóstico**. Muy pocos de los pacientes con tumores en estadio temprano fueron tratados (4 de 69). Dentro de los casos no tratados algunos murieron y un porcentaje elevado de ellos presentaba alto AI. Estos datos indican que **el subgrupo de pacientes con tumores Dukes A-B y elevado AI se podrían beneficiar de terapia coadyuvante**. Dado que el AI podría mejorar la clasificación patológica convencional y dada la fácil aplicabilidad de la citometría de flujo de forma rutinaria parece evidente plantearnos la realización de un estudio prospectivo en una serie amplia de pacientes.

2.3 VALOR PRONÓSTICO DEL GDF EN TUMORES ANEUPLOIDES Y RELACIÓN CON MUTACIONES EN P53

El valor pronóstico del daño genómico medido por AP-PCR ya había sido descrito previamente en otra serie de tumores colorrectales (Arribas et al, 1997). Mientras que en nuestro estudio el valor pronóstico se limita a los tumores aneuploides, en aquel estudio se observaba con todos los casos. Esto podría ser debido a una distribución diferente del daño genómico en esa serie de tumores. Algunos datos así lo sugieren, como la diferencia en la frecuencia de mutaciones de p53 o de casos con MSI en las dos poblaciones. También hay que tener en cuenta que el tamaño de muestra de ese estudio era más pequeño (55 casos frente a 113), que la población era distinta (de procedencia americana e incluyendo individuos de raza negra) y que el análisis de los patrones de *fingerprint* se llevó a cabo con una metodología diferente. El valor pronóstico del daño genómico medido por AP-PCR también se ha estudiado en carcinomas no de célula pequeña de pulmón en los que se encontró una asociación entre alto daño genómico y disminución de la supervivencia (de Juan et al, 1998).

Aparte de la AP-PCR, otras técnicas que han estudiado el valor pronóstico de las alteraciones genómicas son el FAL y la citogenética clásica (ver apartado 1.2.2 de Introducción). En ambos casos los tumores con más alteraciones presentaban menor supervivencia (Vogelstein et al, 1989; Heim y Mitelman, 1995). En vista de las diferencias técnicas entre la **AP-PCR, el FAL y la citogenética clásica** resulta remarcable que **en los tres casos las alteraciones detectadas se asocian a una mayor agresividad de los tumores. Estos datos** demuestran que el acúmulo de daño genómico condiciona la evolución del tumor y **sugieren la posibilidad de que el daño genómico sea**

consecuencia de una inestabilidad genómica subyacente responsable de la adquisición de agresividad. Las causas de esta inestabilidad genómica podrían ser la disfunción de diferentes mecanismos como reparación del DNA, replicación, recombinación, *checkpoints* de ciclo celular y otros.

Nuestros resultados indican que existe una clara asociación entre los desequilibrios alélicos y las mutaciones en p53, por lo que se podría hipotetizar que la pérdida de función de p53 juega un papel fundamental en la producción de este tipo de daño genómico. Curiosamente, en el análisis de tumores colorrectales con inter-SSR-PCR, una técnica similar a la AP-PCR (Basik et al, 1997) (ver apartado 1.2.2 de Introducción), encontraron esta asociación en sentido contrario (alto daño genómico se asociaba a ausencia de mutaciones en p53) (Kahlenberg et al, 1996). Esto podría ser debido a que las alteraciones detectadas por la inter-SSR PCR fuesen diferentes de las detectadas por la AP-PCR (Boland y Ricciardiello, 1999) o bien a diferencias poblacionales. En el estudio de AP-PCR llevado a cabo por Arribas et al (1997) no se encontró relación con p53, posiblemente debido a que en esa serie de tumores el porcentaje de casos con mutación en p53 era muy elevado (72% de los casos frente al 44% en este estudio). Por otro lado, **las mutaciones de p53 se han relacionado con el mecanismo de producción de alteraciones estructurales BFB** (breakage-fusion-bridge) (Gisselsson et al, 2000) (ver apartado 2.2.3.3 de Introducción), lo cual constituye una prueba de que las mutaciones en p53 pueden favorecer la inestabilidad cromosómica de tipo estructural, que nosotros detectamos como desequilibrios alélicos.

Dado que la principal función de p53 es el control de la estabilidad del genoma, resulta lógico que el aumento del daño genómico de los tumores esté asociado a las mutaciones de este gen (Ko y Prives, 1996; Hartwell, 1992). Además, múltiples estudios han relacionado las mutaciones en este gen con la producción de diferentes tipos de daño genómico (roturas cromosómicas, recombinación homóloga, aneuploidía y amplificaciones) (ver apartado 2.2.3.4 de Introducción). **Sin embargo, el papel de p53 en la producción de daño genómico es controvertido.** Se ha propuesto que las mutaciones en p53 ocurren temprano en el proceso tumoral (Carder et al, 1995, Hasegawa et al, 1995) y que están asociadas con inestabilidad cromosómica (Williams et al, 1997) y con aneuploidía (Carder et al, 1993). Pero también se ha propuesto lo contrario: que las mutaciones en p53 ocupan un lugar tardío en la progresión tumoral (Fearon y Vogelstein, 1990) y que no están relacionadas ni con inestabilidad cromosómica (Lengauer et al, 1997) ni con aneuploidía (Ried et al, 1999). Por otro lado el valor pronóstico de las mutaciones en p53 no está claro (ver tabla 3 de Introducción).

Estas contradicciones se podrían explicar por el hecho de que, según nuestros resultados, **p53 participaría en la producción de unos tipos de daño genómico** (desequilibrios alélicos) **y no en otros** (aneuploidía). Según la abundancia de tumores con desequilibrios alélicos en la población estudiada y según las técnicas utilizadas para medir el daño genómico, el papel de p53 podría pasar inadvertido. Por otro lado, **la complejidad de los mecanismos celulares de control de la expresión génica conlleva que un gen pueda perder su función sin necesidad de estar mutado**. Por ejemplo, en el caso de p53 se ha descrito que se puede producir su pérdida de función por la hipermetilación de p14 o por la sobreexpresión de Mdm2 (Ries et al, 2000). La situación se complica aún más si tenemos en cuenta que existe un alto grado de redundancia en los mecanismos de control de la estabilidad del genoma. **Es posible que las funciones de p53 también sean llevadas a cabo por otros genes y que, por tanto, no baste con mutar p53 para generar abundantes desequilibrios alélicos**. Otras alteraciones genómicas que han sido propuestas como colaboradoras de p53 en la generación de inestabilidad genómica son la sobreexpresión de c-myc (Yin et al, 1999) y la disfunción de algunas endonucleasas endógenas (Russo et al, 1995). Recientemente se ha propuesto un modelo que sugiere un papel muy relacionado entre la pérdida de los telómeros y la disfunción de p53 en la producción de inestabilidad cromosómica (Chin et al, 1999; Hanahan, 2000; Artandi et al, 2000).

En resumen podemos decir que **en los tumores aneuploides los mejores factores pronósticos son el AI y el GDF, cuando se consideran los tumores R0, y el estadio de Dukes y las mutaciones en p53 cuando se consideran todos los tumores**. Altos valores de AI están relacionados con estadios de Dukes avanzados y altos valores de GDF están relacionados con mutaciones en p53. Igual que AI y GDF se asocian a malignidad de forma independiente, también lo hacen el estadio de Dukes y las mutaciones en p53. Aunque el estadio de Dukes es la variable que mejor identifica la agresividad del tumor (debido fundamentalmente al mal pronóstico de la categoría D), existe un riesgo de muerte añadido en los estadios menos avanzados que se asocia a la presencia de mutaciones en p53 y elevado GDF. Por otro lado, el mal pronóstico asociado a GDF sólo es evidente en casos con bajo AI y el mal pronóstico asociado a AI sólo es evidente en casos sin mutación en p53. Estas interacciones indican que los dos tipos de daño genómico se asocian a agresividad en un contexto determinado y que existen muchos factores que condicionan la agresividad de los tumores y que todavía desconocemos.

3. VÍAS DE PROGRESIÓN EN EL CÁNCER COLORRECTAL

3.1 VÍAS DE PROGRESIÓN BASADAS EN EL ESTUDIO DEL DAÑO GENÓMICO

La principal novedad que aporta este trabajo es el análisis de una muestra amplia de tumores con dos técnicas distintas de cuantificación de daño genómico. **En base a los resultados obtenidos con las dos técnicas y a su integración con la información biológica y molecular de los tumores se ha establecido una clasificación preliminar de los tumores. Esta clasificación asume que el daño genómico detectado representaría tipos distintos de inestabilidad genómica que se asociarían a mecanismos concretos de progresión tumoral.**

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

TIPOS DE TUMORES	DAÑO GENÓMICO	PRONÓSTICO	TIPO DE PROGRESIÓN	TIPO DE INESTABILIDAD	POSIBLES CAUSAS DE LA INESTABILIDAD
DIPLOIDES	alteraciones en microsatélites	bueno	mutaciones puntuales en genes relacionados con el proceso tumoral	inestabilidad de microsatélites	mutaciones en genes reparadores del DNA
	sin identificar o inexistente	malo en Dukes C	cualitativa: la agresividad se adquiere al invadir ganglios linfáticos	¿inestabilidad a nivel epigenético?	alteraciones en la metilación o en mecanismos de control de expresión génica
ANEUPLOIDES	desequilibrios alélicos	empeora al aumentar el daño	cuantitativa: la agresividad aumenta con la adquisición progresiva de daño genómico	¿inestabilidad cromosómica estructural?	mutaciones en p53
	aneuploidía de gran extensión	empeora al aumentar el daño		¿inestabilidad cromosómica numérica?	mutaciones en genes implicados en segregación cromosómica

Vías de progresión en tumores diploides

En la clasificación de los tumores en función de su daño genómico el primer parámetro a considerar es su contenido de DNA. **Los tumores diploides** (incluyendo seguramente algunos pseudodiploides) **seguirían unas vías de progresión tumoral diferentes de las de los tumores aneuploides** (ver apartado 2.1 de Discusión). Los **tumores con inestabilidad de microsatélites** se consideran que son en su mayoría diploides (Jackson y Loeb, 1998), aunque en nuestra serie sólo 7 tumores mostraron MSI y 4 eran diploides y 3 aneuploides. No está claro si la aneuploidía precede o es posterior a la MSI, pero dado el reducido número de casos MSI es imposible reclasificarlos en diferentes vías. De los 7 pacientes con tumores MSI sólo 1 murió y resultó corresponder a un tumor diploide en estadio de Dukes C. Los 6 tumores restantes eran Dukes A-B. En conjunto estos datos están de acuerdo con estudios previos que han encontrado mejor pronóstico en este tipo de tumores (Jackson y Loeb, 1998).

Dentro de los tumores diploides podemos proponer otra posible vía de progresión tumoral sin daño genómico aparente. Los tumores pertenecientes a esta vía seguirían una **progresión de tipo cualitativa**, en el sentido de que se convierten automáticamente en malignos en el momento en que son capaces de invadir los ganglios linfáticos. Estos resultados vienen reforzados por los estudios de Hawkins et al (2001) que describen un subgrupo de tumores diploides con muy mal pronóstico al que le atribuyen la posibilidad de constituir una vía de progresión tumoral independiente. **Desconocemos el tipo de daño genómico que presentan estos tumores**, pero no está relacionado con inestabilidad de microsatélites, ni con aumento del contenido de DNA, ni con desequilibrios alélicos generalizados. Alteraciones candidatas podrían ser reorganizaciones cromosómicas equilibradas o sustituciones de uno o unos pocos nucleótidos, las cuales no son fácilmente detectables por AP-PCR. **Las alteraciones de estos tumores también podrían ser de carácter epigenético**, es decir, que afectarían a la expresión de los genes sin causar manifestaciones evidentes en el DNA. Estas alteraciones podrían constituir un mecanismo de inestabilidad generalizada que facilitara la progresión tumoral. En este sentido cabe destacar que en esta serie de tumores se había analizado previamente la desregulación en la expresión génica y se pudo comprobar que no estaba asociada a las alteraciones detectadas por AP-PCR y que, además, presentaba valor pronóstico (Tortola et al, 1999). Concretamente en los tumores diploides parecía que existía cierta tendencia a que los casos que morían mostraran un nivel elevado de alteraciones de la expresión, aunque el bajo número de casos impedía extraer conclusiones (datos sin publicar). Ello se podría relacionar con alteraciones en los

patrones de metilación (Baylin et al, 1998), cuyo estudio ya se está llevando a cabo mediante varias estrategias en trabajos que se realizan tanto en nuestro laboratorio como en colaboración con M. Esteller (Johns Hopkins Cancer Center, Baltimore, USA).

Vías de progresión en tumores aneuploides

En cuanto a los **tumores aneuploides**, basándonos en nuestros datos creemos que **podemos distinguir dos tipos distintos fundamentales de daño genómico: desequilibrios alélicos (GDF) y grado de aneuploidía (AI)**. Aunque los datos proporcionados por la citometría de flujo y la AP-PCR son muy distintos, existe cierto grado de solapamiento entre las alteraciones que pueden ser detectadas por ambas técnicas. Las alteraciones del contenido de DNA detectadas por citometría de flujo (a excepción de la tetraploidía perfecta) también pueden ser detectadas por AP-PCR. Sin embargo, la AP-PCR también permite detectar alteraciones en el número de cromosomas que se pueden compensar entre sí y dar un contenido pseudodiploide por citometría de flujo. Nuestros resultados reafirman la diferencia de las dos medidas. En primer lugar, no existe correlación entre **GDF y AI**, lo que indica que **son independientes**. Es decir, los tumores con valores elevados de GDF no muestran necesariamente valores elevados de AI y viceversa, aunque hay una cierta tendencia a coexistir. En segundo lugar, **los dos tipos de daño muestran asociaciones distintas con las variables clínico-patológicas y moleculares**. Altos valores de AI se relacionan con estadios de Dukes avanzados y altos valores de GDF se relacionan con mutaciones en p53. En tercer lugar, **los dos tipos de daño se asocian a peor pronóstico, aunque de forma independiente**.

En cualquier caso, los resultados obtenidos parecen ajustarse a unos postulados predefinidos:

- **a mayor daño genómico más agresividad**
- **aquella medida del daño genómico que mejor refleje el tipo específico de inestabilidad de cada tumor es la que mejor identificará el comportamiento biológico**

Es evidente que a estos postulados no se les debe dar el valor de axiomas y que sólo con la identificación de los mecanismos de inestabilidad será posible relacionar ésta con el comportamiento del tumor.

Tipos de inestabilidad cromosómica

Actualmente prevalece la idea de que pueden existir diversos tipos de inestabilidad genómica que se traducen en alteraciones genéticas distintas cuya acumulación condiciona la evolución de los tumores (Lengauer et al, 1998). **Estos dos tipos de daño genómico podrían estar reflejando la existencia de diferentes mecanismos de inestabilidad cromosómica que impulsan la evolución de los tumores de una forma progresiva.** A diferencia de lo observado en los tumores diploides, en los aneuploides la adquisición de malignidad se daría de forma cuantitativa, es decir, a medida que aumenta la cantidad de alteraciones del tumor.

En el caso de los desequilibrios alélicos, la inestabilidad genómica subyacente podría corresponder a la disrupción de mecanismos que favorecieran la presencia de alteraciones cromosómicas estructurales del tipo delección y amplificación, que son las más frecuentemente observadas. Los desequilibrios alélicos también se podrían deber a trisomías y monosomías, pero algunos estudios de pérdida de heterocigosidad indican que las delecciones parciales son más frecuentes que las totales (Arribas et al, 1999b; Thiagalingam et al, 2001). Otro dato que indicaría que las alteraciones medidas por el GDF son mayoritariamente de tipo estructural es el hecho de que las ganancias y las pérdidas observadas se dan prácticamente siempre de forma asociada. Como ya se ha comentado anteriormente, en la generación de estos desequilibrios alélicos podrían estar involucradas las mutaciones en p53 y el mecanismo de producción de alteraciones estructurales BFB (breakage-fusion-bridge) (ver apartado 2.2.3.3 de Introducción).

En cuanto a las alteraciones del tipo aneuploidía, la teoría que goza de más popularidad actualmente es la propuesta por Lengauer et al (1997), la cual **sostiene que la aneuploidía es la consecuencia de una inestabilidad cromosómica subyacente cuya causa podrían ser mutaciones en genes de segregación cromosómica** (ver apartado 2.2.3.2 de Introducción). A la luz de esta teoría se han sugerido varios genes involucrados en el *checkpoint* de mitosis como el hBub1 (Cahill et al, 1998) y el MAD2 (Michel et al, 2001) que podrían estar implicados en la producción de inestabilidad cromosómica numérica. Por otro lado también se ha propuesto la versión opuesta de esta teoría, es decir, que existe una inestabilidad cromosómica numérica pero que ésta no es la causa sino la consecuencia de la aneuploidía (Duesberg et al, 1998). Esta hipótesis sostiene que la aneuploidía causa una alteración en la dosis génica que podría desregular las mitosis y desencadenar una desestabilización general del cariotipo. El origen de la aneuploidía podría ser por mutación o también por efecto de un

carcinógeno o la no-disyunción espontánea de cromosomas (Holliday, 1989; Li et al, 2000) (apartado 2.2.3.2 de Introducción).

Aunque es evidente que la aneuploidía es una característica fundamental de los tumores colorrectales, desde nuestro punto de vista las interpretaciones que se realizan en estos trabajos tienen poca consistencia, en el sentido de que pretenden ofrecer una explicación general a la progresión de estos tumores contando con una información parcial e insuficiente. Independientemente de si la aneuploidía es causa o efecto de la inestabilidad cromosómica numérica, en los tumores existen alteraciones cromosómicas estructurales (Muleris et al, 1990b; Abdel-Rahman et al, 2001), las cuales se ignoran en estas teorías. **Mediante la combinación de diferentes técnicas, en este estudio hemos podido demostrar que la aneuploidía no es el único tipo de daño genómico presente en los tumores, sino que también existen desequilibrios alélicos que probablemente reflejan alteraciones cromosómicas estructurales. La inestabilidad cromosómica subyacente a los dos tipos de daño genómico sería distinta, puesto que ambos no están asociados y condicionan la agresividad de los tumores de forma independiente.**

Por otro lado, estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio con algunas de las líneas celulares colorrectales usadas por Lengauer et al (1997) precisamente sugieren que, de existir algún tipo de inestabilidad cromosómica, ésta sería estructural y no numérica, ya que las aneuploidías son escasas y explicables sin necesidad de inestabilidad mientras que las reorganizaciones cromosómicas son mucho más frecuentes (Masramon, 2000). Por tanto creemos que aunque la aneuploidía es un fenómeno frecuente en el cáncer colorrectal, todavía no se ha demostrado de forma clara que su causa sea la inestabilidad cromosómica numérica.

Evidencias citogenéticas

Citogenéticamente los tumores han sido clasificados en tres categorías: tipo normal (NT) (cariotipo estable), tipo trisómico (TT) (ganancias cromosómicas y baja frecuencia de reorganizaciones estructurales) y tipo monosómico (MT) (monosomías, deleciones, reorganizaciones estructurales y frecuente endorreduplicación) (Dutrillaux, 1995) (ver introducción apartado 2.2.4.2). **A pesar de no disponer de datos citogenéticos, en este estudio hemos intentado reproducir esta clasificación basándonos en los datos disponibles de localización del tumor y presencia de aneuploidía** (ver apartado 6.1 de Resultados). Hay que hacer notar que nuestra clasificación es

aproximada y que algunos tumores del colon derecho no se han clasificado correctamente ya que no hemos considerado la presencia de tumores monosómicos en esta zona del colon, donde también han sido descritos (Muleris et al, 1990b). Estos tumores monosómicos podrían ser tanto diploides como aneuploides. Por otra parte, se han considerado tumores trisómicos aquellos presentes en el colon derecho y aneuploides. Sin embargo, puede haber tumores trisómicos que presenten ganancias de uno o dos cromosomas, las cuales no son detectadas por citometría de flujo y que, por tanto, se hayan clasificado como de tipo normal.

Los resultados obtenidos confirmaron la existencia de diferencias clínico-patológicas y moleculares entre los grupos, lo cual apunta a una posible significación biológica de esta clasificación. Algunas de las características propias de cada grupo previamente señaladas en los estudios citogenéticos se confirmaron en nuestros resultados, como son la presencia de inestabilidad de microsatélites en tumores NT-like y TT-like y la ausencia de mutaciones en p53 en tumores NT-like. Sin embargo en los tumores TT-like la frecuencia de mutaciones en p53 es más alta de lo esperado, posiblemente debido a que en este grupo además de tumores trisómicos se incluyen algunos monosómicos. La elevada frecuencia de mutaciones de p53 en el recto coincide con el hecho de que las pérdidas de 17p también son más frecuentes en esta localización (Heim y Mitelman, 1995). También se ha descrito que los tumores de recto son los que presentan los cariotipos más anormales (Bardi et al, 1995). No sabemos qué significado puede tener la elevada frecuencia de mutaciones en p53 en estos tumores ni si indica una tendencia a que la vía de los desequilibrios alélicos ocurra preferentemente en tumores del recto; pero, dada la importancia de esta relación, sería conveniente analizarla detalladamente en estudios posteriores. Por otro lado, también aparece una asociación interesante entre los tumores MT-like y el estadio de Dukes. Esta asociación no se había encontrado en estudios citogenéticos porque en su caso incluyeron en las comparaciones los tumores monosómicos de recto. Al considerar sólo los tumores monosómicos localizados en el colon izquierdo (grupo MT-like) observamos que éstos presentan estadios de Dukes más avanzados. Estas características diferenciales que presentan los tumores en función de su localización son esperables si tenemos en cuenta que la carcinogénesis puede ser distinta en las diferentes partes del colon debido a dos razones fundamentales: primero, el tipo y la concentración de carcinógenos en el contenido del colon proximal son diferentes de los del colon distal; y, segundo, la región derecha e izquierda del intestino grueso derivan de diferentes estructuras embriológicas (Heim y Mitelman, 1995).

3.2 PROPUESTA DE MODELO INTEGRADO DE LAS VÍAS DE PROGRESIÓN DEL CÁNCER COLORRECTAL

En base a nuestros resultados y a los conocimientos actuales acerca de la progresión colorrectal hemos propuesto un **modelo integrado** que se basa en **cuatro vías fundamentales asociadas a tres tipos característicos de tumores: los tumores MSI, los tumores diploides no MSI y los tumores aneuploides** (figura 24).

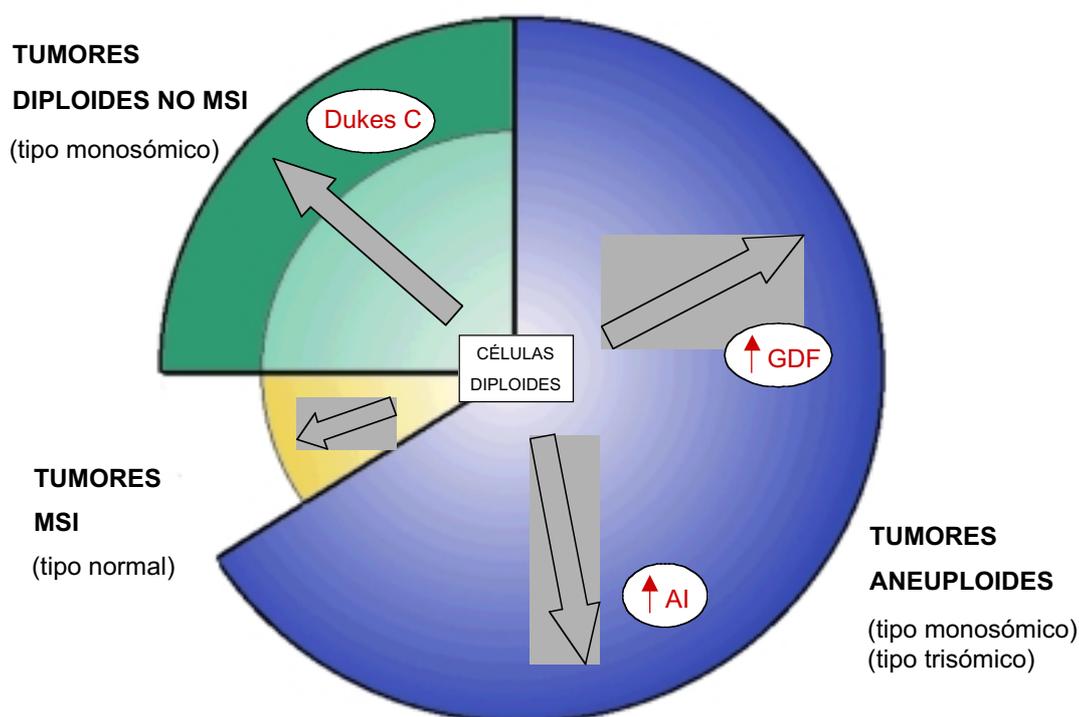


Figura 24. Modelo integrado de las vías de progresión en el cáncer colorrectal. El sentido de la progresión va desde el centro del círculo, donde se encuentran las células normales, hacia el exterior, donde se encontrarían los tumores más agresivos. Cada color representa un tipo concreto de tumores: MSI, amarillo; diploides no MSI, verde; aneuploides, azul. Estos tipos de tumores siguen unas vías de progresión determinadas indicadas con las flechas en gris. Los círculos con letras rojas al lado de las flechas indican los factores asociados a mayor agresividad en cada vía de progresión.

En primer lugar encontramos los **tumores MSI**. La vía de la inestabilidad de microsatélites es la única bien descrita y citogenéticamente corresponde a los tumores de tipo normal. También se han encontrado tumores MSI de tipo trisómico, pero hay que tener en cuenta que la distinción citogenética puede ser, por demasiado estricta, equívoca. Los tumores MSI tienen buen pronóstico, por lo que en el modelo esta vía de

progresión acaba antes de llegar a la periferia del círculo, que indica la máxima agresividad.

En segundo lugar encontramos los **tumores diploides no MSI**. Estos tumores presentan muy buen pronóstico mientras se mantienen en estadios de Dukes A-B, pero experimentan un 'salto cualitativo' a la malignidad en el momento en que son capaces de superar la 'restricción espacial' que constituye la pared del colon y pasan a invadir el sistema linfático, es decir, se convierten en Dukes C (este salto cualitativo se indica en el modelo por el cambio de color de verde claro a verde oscuro). Esta vía de progresión tumoral se podría corresponder con la identificada por el grupo de Hawkins et al (2001). **Citogenéticamente estos tumores corresponderían a tumores de tipo monosómico** ya que no son MSI y es muy poco probable que sean trisómicos, puesto que éstos mayoritariamente son detectados como aneuploides. Sin embargo todos los tumores monosómicos se mantienen como pseudodiploides en la primera etapa de su evolución, ya que empiezan sufriendo monosomías, deleciones y reorganizaciones estructurales que probablemente en la mayoría de los casos son indetectables por citometría de flujo. En algún momento de su evolución los tumores monosómicos pueden sufrir una endorreduplicación que los transforma en pseudotetraploides y posteriormente progresan perdiendo cromosomas hasta que se estabilizan alrededor de la triploidía (Dutrillaux, 1995). **Nuestros resultados sugieren que la endorreduplicación no es un requisito imprescindible para la progresión de los tumores monosómicos y que éstos pueden llegar a ser muy agresivos manteniéndose como pseudodiploides.** El análisis por CGH de dos tumores diploides no MSI demostró que éstos presentaban las alteraciones características de los tumores monosómicos, lo que refuerza nuestras predicciones.

Por último encontramos los **tumores aneuploides**. Este es el grupo más grande, incluiría aproximadamente el 70% de los tumores, y el más heterogéneo. Según nuestros resultados, los tumores pertenecientes a este grupo podrían progresar por **dos vías independientes de adquisición de alteraciones: la vía 'numérica' y la vía 'numérico-estructural'**. En la primera la agresividad estaría condicionada por la acumulación de aneuploidía (reflejada por valores de AI elevados). En la segunda sería la adquisición de alteraciones cromosómicas de tipo estructural (alto GDF) lo que se asociaría a mayor agresividad. En la vía 'numérica' la aneuploidía se podría alcanzar por dos tipos de alteraciones cromosómicas numéricas distintas: trisomías y poliploidías. Precisamente ambos tipos de alteraciones corresponden con las dos vías aneuploides definidas a nivel citogenético: la vía de los tumores trisómicos y la de los monosómicos. Los tumores

trisómicos evolucionan mediante la adquisición de trisomías. Sus DI nunca son superiores a 1.3 (Muleris et al, 1990b) y, por tanto, aunque las trisomías sean clonales y afecten a todas las células, es poco probable que estos tumores lleguen a alcanzar valores de AI alto. Los tumores monosómicos, sin embargo, llegan a ser aneuploides porque sufren un proceso de tetraploidización y posterior pérdida cromosómica hasta estabilizarse en la triploidía (Dutrillaux, 1995). En estos tumores la adquisición de un elevado AI dependería del hecho de que la presencia de las células pseudotetraploides en el tumor estuviese favorecida. En resumen, dentro de los tumores aneuploides en la vía 'numérica' encontramos todos los tumores trisómicos y los tumores monosómicos que no han adquirido elevado GDF. En la vía 'numérico-estructural' los tumores posiblemente también pertenecen al tipo monosómico, ya que es el único en el que se han descrito alteraciones cromosómicas estructurales. Por tanto, el análisis del daño genómico a nivel molecular sugiere que la vía monosómica descrita a nivel citogenético se podría desglosar en dos: la vía 'numérica' y la vía 'numérico-estructural'.

Por último tenemos que señalar que **este modelo es muy general y constituye una simplificación de lo que ocurre en la progresión colorrectal**. Es evidente que puede existir solapamiento entre las diferentes vías de progresión tumoral y que, dada la gran cantidad de mecanismos que controlan la estabilidad del genoma (Cheng y Loeb, 1993), pueden existir otras muchas vías que permitan a las células adquirir inestabilidad y evolucionar hacia la formación de un tumor.

4. PAPEL DE LA ANEUPLOIDÍA EN LA DISEMINACIÓN METASTÁSICA

La relación observada entre el aumento del grado de aneuploidía y la malignidad del tumor puede reflejar dos situaciones opuestas:

- en un tumor determinado, las células que presentan el cariotipo más anormal son las más invasivas y por esa razón son seleccionadas durante la diseminación distal (Lengauer et al, 1997; Duesberg et al, 1998)
- la presencia de clones aneuploides es tan solo un síntoma de la inestabilidad cromosómica global del tumor y las células más aneuploides no tienen porqué ser necesariamente viables (Scott et al, 1998)

Como ya se ha explicado anteriormente, el hecho de que el AI presente más asociaciones con variables biológicas, especialmente con estadio de Dukes, y mejor valor pronóstico que el DI, sugiere que la situación correcta es la segunda: **la capacidad de invasión de un tumor no depende de sus células más anormales sino de su inestabilidad cromosómica subyacente, es decir, de su capacidad global de producir aneuploidía, lo que debería resultar en mayor heterogeneidad intratumoral.** Los resultados obtenidos al analizar las metástasis confirman esta afirmación.

El perfil de aneuploidía de los tumores primarios se mantiene de forma muy similar en sus correspondientes metástasis, como ha sido demostrado previamente (Tollenaar et al, 1997). El hecho de que las metástasis reproduzcan la situación de los tumores primarios indica la existencia de una inestabilidad cromosómica intrínseca que continuamente genera subpoblaciones heterogéneas.

Además, **las metástasis presentan poblaciones de células tumorales diploides** (estos resultados y Tollenaar et al, 1997), **lo que indica que las células que diseminan y originan las metástasis deben ser diploides** ya que no parece probable la transformación de células aneuploides en diploides. La comprobación de que las células diploides presentes en los histogramas de tumores aneuploides son realmente células tumorales ya había sido llevada a cabo mediante el uso de anticuerpos anti-citoqueratina por Bergstrom et al (1995). Basándose en ese hecho se había propuesto que **los tumores aneuploides presentan como mínimo dos poblaciones neoplásicas, una diploide y otra aneuploide, siendo la fracción diploide la más estable y vital y, por tanto, la mejor adaptada a los mecanismos de selección. La población aneuploide posiblemente está formada por células poco viables que se mantienen debido a que la inestabilidad cromosómica subyacente las genera de forma constante** (Scott et al, 1998). En este sentido también se ha propuesto la existencia de un compartimento diploide a partir del cual se originan continuamente las células aneuploides (Jones et al, 1988). Nuestros resultados son consecuentes con estas hipótesis y apuntan hacia un papel crucial de las células diploides en la progresión tumoral. Para poderlo confirmar sería muy interesante llevar a cabo estudios que permitieran determinar la capacidad metastática de diferentes subpoblaciones de ploidía conocida.

5. ESTUDIO DE LOS MARCADORES OBTENIDOS POR AP-PCR

5.1 ANÁLISIS GLOBAL

Heterogeneidad de alteraciones

Analizando globalmente las alteraciones que sufren los marcadores de AP-PCR el primer dato que sorprende es la **elevada heterogeneidad de los cambios observados**, ya que éstos no se concentran en unas pocas bandas sino que afectan a la práctica totalidad de las bandas analizadas. Nuestros resultados son paralelos (a nivel genómico) a los obtenidos por Zhang et al (1997) a nivel de expresión génica. Estos autores observaron que las alteraciones de expresión de las células tumorales correspondían mayoritariamente a pequeños cambios en un número muy elevado de genes. A la vista de estas observaciones se podría pensar que es el patrón global de disrupción genética más que la alteración en unos pocos genes lo que condiciona la progresión del tumor. Esto nos lleva a proponer un modelo probabilístico (por contra a un modelo determinístico) en la adquisición de alteraciones génicas. Según este modelo, la generación de un tumor es una sucesión de eventos cuya ocurrencia viene determinada por una probabilidad que está en función de mecanismos de inestabilidad subyacente y de la ventaja selectiva que confieran a las células en cada momento.

Marcadores con alteraciones arbitrarias

El segundo dato que llama la atención en el análisis de las bandas de AP-PCR es la **elevada frecuencia de marcadores que presentan alteraciones arbitrarias, es decir, tanto ganancias como pérdidas**. Estos marcadores son especialmente frecuentes en los cromosomas 2, 6 y 9, pero también se encuentran de forma esporádica en algunos cromosomas mayoritariamente estables, como el 3. Las causas de estas alteraciones las desconocemos, pero pueden estar relacionadas con una inestabilidad intrínseca de estas zonas del genoma o bien con la presencia de múltiples componentes selectivos, es decir, situaciones distintas en las que se puede encontrar un tumor y en las que la presión selectiva puede favorecer alteraciones en uno u otro sentido. La banda 91/92 (ver apartado 5.1 de Resultados) es un ejemplo claro de banda que experimenta ganancias y pérdidas en tumores con alto daño genómico. El hecho de que los casos en los que esta banda se gana sean mayoritariamente mujeres podría explicar una ventaja selectiva de la amplificación de esta zona del DNA en los tumores de pacientes de este sexo.

5.2 ANÁLISIS ESPECÍFICO

Los seis marcadores que fueron mapados en los cromosomas 8, 9 y X identifican tres regiones de posible interés en el estudio de la progresión colorrectal. En primer lugar se encuentra la región **8q13.2**. Las ganancias del brazo largo del cromosoma 8 hace tiempo que se conocen (Bardi et al, 1995) y se cree que además del oncogen c-myc existen otros genes en esa zona coamplificados y relacionados con la progresión del cáncer colorrectal (Agochiya et al, 1999). Nuestros datos confirman la relación entre ganancias del cromosoma 8 y peor pronóstico y sugieren que la zona que rodea al marcador D8S1776 podría ser locus de oncogenes implicados en el proceso tumoral. Respecto al cromosoma 9, los dos marcadores identificados se encuentran muy distantes. El más interesante es el que corresponde a la banda 91/92 (marcador D9S2019). Su zona de mapaje es **9q22**, la cual ha sido propuesta con anterioridad como región con pérdidas de heterocigosidad (Jarnik et al, 1996) candidata a contener posibles genes relacionados con el cáncer (Pasche et al, 1998). También es importante indicar que en el cáncer de colon se han descrito reorganizaciones del brazo largo del cromosoma 9, algunas de las cuales, precisamente, presentan el punto de rotura en 9q22 (Konstantinova et al, 1991). Con nuestros datos es altamente especulativo sugerir si estas alteraciones se relacionan con componentes selectivos multifactoriales o con mecanismos de inestabilidad genética. En cuanto al cromosoma X, las tres bandas localizadas subcromosómicamente mapan en el brazo corto, dos de ellas muy próximas (**Xp21**) y otra un poco más alejada (**Xp11**). Precisamente toda la región del cromosoma X comprendida entre estas bandas, concretamente Xp11.2-p21, se halla recurrentemente amplificada en diferentes tipos de cánceres (Knuutila et al, 1998). En el cáncer colorrectal se han descrito alteraciones en la replicación de la región Xp11 (Muleris et al, 1990a) y en otros tipos de tumores, como el sarcoma sinovial y el carcinoma renal, las translocaciones que afectan a Xp11 constituyen la principal característica citogenética (Safar et al, 1998; Perot et al, 1999; Mitelman, 2000). Se han descrito varios genes asociados a esta zona y algunos de ellos muestran sobreexpresión en tejidos tumorales (Schroer et al, 1999). Precisamente de las tres bandas mapadas en el cromosoma X la que se encuentra en Xp11 es la banda 46, que es una banda cuyas ganancias se asocian a mal pronóstico en los tumores aneuploides (ver apartado 5.1 de resultados).

En resumen, **podría resultar interesante la exploración más exhaustiva de los locus 8q13, 9q22 y Xp11**. El trabajo consistiría en acotar la región mínima de interés (entre 1 y 2 Mb) y, si fuese posible, en la identificación de los genes implicados. Ello nos podría dar pistas sobre las causas responsables no sólo de estas alteraciones sino de otros procesos genéticos que pueden jugar un papel en la tumorigénesis colorrectal.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El AI (Aneuploidy Index) es un nuevo índice de cuantificación de la aneuploidía que tiene en cuenta el grado y la extensión de la aneuploidía en el tumor. El AI tiene valor pronóstico independiente y permite identificar un subgrupo de pacientes con tumores en estadios tempranos, pero con alto riesgo de muerte.
2. El daño genómico medido por AP-PCR (GDF) cuantifica desequilibrios alélicos y también presenta valor pronóstico independiente. El alto GDF se asocia a mutaciones en p53, lo que indica que la inactivación de este gen podría ser una de las causas de producción de desequilibrios alélicos.
3. El GDF y el AI son independientes. Por eso, la combinación de las dos variables es el mejor predictor de supervivencia en los pacientes con resección quirúrgica radical (R0).
4. En base a los distintos tipos de daño genómico observado proponemos que éstos son la manifestación de 4 vías de progresión tumoral con factores pronósticos diferentes:
 - vía de la inestabilidad de microsatélites
 - vía diploide sin MSI (factor pronóstico: estadio de Dukes)
 - vía aneuploide 'numérica' (factor pronóstico: AI)
 - vía aneuploide 'numérico-estructural' (factor pronóstico: GDF)
5. La mayoría de las metástasis presenta una población de células tumorales diploides que indica que la diseminación ha sido llevada a cabo por este tipo de células. Las metástasis reproducen el patrón de ploidía existente en el tumor primario.

APÉNDICE

APÉNDICE 1

MODELOS DE COX

En estadística, **un modelo es una expresión matemática que intenta explicar una variable respuesta** (o variable de interés o dependiente) **en función de una o varias covariables** (o variables independientes). Cuando interviene una sola variable independiente se llama análisis univariante y cuando son dos o más, análisis multivariante. Cada covariable va acompañada de un coeficiente (β) que cuantifica el grado de relación entre la covariable y la variable de interés. Sobre los coeficientes se aplican tests estadísticos que indican si esta relación es significativa. La estructura de un modelo es la siguiente:

$$g(y) = \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \dots + \beta_nx_n$$

donde 'y' es la variable respuesta, 'g' es una función que transforma esta variable para conseguir mejores propiedades estadísticas y 'x' son las covariables. Las principales ventajas que ofrecen los modelos son, por una parte, el análisis combinado de diferentes variables (cualitativas o cuantitativas), lo cual permite comparar los efectos netos o ajustados de cada una de ellas sobre la variable respuesta y analizar la presencia de interacciones entre ellas y, por otra, la posibilidad de comparar modelos entre sí para decidir que conjunto de variables es el óptimo para explicar la variable de interés.

En el modelo de Cox la variable de interés es la supervivencia, es decir, tiempo hasta la muerte; **pero, por conveniencia en el diseño del modelo, se estudia el riesgo**, definido como la probabilidad de morir en un tiempo determinado.

$$h_i(t) = h_0(t) \exp(\beta_i x_i)$$

De esta manera, en el caso univariante con una única x se modela el riesgo para los individuos que tienen una característica determinada ($x=1$) ($h_i(t)$) respecto al riesgo de los individuos que no la tienen ($x=0$) ($h_0(t)$). Los coeficientes del modelo se interpretan como riesgo relativo o HR (Hazard Ratio):

$$HR = \exp(\beta) = \frac{h_i(t)}{h_0(t)}$$

Es una condición indispensable para aplicar el modelo de Cox que los riesgos entre los grupos sean proporcionales a lo largo del tiempo ya que, si no es así, la estimación de los coeficientes sería un promedio que aportaría una información sesgada. Para comprobar esta condición la mejor manera es representar las curvas de riesgo (o las de supervivencia) para cada grupo y comprobar que son paralelas o, como mínimo, que no se cruzan (figura 25b y 25c).

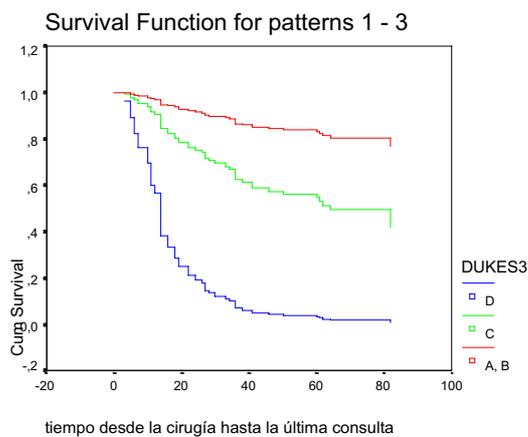
a)

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	S.E.	Wald	df	Sig	R
DUKES3			58,2019	2	,0000	,3444
DUKES3 (1)	1,1872	,3567	11,0785	1	,0009	,1410
DUKES3 (2)	2,9383	,3895	56,8944	1	,0000	,3466

Variable	Exp(B)	95% CI for Exp(B)	
		Lower	Upper
DUKES3 (1)	3,2780	1,6293	6,5951
DUKES3 (2)	18,8830	8,8002	40,5182

b)



c)

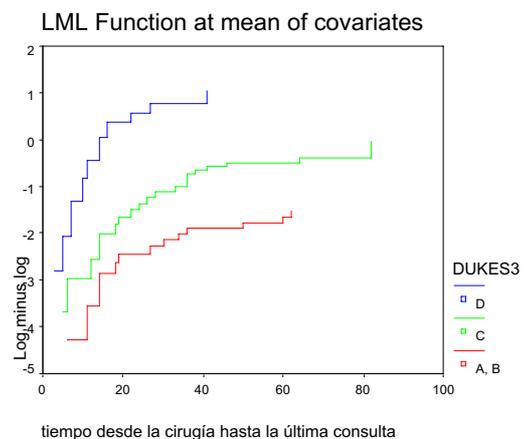


Figura 25. Modelo de Cox para el estadio de Dukes. Se compara la supervivencia de las categorías Dukes A,B (72 tumores), Dukes C (40 tumores) y Dukes D (17 tumores). a) Parte de los resultados proporcionados por el programa SPSS en la que se muestran los parámetros principales del modelo (B = β (coeficientes); Exp (B) = HR (riesgo relativo); Sig: significación de los tests estadísticos). b) y c) Curvas de supervivencia (b) y del logaritmo del riesgo acumulado (c) que muestran la proporcionalidad en los riesgos de los tres grupos comparados.

Si la covariable es cualitativa con más de dos categorías se elige una de ellas como categoría de referencia (si es posible la que se supone que tiene menos riesgo) contra la que se comparan las demás. Cada categoría constituirá un término independiente del modelo e irá acompañada por un coeficiente que indica cuánto aumenta la mortalidad respecto a la categoría de referencia. A la categoría de referencia, por definición, se le asigna $HR=1$. Cuando la estimación del riesgo para las otras categorías es de $\beta=0$ ($HR=1$) indica que el riesgo de morir es el mismo en la categoría analizada que en la de referencia. De esta manera los coeficientes cuantifican las diferencias de riesgo entre los grupos. En la figura 25 se muestra un ejemplo de modelo de Cox para el estadio de Dukes. La columna $Exp(B)$ (figura 25a) indica el aumento de riesgo de las categorías Dukes C y D respecto a la categoría de referencia Dukes AB. Los pacientes con tumores Dukes C tienen 3.2 veces más probabilidad de morir que los pacientes con tumores Dukes AB y los pacientes con tumores Dukes D 18.8 veces más. En ambos casos este aumento del riesgo es significativo. También se representa gráficamente la proporcionalidad entre los riesgos de los diferentes grupos (figura 25b y 25c)

Si la covariable es cuantitativa los coeficientes indican el aumento que se produce en el riesgo al aumentar en una unidad la variable. Este aumento es el resultado de multiplicar el riesgo por $exp(\beta)$. Es importante señalar que **si las variables están codificadas en unidades muy pequeñas** los coeficientes que se obtienen son muy bajos y difícilmente interpretables, por lo que **se recomienda reescalar las variables**. Por ejemplo, todos los valores de la variable se pueden multiplicar por 10 de manera que los riesgos relativos se interpreten como el aumento del riesgo asociado al incremento de la variable en 10 unidades (en lugar de una) (ver apartado 4.2.2 de Resultados). En los modelos de variables cuantitativas es necesario comprobar si existe linealidad, es decir, si el aumento del riesgo se da de la misma manera en todo el rango de la variable. Un método para estudiar la linealidad consiste en añadir al modelo un término cuadrático. Se trata de introducir en el modelo junto con la variable cuantitativa una nueva covariable que será la variable cuantitativa elevada al cuadrado. Si la introducción del término cuadrático es significativa indica que existe una desviación de la linealidad. Esto no impide que se puedan calcular modelos de Cox, pero hay que tener en cuenta que en estos casos la función de riesgo presenta una curvatura y los coeficientes de las covariables son más difíciles de interpretar. **Aunque no se haya observado desviación de la linealidad, siempre es útil representar la función de riesgo** (variación del riesgo relativo en función de los valores de la variable) ya que pueden existir relaciones no lineales que no alcancen la significación estadística en los tests de desviación de la linealidad. Se recomienda usar métodos de suavizado del tipo *splines* definidos con dos grados de

libertad para no forzar la linealidad de las variables. Esto permite que la función de riesgo pueda adquirir, si así lo requiere, el grado de curvatura correspondiente a un polinomio de segundo grado.

Una vez que somos capaces de interpretar un modelo de Cox de una sola variable, ya sea cualitativa o cuantitativa, podemos pasar a analizar modelos multivariantes. **Los modelos multivariantes permiten descubrir las relaciones que existen entre las variables que se asocian a supervivencia.** La estrategia a seguir consiste en elaborar un modelo con dos variables (o modelo ajustado) y ver si aporta más información que los modelos univariantes. En el modelo multivariante cada variable se ajusta por las demás, de manera que los coeficientes cambian. Si las dos variables son independientes, es decir, que ejercen un efecto separado sobre el pronóstico, ambas mantendrán su significación. Pero si las variables están relacionadas, la de menor valor pronóstico perderá su significación en favor de la de mayor valor pronóstico. La mejor manera de analizar la utilidad de los modelos de dos variables es compararlos con los modelos de una variable mediante un test de razón de verosimilitud. Si el test es estadísticamente significativo indica que la nueva variable introducida aporta información a la variable anterior. Si no es así quiere decir que la nueva variable se puede descartar del modelo porque su información ya está incluida en la variable anterior.

Otro punto fundamental en el análisis multivariante es el estudio de las **interacciones**. Cuando se analiza un modelo de dos variables es necesario crear a continuación un segundo modelo que incluya las dos variables más el término de la interacción entre ambas. **El término de interacción valora si el riesgo de una variable cambia según las categorías de las otras.** Estos modelos se llaman de interacción o de modificación de efecto. Para evaluar la significación de la interacción se realiza un test de razón de verosimilitud que compara el modelo suma (las dos variables) contra el modelo producto (las dos variables y su interacción). Si el test de razón de verosimilitud es estadísticamente significativo indica que existe interacción, es decir, que el efecto (riesgo) de una variable está modificado por la otra. En los casos en que existe interacción es necesario interpretarla mediante la realización de gráficos. Si una de las variables es cuantitativa y la otra es cualitativa (como en la mayoría de nuestros casos) simplemente hay que dividir la población en los grupos de la variable cualitativa y estudiar para cada grupo como la variable cuantitativa afecta al riesgo. Cuando las dos variables son cuantitativas es recomendable dicotomizar una de ellas para poder realizar las representaciones gráficas.

APÉNDICE 2

SECUENCIA DE LAS BANDAS DE MAYOR INTERÉS OBTENIDAS POR AP-PCR

banda 55/56 (8q13.2) D8D1776

GGGAAAATGAATGTGAAACTAACATTCGATAGCAGCCATCACTAATAAAGCGCGAAAGTA
ACATACAGACTTTTTAAAAGCACAAAGGATCGGAAGCTTTATTTAAAAGGTCCTAAGCAGGAC
ATTCTTTTTTCTGGTTAACATGGCAGGTTACACATATATTTATGTCCCAATTCCTAATAA
ATTACAGTTAAGGGATTTCAACCATCCCCACCAAACA-AATTGAAGGAGTTCAAGAGAG
AAAACACAGAAGTGATGGCCACATTTAGGACCAGAAAAGATGGCTACTAAAATCGGAGGA
GAAAGCAAACACCTAGATCTACGGGTGAATTTGAGTAAGCAAGGTAATTTCTAGATCTGG
AAAGGTCTGGAAGTGAAGGTTCCAGGTATTTCTTAATGGAATGAATGGCTGATGGTTGG
TCTAAGAAG

banda 7 (9p24.1) D9S2065

No fue posible obtener la secuencia de esta banda, pero el mapaje se pudo realizar mediante la amplificación con el primer de AP-PCR del panel de híbridos irradiados.

banda 91/92 (9q22.31-9q22.33) D9S2019

ATATCAGCCATAAGGCTGTTTTGCTTTCTTATCATTTCATGTGTTCACTGAAACAGCACTT
TTAATTCCTTCAAGAATTTTTCTTTGCATTCAAACCTGACTGTTGGAGTGCAGGCCG
GCCTAGCTTTTGGCCTATCTCTGCTTTCAACCTGCCTTCAACCTGCCAACCTCACTAAGC
TTAATCATTTCAGATTTTGGTTTGAAGTGAGAGATGTGTGACTCTTTCTTACTTGAA
CACTTAGAGACAACCTGCAGGGTTATTAACCTGACCTAACTTCAATATTGTGTCTTAGAGAA
TAGGGCAAGGAGAGGAAGAGAGATGGAGGAGCAGTGGGTAGAGCAGTCAGAACGACAGAA
CACTTAACAATAAGTCTGCCTCTTATCTGGCATGTTGTGTACCAACATCATGTACAGAGT
ATCACTGTC-CCACACTGTGCACCCGCCAAGTGTGACGGCTATCINNATGGTGCTTATGT
TTGCTCATGTAGGTTTCTAATTTCAATTTGTNNNAATGTAATCTGCAAAGTGCAATAAAG
TGAGGTATGCCTGGACCACGAAATGAGAATTTGAAATTAATCGCCGATTTACATTACATT
AGCACCCAAATGAAATCGAAATAGGTATAAATCTAACAAATTAGGTA AACATCTACATG
AGGAAATCCACAATACTCTAATGAAAGAAAATAAAAAAAGATCTAAATAAATGGAGAA

banda 46/47 (Xp11.3) DXS877

TTGGCTAGAAAAGAAAAACAAATCTTATTTAAAATGGGCAGAAGGCATGAAGGGAAAGTT
CACTGAAGAGCATATACAGATGGCAAATAGGCACGTGAAAAGATGTTCAACATTACTATC
CATTTGCTAAATACAAATTTATACCAAATGAGATGTTACTACATACCAATTTAGAACAT
CTAAAAATAAAAAATAATGAAAATACCAAATAATGGCAGGNATATAGAGAAACTGAATCTC
TCACACATTAACATAATGGAATGCAAATGGTACGCCTCTCTGAAACAGTTTCGCAATTTCT
TAAACAAACAAAATCCTGATATGCAATTACCAGTATAACCCAGGAACTGCACTCGAGGGC
ATTTATCCTAGAGATGAATGAAATGAAAATTTGATTTACACGAAAACCTGTACACAAAGG
TTTACAGCCATTTTATTACAAAAGCCAAAACCTGTAATAACCCAAATATCCTTCAACAG
GGAGTGGTTAAACAAACTGTAGTACATCTACACCATGGAACACTACTCAGCAATAAAAAAG
GAACAAACTATTGATACACACAACAACATATCA

banda 107 (Xp21.2-Xp21.3) DXS9746

ATGTTGCACACCTAGAAATAATTTCTTCTTTCATTCAACGTATAAACAAAAGTCACTTGT
GGCAAAGTGGTACTTTTTACTGATATTATAACCAGAAAAACCGTAAAAGGATCCGTATGA
TTGTATGAAAGGATGTTCCCACTATAGAAATCATCTTGCAACAATGACCAAGATAGTTAC
CAATAATAGCATTTCATTTTTTTAAACCCACAAATTTATCCATGAGGAAATGCTGTGTAT
CAAACCTTGTAAAGAATAACAAGAAAGAGCTCTGATCTTTTGTGCAAACTTAAAGGAAC
TTATTTGTAAATTAAGACCAAGTTATAAGTGGTTTTATAAAAAATCACAAGGTCATTACAA
TGTTGTTTTTACTAAAAGCCTAACATAATCCACAATGACCACTCTTCTCCATCTTCTCCT

banda 125/126 (Xp21.2-Xp21.3) DXS1214

CACACCTAGAAATAATTTCTTCCTTCATTCAACGTATAAACAAAAGTCACTTGTGGCCAA
GTGGTACTTTTTACTGATATTATAACCAGAAAAACCGTAAGAGGATCCGTATGATTGTAT
GAAAGGATGCTCCCCTATAGAAATCGATCTTGCAACAATGACCAAGATAGTTACCAATA
ATAGCATTTCATTTTTTAAACCCACAAATTATCCATGAGGAAATGCTGTGTATCAAACC
TTGTTAAGAATAACAAGAAAGAGCTCTGTACTTTTGATGCAAAGCTTAAAGGGAACTTAT
TTGTAAATTAAGACCAAGTTATAAGTGGTTTCATAAAAAATGCAGCAAAGGGTCATTACAA
TGTGTTTTTACTAAAAGCCTAACTAATCCACAATGACCACTCTTCTCCATCTTCCT

NOTA: N = nucleótidos sin identificar
- = *gaps* de secuencia

BIBLIOGRAFÍA

- Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, et al. (1993) Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 260: 812-6.
- Abad A FA, Martin C (1997) Factores pronósticos del cáncer de colon y recto. *Rev Cancer* 11: 25-31
- Abdel-Rahman WM, Katsura K, Rens W, Gorman PA, Sheer D, Bicknell D, Bodmer WF, Arends MJ, Wyllie AH, Edwards PA (2001) Spectral karyotyping suggests additional subsets of colorectal cancers characterized by pattern of chromosome rearrangement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 2538-2543.
- Achille A, Biasi MO, Zamboni G, Bogina G, Magalini AR, Pederzoli P, Perucho M, Scarpa A (1996) Chromosome 7q allelic losses in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 56: 3808-13.
- Adachi Y, Kido A, Mori M, Matsushima T, Shimono R, Inoue T, Sugimachi K (1995) Nuclear DNA content and nucleolar organizer regions in colorectal cancer. *J Surg Oncol* 59: 177-80.
- Agapova LS, Ilyinskaya GV, Turovets NA, Ivanov AV, Chumakov PM, Kopnin BP (1996) Chromosome changes caused by alterations of p53 expression. *Mutat Res* 354: 129-38.
- Agochiya M, Brunton VG, Owens DW, Parkinson EK, Paraskeva C, Keith WN, Frame MC (1999) Increased dosage and amplification of the focal adhesion kinase gene in human cancer cells. *Oncogene* 18: 5646-53.
- Ahnen DJ, Feigl P, Quan G, Fenoglio-Preiser C, Lovato LC, Bunn PA, Stemmerman G, Wells JD, Macdonald JS, Meyskens FL (1998) Ki-ras mutation and p53 overexpression predict the clinical behavior of colorectal cancer: a Southwest Oncology Group study. *Cancer Res* 58: 1149-58.
- Albanopoulos K, Armakolas A, Konstadoulakis MM, Leandros E, Tsiobanou E, Katsaragakis S, Alexiou D, Androulakis G (2000) Prognostic significance of circulating antibodies against carcinoembryonic antigen (anti-CEA) in patients with colon cancer. *Am J Gastroenterol* 95: 1056-61.
- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Staudt LM, et al. (2000) Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403: 503-11.
- Alon U, Barkai N, Notterman DA, Gish K, Ybarra S, Mack D, Levine AJ (1999) Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6745-50.
- Altman DG, Lausen B, Sauerbrei W, Schumacher M (1994) Dangers of using "optimal" cutpoints in the evaluation of prognostic factors. *J Natl Cancer Inst* 86: 829-35.
- Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA (1998) Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst* 90: 675-84.

- Arends JW (2000) Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinoma. *J Pathol* 190: 412-6.
- Arribas R, Capella G, Tortola S, Masramon L, Grizzle WE, Perucho M, Peinado MA (1997) Assessment of genomic damage in colorectal cancer by DNA fingerprinting: prognostic applications. *J Clin Oncol* 15: 3230-40.
- Arribas R, Ribas M, Risques RA, Masramon L, Tortola S, Marcuello E, Aiza G, Miro R, Capella G, Peinado MA (1999a) Prospective assessment of allelic losses at 4p14-16 in colorectal cancer: two mutational patterns and a locus associated with poorer survival. *Clin Cancer Res* 5: 3454-9.
- Arribas R, Risques RA, Gonzalez-Garcia I, Masramon L, Aiza G, Ribas M, Capella G, Peinado MA (1999b) Tracking recurrent quantitative genomic alterations in colorectal cancer: allelic losses in chromosome 4 correlate with tumor aggressiveness. *Lab Invest* 79: 111-22.
- Artandi SE, Chang S, Lee SL, Alson S, Gottlieb GJ, Chin L, DePinho RA (2000) Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature* 406: 641-5.
- Arzimanoglou, II, Gilbert F, Barber HR (1998) Microsatellite instability in human solid tumors. *Cancer* 82: 1808-20.
- ASCO (1996) Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. Adopted on May 17, 1996 by the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 14: 2843-77.
- Bardi G, Sukhikh T, Pandis N, Fenger C, Kronborg O, Heim S (1995) Karyotypic characterization of colorectal adenocarcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 12: 97-109.
- Basik M, Stoler DL, Kontzoglou KC, Rodriguez-Bigas MA, Petrelli NJ, Anderson GR (1997) Genomic instability in sporadic colorectal cancer quantitated by inter-simple sequence repeat PCR analysis. *Genes Chromosomes Cancer* 18: 19-29.
- Bathe OF, Franceschi D, Livingstone AS, Moffat FL, Tian E, Ardalan B (1999) Increased thymidylate synthase gene expression in liver metastases from colorectal carcinoma: implications for chemotherapeutic options and survival. *Cancer J Sci Am* 5: 34-40.
- Bauer KD, Bagwell CB, Giaretti W, Melamed M, Zarbo RJ, Witzig TE, Rabinovitch PS (1993) Consensus review of the clinical utility of DNA flow cytometry in colorectal cancer. *Cytometry* 14: 486-91
- Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP (1998) Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 72: 141-96
- Belluco C, Nitti D, Frantz M, Toppan P, Basso D, Plebani M, Lise M, Jessup JM (2000) Interleukin-6 blood level is associated with circulating carcinoembryonic antigen and prognosis in patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 7: 133-8.
- Bergstrom C, Emdin S, Roos G, Stenling R (1995) DNA content in colorectal carcinoma: a flow cytometric study of the epithelial fraction. *Anal Cell Pathol* 8: 287-95.

- Berney CR, Yang JL, Fisher RJ, Russell PJ, Crowe PJ (1998) Overexpression of nm23 protein assessed by color video image analysis in metastatic colorectal cancer: correlation with reduced patient survival. *World J Surg* 22: 484-90.
- Bhatavdekar JM, Patel DD, Chikhlikar PR, Trivedi TI, Gosalia NM, Ghosh N, Shah NG, Vora HH, Suthar TP (1998) Overexpression of CD44: a useful independent predictor of prognosis in patients with colorectal carcinomas. *Ann Surg Oncol* 5: 495-501.
- Bhatavdekar JM, Patel DD, Ghosh N, Chikhlikar PR, Trivedi TI, Suthar TP, Doctor SS, Shah NG, Balar DB (1997) Coexpression of Bcl-2, c-Myc, and p53 oncoproteins as prognostic discriminants in patients with colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 40: 785-90.
- Boland CR (1997) Genetic pathways to colorectal cancer. *Hosp Pract (Off Ed)* 32: 79-84, 87-96.
- Boland CR, Ricciardiello L (1999) How many mutations does it take to make a tumor? *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14675-7.
- Boland CR, Sato J, Appelman HD, Bresalier RS, Feinberg AP (1995) Microallelotyping defines the sequence and tempo of allelic losses at tumour suppressor gene loci during colorectal cancer progression. *Nat Med* 1: 902-9.
- Bonithon-Kopp C, Kronborg O, Giacosa A, Rath U, Faivre J (2000) Calcium and fibre supplementation in prevention of colorectal adenoma recurrence: a randomised intervention trial. European Cancer Prevention Organisation Study Group. *Lancet* 356: 1300-6.
- Borresen-Dale AL, Lothe RA, Meling GI, Hainaut P, Rognum TO, Skovlund E (1998) TP53 and long-term prognosis in colorectal cancer: mutations in the L3 zinc-binding domain predict poor survival. *Clin Cancer Res* 4: 203-10.
- Bouzourene H, Gervaz P, Cerottini JP, Benhattar J, Chaubert P, Saraga E, Pampallona S, Bosman FT, Givel JC (2000) p53 and Ki-ras as prognostic factors for Dukes' stage B colorectal cancer. *Eur J Cancer* 36: 1008-15.
- Boveri T (1914) *Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren*. Jena. Gustav Fisher.
- Breivik J, Lothe RA, Meling GI, Rognum TO, Borresen-Dale AL, Gaudernack G (1997) Different genetic pathways to proximal and distal colorectal cancer influenced by sex-related factors. *Int J Cancer* 74: 664-9.
- Buglioni S, D'Agnano I, Cosimelli M, Vasselli S, D'Angelo C, Tedesco M, Zupi G, Mottolese M (1999) Evaluation of multiple bio-pathological factors in colorectal adenocarcinomas: independent prognostic role of p53 and bcl-2. *Int J Cancer* 84: 545-52.
- Bukholm IK, Nesland JM (2000) Protein expression of p53, p21 (WAF1/CIP1), bcl-2, Bax, cyclin D1 and pRb in human colon carcinomas. *Virchows Arch* 436: 224-8.
- Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C (1999) Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol* 9: M57-60.
- Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 392: 300-3.

- Campo E, Miquel R, Jares P, Bosch F, Juan M, Leone A, Vives J, Cardesa A, Yague J (1994) Prognostic significance of the loss of heterozygosity of Nm23-H1 and p53 genes in human colorectal carcinomas. *Cancer* 73: 2913-21.
- Carder P, Wyllie AH, Purdie CA, Morris RG, White S, Piris J, Bird CC (1993) Stabilised p53 facilitates aneuploid clonal divergence in colorectal cancer. *Oncogene* 8: 1397-401.
- Carder PJ, Cripps KJ, Morris R, Collins S, White S, Bird CC, Wyllie AH (1995) Mutation of the p53 gene precedes aneuploid clonal divergence in colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 71: 215-8.
- Carethers JM, Hawn MT, Greenson JK, Hitchcock CL, Boland CR (1998) Prognostic significance of allelic loss at chromosome 18q21 for stage II colorectal cancer. *Gastroenterology* 114: 1188-95.
- Cerottini JP, Caplin S, Saraga E, Givel JC, Benhattar J (1998) The type of K-ras mutation determines prognosis in colorectal cancer. *Am J Surg* 175: 198-202.
- Cheah PY, Cao X, Eu KW, Seow-Choen F (1998) NM23-H1 immunostaining is inversely associated with tumour staging but not overall survival or disease recurrence in colorectal carcinomas. *Br J Cancer* 77: 1164-8.
- Cheng KC, Loeb LA (1993) Genomic instability and tumor progression: mechanistic considerations. *Adv Cancer Res* 60: 121-56
- Chin L, Artandi SE, Shen Q, Tam A, Lee SL, Gottlieb GJ, Greider CW, DePinho RA (1999) p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell* 97: 527-38.
- Cifone MA, Fidler IJ (1981) Increasing metastatic potential is associated with increasing genetic instability of clones isolated from murine neoplasms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 6949-52.
- Clusellas N (1995) Anomalies cromosòmiques: què són i com es produeixen. In: *Del cromosoma al gen*. Corporació Sanitària. Institut de Bioquímica Clínica.
- Cohn KH, Ornstein DL, Wang F, LaPaix FD, Phipps K, Edelsberg C, Zuna R, Mott LA, Dunn JL (1997) The significance of allelic deletions and aneuploidy in colorectal carcinoma. Results of a 5-year follow-up study. *Cancer* 79: 233-44.
- Coleman WB, Tsongalis GJ (1999) The role of genomic instability in human carcinogenesis. *Anticancer Res* 19: 4645-64.
- Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, Hammond ME, Henson DE, Hutter RV, Nagle RB, Nielsen ML, Sargent DJ, Taylor CR, Welton M, Willett C (2000) Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 124: 979-94.
- Coppola D, Hyacinthe M, Fu L, Cantor AB, Karl R, Marcet J, Cooper DL, Nicosia SV, Cooper HS (1998) CD44V6 expression in human colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 29: 627-35.
- Cosimelli M, D'Agnano I, Tedesco M, D'Angelo C, Botti C, Giannarelli D, Vasselli S, Cavaliere F, Zupi G, Cavaliere R (1998) The role of multiploidy as unfavorable prognostic variable in colorectal cancer. *Anticancer Res* 18: 1957-65.

- Crissman JD, Zarbo RJ, Ma CK, Visscher DW (1989) Histopathologic parameters and DNA analysis in colorectal adenocarcinomas. *Pathol Annu* 24: 103-47.
- de Juan C, Iniesta P, Vega FJ, Peinado MA, Fernandez C, Caldes T, Massa MJ, Lopez JA, Sanchez A, Torres AJ, Balibrea JL, Benito M (1998) Prognostic value of genomic damage in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 77: 1971-7.
- Deans GT, Parks TG, Rowlands BJ, Spence RA (1992) Prognostic factors in colorectal cancer. *Br J Surg* 79: 608-13.
- Dix BR, Robbins P, Soong R, Jenner D, House AK, Iacopetta BJ (1994) The common molecular genetic alterations in Dukes' B and C colorectal carcinomas are not short-term prognostic indicators of survival. *Int J Cancer* 59: 747-51.
- Domenech, J (1993) Índices de mortalidad y morbilidad, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Dorudi S, Hanby AM, Poulson R, Northover J, Hart IR (1995) Level of expression of E-cadherin mRNA in colorectal cancer correlates with clinical outcome. *Br J Cancer* 71: 614-6.
- Duesberg P, Rasnick D, Li R, Winters L, Rausch C, Hehlmann R (1999) How aneuploidy may cause cancer and genetic instability. *Anticancer Res* 19: 4887-906.
- Duesberg P, Rausch C, Rasnick D, Hehlmann R (1998) Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13692-7.
- Dutrillaux B (1995) Pathways of chromosome alteration in human epithelial cancers. *Adv Cancer Res* 67: 59-82
- Edler D, Kressner U, Ragnhammar P, Johnston PG, Magnusson I, Glimelius B, Pahlman L, Lindmark G, Blomgren H (2000) Immunohistochemically detected thymidylate synthase in colorectal cancer: an independent prognostic factor of survival. *Clin Cancer Res* 6: 488-92.
- Eminovic-Behrem S, Trobonjaca Z, Petrovecki M, Dobi-Babic R, Dujmovic M, Jonjic N (2000) Prognostic significance of DNA ploidy pattern and nucleolar organizer regions (AgNOR) in colorectal carcinoma. *Croat Med J* 41: 154-8.
- Erisman MD, Litwin S, Keidan RD, Comis RL, Astrin SM (1988) Noncorrelation of the expression of the c-myc oncogene in colorectal carcinoma with recurrence of disease or patient survival. *Cancer Res* 48: 1350-5.
- Fahy B, Bold RJ (1998) Epidemiology and molecular genetics of colorectal cancer. *Surg Oncol* 7: 115-23.
- Fearon ER, Jones PA (1992) Progressing toward a molecular description of colorectal cancer development. *Faseb J* 6: 2783-90.
- Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-67.
- Flyger HL, Larsen JK, Nielsen HJ, Christensen IJ (1999) DNA ploidy in colorectal cancer, heterogeneity within and between tumors and relation to survival. *Cytometry* 38: 293-300.
- Frei JV, Martinez VJ (1993) DNA flow cytometry of fresh and paraffin-embedded tissue using cytochrome staining. *Mod Pathol* 6: 599-605.
- Funk JO (1999) Cancer cell cycle control. *Anticancer Res* 19: 4772-80.
- Gallego MG, Acenero MJ, Ortega S, Delgado AA, Cantero JL (2000) Prognostic influence of p53 nuclear overexpression in colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 43: 971-5.

- Gandolfo GM, Conti L, Vercillo M (1996) Fibrinolysis components as prognostic markers in breast cancer and colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 16: 2155-9.
- Gennari L, Doci R, Rossetti C (2000) Prognostic factors in colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 47: 310-4.
- Georgiades IB, Curtis LJ, Morris RM, Bird CC, Wyllie AH (1999) Heterogeneity studies identify a subset of sporadic colorectal cancers without evidence for chromosomal or microsatellite instability. *Oncogene* 18: 7933-40.
- Ghadirian P, Lacroix A, Maisonneuve P, Perret C, Potvin C, Gravel D, Bernard D, Boyle P (1997) Nutritional factors and colon carcinoma: a case-control study involving French Canadians in Montreal, Quebec, Canada. *Cancer* 80: 858-64.
- Gisselsson D, Pettersson L, Hoglund M, Heidenblad M, Gorunova L, Wiegant J, Mertens F, Dal Cin P, Mitelman F, Mandahl N (2000) Chromosomal breakage-fusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5357-62.
- Giuffre G, Barresi G, Speciale G, Gioffre Sarnelli R, Florio MA, Tuccari G (1997) Differences in AgNOR quantity between colorectal cancer and corresponding metastases: are they useful for prognostic purposes? *Eur J Histochem* 41: 111-8
- Goh HS, Yao J, Smith DR (1995) p53 point mutation and survival in colorectal cancer patients. *Cancer Res* 55: 5217-21.
- Gonzalez-Garcia I, Moreno V, Navarro M, Marti-Rague J, Marcuello E, Benasco C, Campos O, Capella G, Peinado MA (2000) Standardized approach for microsatellite instability detection in colorectal carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 92: 544-9.
- Gonzalzo ML, Liang G, Spruck CH, Zingg JM, Rideout WM, Jones PA (1997) Identification and characterization of differentially methylated regions of genomic DNA by methylation-sensitive arbitrarily primed PCR. *Cancer Res* 57: 594-9.
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54: 4855-78.
- Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, Redston M, Gallinger S (2000) Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 342: 69-77.
- Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA (1999) Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400: 464-8.
- Halling KC, French AJ, McDonnell SK, Burgart LJ, Schaid DJ, Peterson BJ, Moon-Tasson L, Mahoney MR, Sargent DJ, O'Connell MJ, Witzig TE, Farr GH, Goldberg RM, Thibodeau SN (1999) Microsatellite instability and 8p allelic imbalance in stage B2 and C colorectal cancers. *J Natl Cancer Inst* 91: 1295-303.
- Hamelin R, Laurent-Puig P, Olschwang S, Jegou N, Asselain B, Remvikos Y, Girodet J, Salmon RJ, Thomas G (1994) Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 106: 42-8.
- Hanahan D (2000) Benefits of bad telomeres. *Nature* 406: 573-4.

- Handa K, Yamakawa M, Takeda H, Kimura S, Takahashi T (1999) Expression of cell cycle markers in colorectal carcinoma: superiority of cyclin A as an indicator of poor prognosis. *Int J Cancer* 84: 225-33.
- Harrison LE, Guillem JG, Paty P, Cohen AM (1997) Preoperative carcinoembryonic antigen predicts outcomes in node-negative colon cancer patients: a multivariate analysis of 572 patients. *J Am Coll Surg* 185: 55-9.
- Hartwell L (1992) Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell* 71: 543-6.
- Hartwell LH, Kastan MB (1994) Cell cycle control and cancer. *Science* 266: 1821-8.
- Haruyama K, Matsumura Y, Moriya Y, Kakizoe T, Ochiai A, Kawaguchi M, Saito T (1999) Clinicopathological significance of the expression of CD44v2 in colorectal cancer. *Anticancer Res* 19: 4421-8.
- Hasegawa H, Ueda M, Furukawa K, Watanabe M, Teramoto T, Mukai M, Kitajima M (1995) p53 gene mutations in early colorectal carcinoma. De novo vs. adenoma-carcinoma sequence. *Int J Cancer* 64: 47-51.
- Hawkins NJ, Tomlinson I, Meagher A, Ward RL (2001) Microsatellite-stable diploid carcinoma: a biologically distinct and aggressive subset of sporadic colorectal cancer. *Br J Cancer* 84: 232-236.
- Heim S, Johansson B, Mertens F (1989) Constitutional chromosome instability and cancer risk. *Mutat Res* 221: 39-51.
- Heim S, Mitelman F (1995) *Cancer Cytogenetics*, 2nd edition. Wiley-Liss. New York.
- Hellman S (1997) Darwin's clinical relevance. *Cancer* 79: 2275-81.
- Hepner GH, Miller FR (1998) The cellular basis of tumor progression. *Int Rev Cytol* 177: 1-56
- Hernandez A, Smith F, Wang Q, Wang X, Evers BM (2000) Assessment of differential gene expression patterns in human colon cancers. *Ann Surg* 232: 576-85.
- Hill MJ (2000) Molecular and clinical risk markers in colon cancer trials. *Eur J Cancer* 36: 1288-91.
- Holliday R (1989) Chromosome error propagation and cancer. *Trends Genet* 5: 42-5.
- Houlston RS, Tomlinson IP (1997) Genetic prognostic markers in colorectal cancer. *Mol Pathol* 50: 281-8.
- Hutter RV, Sobin LH (1986) A universal staging system for cancer of the colon and rectum. Let there be light. *Arch Pathol Lab Med* 110: 367-8.
- Ilyas M, Novelli M, Wilkinson K, Tomlinson IP, Abbasi AM, Forbes A, Talbot IC (1997) Tumour recurrence is associated with Jass grouping but not with differences in E-cadherin expression in moderately differentiated Dukes' B colorectal cancers. *J Clin Pathol* 50: 218-22.
- Iniesta P, Massa MJ, Gonzalez-Quevedo R, de Juan C, Moran A, Sanchez-Pernaute A, Cerdan J, Torres A, Balibrea JL, Benito M (2000) Loss of heterozygosity at 3p23 is correlated with poor survival in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 89: 1220-7.

- Ioachim EE, Goussia AC, Agnantis NJ, Machera M, Tsianos EV, Kappas AM (1999) Prognostic evaluation of metallothionein expression in human colorectal neoplasms. *J Clin Pathol* 52: 876-9.
- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M (1993) Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363: 558-61.
- Jackson AL, Loeb LA (1998) The mutation rate and cancer. *Genetics* 148: 1483-90.
- Jarnik M, Tang JQ, Korab-Laskowska M, Zietkiewicz E, Cardinal G, Gorska-Flipot I, Sinnott D, Labuda D (1996) Overall informativity, OI, in DNA polymorphisms revealed by inter-Alu PCR: detection of genomic rearrangements. *Genomics* 36: 388-98.
- Jen J, Kim H, Piantadosi S, Liu ZF, Levitt RC, Sistonen P, Kinzler KW, Vogelstein B, Hamilton SR (1994) Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 331: 213-21.
- Johansson B, Mertens F, Mitelman F (1996) Primary vs. secondary neoplasia-associated chromosomal abnormalities--balanced rearrangements vs. genomic imbalances? *Genes Chromosomes Cancer* 16: 155-63.
- Jones DJ, Moore M, Schofield PF (1988) Refining the prognostic significance of DNA ploidy status in colorectal cancer: a prospective flow cytometric study. *Int J Cancer* 41: 206-10.
- Jones PA, Gonzalgo ML (1997) Altered DNA methylation and genome instability: a new pathway to cancer? *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 2103-5.
- Kahlenberg MS, Stoler DL, Basik M, Petrelli NJ, Rodriguez-Bigas M, Anderson GR (1996) p53 tumor suppressor gene status and the degree of genomic instability in sporadic colorectal cancers. *J Natl Cancer Inst* 88: 1665-70.
- Kahlenberg MS, Stoler DL, Rodriguez-Bigas MA, Weber TK, Driscoll DL, Anderson GR, Petrelli NJ (2000) p53 tumor suppressor gene mutations predict decreased survival of patients with sporadic colorectal carcinoma. *Cancer* 88: 1814-9.
- Kakisako K, Miyahara M, Uchino S, Adachi Y, Kitano S (1998) Prognostic significance of c-myc mRNA expression assessed by semi-quantitative RT-PCR in patients with colorectal cancer. *Oncol Rep* 5: 441-5.
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1993) Comparative genomic hybridization: a rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors. *Semin Cancer Biol* 4: 41-6.
- Kapitanovic S, Radošević S, Slade N, Kapitanovic M, Anđelinović S, Ferencić Z, Tavassoli M, Spaventi S, Pavelić K, Spaventi R (2000) Expression of erbB-3 protein in colorectal adenocarcinoma: correlation with poor survival. *J Cancer Res Clin Oncol* 126: 205-11.
- Kern SE, Fearon ER, Tersmette KW, Enterline JP, Leppert M, Nakamura Y, White R, Vogelstein B, Hamilton SR (1989) Clinical and pathological associations with allelic loss in colorectal carcinoma [corrected]. *Jama* 261: 3099-103.
- Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Landscaping the cancer terrain. *Science* 280: 1036-7.

- Knudson AG (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68: 820-3.
- Knuutila S, Bjorkqvist AM, Autio K, Tarkkanen M, Wolf M, Monni O, Szymanska J, Larramendy ML, Tapper J, Pere H, El-Rifai W, Hemmer S, Wasenius VM, Vidgren V, Zhu Y (1998) DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. *Am J Pathol* 152: 1107-23.
- Ko LJ, Prives C (1996) p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 10: 1054-72.
- Kohno T, Morishita K, Takano H, Shapiro DN, Yokota J (1994) Homozygous deletion at chromosome 2q33 in human small-cell lung carcinoma identified by arbitrarily primed PCR genomic fingerprinting. *Oncogene* 9: 103-8.
- Konstantinova LN, Fleischman EW, Knisch VI, Perevozchikov AG, Kopnin BP (1991) Karyotype peculiarities of human colorectal adenocarcinomas. *Hum Genet* 86: 491-6.
- Kressner U, Inganas M, Byding S, Blikstad I, Pahlman L, Glimelius B, Lindmark G (1999) Prognostic value of p53 genetic changes in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 17: 593-9.
- Laghi L (2000) Genetics of colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 47: 315-22.
- Lanza G, Matteuzzi M, Gafa R, Orvieto E, Maestri I, Santini A, del Senno L (1998) Chromosome 18q allelic loss and prognosis in stage II and III colon cancer. *Int J Cancer* 79: 390-5.
- Laurent-Puig P, Blons H, Cugnenc PH (1999) Sequence of molecular genetic events in colorectal tumorigenesis. *Eur J Cancer Prev* 8 Suppl 1: S39-47.
- Laurent-Puig P, Olschwang S, Delattre O, Remvikos Y, Asselain B, Melot T, Validire P, Muleris M, Girodet J, Salmon RJ, et al. (1992) Survival and acquired genetic alterations in colorectal cancer. *Gastroenterology* 102: 1136-41.
- Leers MP, Theunissen PH, Schutte TB, Ramaekers FC (1995) Bivariate cytokeratin/DNA flow cytometric analysis of paraffin-embedded samples from colorectal carcinomas. *Cytometry* 21: 101-7.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1997a) DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 2545-50.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1997b) Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 386: 623-7.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396: 643-9.
- Li R, Sonik A, Stindl R, Rasnick D, Duesberg P (2000) Aneuploidy vs. gene mutation hypothesis of cancer: recent study claims mutation but is found to support aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 3236-41.
- Liang P, Pardee AB (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-71.
- Lieberman D (1998) How to screen for colon cancer. *Annu Rev Med* 49: 163-72
- Lindmark G (1996) NM-23 H1 immunohistochemistry is not useful as predictor of metastatic potential of colorectal cancer. *Br J Cancer* 74: 1413-8.

- Livingstone LR, White A, Sprouse J, Livanos E, Jacks T, Tlsty TD (1992) Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell* 70: 923-35.
- Loeb KR, Loeb LA (1999) Genetic instability and the mutator phenotype. *Studies in ulcerative colitis. Am J Pathol* 154: 1621-6.
- Loeb KR, Loeb LA (2000) Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis* 21: 379-85.
- Loeb LA (1991) Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* 51: 3075-9.
- Macey M (1994) Introduction. Principles of flow cytometry. In: *Flow Cytometry. Clinical Applications*. Scientific-Publications B (ed)
- Maeda K, Chung YS, Kang SM, Ogawa M, Onoda N, Nakata B, Nishiguchi Y, Ikehara T, Okuno M, Sowa M (1997) Overexpression of cyclin D1 and p53 associated with disease recurrence in colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 74: 310-5.
- Maestro de las Casas ML SM, Rodríguez R (1997) Marcadores tumorales en cáncer de colon. *Rev Cancer* 11: 13-24
- Malkhosyan S, Yasuda J, Soto JL, Sekiya T, Yokota J, Perucho M (1998) Molecular karyotype (amplotype) of metastatic colorectal cancer by unbiased arbitrarily primed PCR DNA fingerprinting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10170-5.
- Manne U, Weiss HL, Grizzle WE (2000) Bcl-2 expression is associated with improved prognosis in patients with distal colorectal adenocarcinomas. *Int J Cancer* 89: 423-30.
- Martin L, Assem M, Piard F (1999) Are there several types of colorectal carcinomas? Correlations with genetic data. *Eur J Cancer Prev* 8 Suppl 1: S13-20.
- Martinez-Lopez E, Abad A, Font A, Monzo M, Ojanguren I, Pifarre A, Sanchez JJ, Martin C, Rosell R (1998) Allelic loss on chromosome 18q as a prognostic marker in stage II colorectal cancer. *Gastroenterology* 114: 1180-7.
- Masramon L (2000) Inestabilitat genòmica i càncer colorectal. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Massa MJ, Iniesta P, Gonzalez-Quevedo R, de Juan C, Caldes T, Sanchez-Pernaute A, Cerdan J, Torres AJ, Balibrea JL, Benito M (1999) Differential prognosis of replication error phenotype and loss of heterozygosity in sporadic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 35: 1676-82.
- Mekeel KL, Tang W, Kachnic LA, Luo CM, DeFrank JS, Powell SN (1997) Inactivation of p53 results in high rates of homologous recombination. *Oncogene* 14: 1847-57.
- Michel LS, Liberal V, Chatterjee A, Kirchwegger R, Pasche B, Gerald W, Dobles M, Sorger PK, Murty VV, Benezra R (2001) MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature* 409: 355-9.
- Mitelman F (2000) Recurrent chromosome aberrations in cancer. *Mutat Res* 462: 247-53.
- Mohri Y (1997) Prognostic significance of E-cadherin expression in human colorectal cancer tissue. *Surg Today* 27: 606-12

- Muleris M, Dutrillaux AM, Salmon RJ, Dutrillaux B (1990a) Sex chromosomes in a series of 79 colorectal cancers: replication pattern, numerical, and structural changes. *Genes Chromosomes Cancer* 1: 221-7.
- Muleris M, Dutrillaux B (1996) The accumulation and occurrence of clonal and unstable rearrangements are independent in colorectal cancer cells. *Cancer Genet Cytogenet* 92: 11-3.
- Muleris M, Salmon RJ, Dutrillaux B (1988) Existence of two distinct processes of chromosomal evolution in near-diploid colorectal tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 32: 43-50.
- Muleris M, Salmon RJ, Dutrillaux B (1990b) Cytogenetics of colorectal adenocarcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 46: 143-56.
- Muller HH, Heinimann K, Dobbie Z (2000) Genetics of hereditary colon cancer - a basis for prevention? *Eur J Cancer* 36: 1215-23.
- Muñoz A (1997) *Cáncer. Genes y nuevas terapias*. Editorial Hélice, Madrid
- Nakae S, Nakamura T, Ikegawa R, Yoshioka H, Shirono J, Tabuchi Y (1998) Evaluation of argyrophilic nucleolar organizer region and proliferating cell nuclear antigen in colorectal cancer. *J Surg Oncol* 69: 28-35.
- Nanashima A, Yamaguchi H, Shibasaki S, Sawai T, Yasutake T, Tsuji T, Nakagoe T, Ayabe H (1999) Proliferation of hepatic metastases of colorectal carcinoma: relationship to primary tumours and prognosis after hepatic resection. *J Gastroenterol Hepatol* 14: 61-6.
- Navarro JM, Jorcano JL (1999) The use of arbitrarily primed polymerase chain reaction in cancer research. *Electrophoresis* 20: 283-90.
- Nowell PC (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194: 23-8.
- Nowell PC (1986) Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res* 46: 2203-7.
- Offerhaus GJ, De Feyter EP, Cornelisse CJ, Tersmette KW, Floyd J, Kern SE, Vogelstein B, Hamilton SR (1992) The relationship of DNA aneuploidy to molecular genetic alterations in colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 102: 1612-9.
- Ofner D, Maier H, Riedmann B, Bammer T, Rumer A, Winde G, Bocker W, Jasani B, Schmid KW (1994) Immunohistochemical metallothionein expression in colorectal adenocarcinoma: correlation with tumour stage and patient survival. *Virchows Arch* 425: 491-7
- Ofner D, Riedmann B, Maier H, Hittmair A, Rumer A, Totsch M, Spechtenhauser B, Bocker W, Schmid KW (1995) Standardized staining and analysis of argyrophilic nucleolar organizer region associated proteins (AgNORs) in radically resected colorectal adenocarcinoma--correlation with tumour stage and long-term survival. *J Pathol* 175: 441-8.
- Ogunbiyi OA, Goodfellow PJ, Herfarth K, Gagliardi G, Swanson PE, Birnbaum EH, Read TE, Fleshman JW, Kodner IJ, Moley JF (1998) Confirmation that chromosome 18q allelic loss in colon cancer is a prognostic indicator. *J Clin Oncol* 16: 427-33.
- Ogura E, Senzaki H, Yamamoto D, Yoshida R, Takada H, Hioki K, Tsubura A (1999) Prognostic significance of Bcl-2, Bcl-xL/S, Bax and Bak expressions in colorectal carcinomas. *Oncol Rep* 6: 365-9.

- Olschwang S, Hamelin R, Laurent-Puig P, Thuille B, De Rycke Y, Li YJ, Muzeau F, Girodet J, Salmon RJ, Thomas G (1997) Alternative genetic pathways in colorectal carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12122-7.
- Orr-Weaver TL, Weinberg RA (1998) A checkpoint on the road to cancer. *Nature* 392: 223-4.
- Pajkos G, Kiss I, Sandor J, Ember I, Kishazi P (2000) The prognostic value of the presence of mutations at the codons 12, 13, 61 of K-ras oncogene in colorectal cancer. *Anticancer Res* 20: 1695-701.
- Palmqvist R, Stenling R, Oberg A, Landberg G (1998) Expression of cyclin D1 and retinoblastoma protein in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 34: 1575-81.
- Palmqvist R, Stenling R, Oberg A, Landberg G (1999) Prognostic significance of p27(Kip1) expression in colorectal cancer: a clinico-pathological characterization. *J Pathol* 188: 18-23.
- Pasche B, Luo Y, Rao PH, Nimer SD, Dmitrovsky E, Caron P, Luzzatto L, Offit K, Cordon-Cardo C, Renault B, Satagopan JM, Murty VV, Massague J (1998) Type I transforming growth factor beta receptor maps to 9q22 and exhibits a polymorphism and a rare variant within a polyalanine tract. *Cancer Res* 58: 2727-32.
- Peinado MA, Malkhosyan S, Velazquez A, Perucho M (1992) Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 10065-9.
- Pennisi E (1999) Trigger for centrosome replication found. *Science* 283: 770-1.
- Perot C, Bougaran J, Boccon-Gibod L, Storkel S, Leverger G, van den Akker J, Taillemite JL, Couturier J (1999) Two new cases of papillary renal cell carcinoma with t(X;1)(p11;q21) in females. *Cancer Genet Cytogenet* 110: 54-6.
- Perucho M, Peinado MA, Ionov Y, Casares S, Malkhosyan S, Stanbridge E (1994) Defects in replication fidelity of simple repeated sequences reveal a new mutator mechanism for oncogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 59: 339-48
- Petritz J, Tugues D, Garcia-Lopez J (1996) Relevance of forward scatter and side scatter in aneuploidy detection by flow cytometry. *Anal Cell Pathol* 10: 243-52.
- Picksley SM, Lane DP (1993) The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53? *Bioessays* 15: 689-90.
- Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CF, Jeffrey SS, Botstein D, Brown PO (1999) Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* 23: 41-6.
- Poller DN, Baxter KJ, Shepherd NA (1997) p53 and Rb1 protein expression: are they prognostically useful in colorectal cancer? *Br J Cancer* 75: 87-93
- Potter JD (1999) Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst* 91: 916-32.
- Raftopoulos I, Davaris P, Karatzas G, Karayannacos P, Kouraklis G (1998) Level of alpha-catenin expression in colorectal cancer correlates with invasiveness, metastatic potential, and survival. *J Surg Oncol* 68: 92-9.

- Remvikos Y, Muleris M, Salmon RJ, Dutrillaux B (1997) Colorectal carcinogenesis: from chromosomal evolution pathways to molecular pathogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* 93: 63-73.
- Remvikos Y, Vogt N, Muleris M, Salmon RJ, Malfoy B, Dutrillaux B (1995) DNA-repeat instability is associated with colorectal cancers presenting minimal chromosome rearrangements. *Genes Chromosomes Cancer* 12: 272-6.
- Ried T, Heselmeyer-Haddad K, Blegen H, Schrock E, Auer G (1999) Genomic changes defining the genesis, progression, and malignancy potential in solid human tumors: a phenotype/genotype correlation. *Genes Chromosomes Cancer* 25: 195-204.
- Ries S, Biederer C, Woods D, Shifman O, Shirasawa S, Sasazuki T, McMahon M, Oren M, McCormick F (2000) Opposing effects of Ras on p53: transcriptional activation of mdm2 and induction of p19ARF. *Cell* 103: 321-30.
- Ropponen KM, Eskelinen MJ, Lipponen PK, Alhava E, Kosma VM (1998) Expression of CD44 and variant proteins in human colorectal cancer and its relevance for prognosis. *Scand J Gastroenterol* 33: 301-9.
- Ropponen KM, Eskelinen MJ, Lipponen PK, Alhava EM, Kosma VM (1999) Reduced expression of alpha catenin is associated with poor prognosis in colorectal carcinoma. *J Clin Pathol* 52: 10-6.
- Ross DW (2000) Cancer: the emerging molecular biology. *Hosp Pract (Off Ed)* 35: 63-4, 67-74.
- Russo CA, Weber TK, Volpe CM, Stoler DL, Petrelli NJ, Rodriguez-Bigas M, Burhans WC, Anderson GR (1995) An anoxia inducible endonuclease and enhanced DNA breakage as contributors to genomic instability in cancer. *Cancer Res* 55: 1122-8.
- Safar A, Wickert R, Nelson M, Neff JR, Bridge JA (1998) Characterization of a variant SYT-SSX1 synovial sarcoma fusion transcript. *Diagn Mol Pathol* 7: 283-7.
- Saito M, Yamaguchi A, Goi T, Tsuchiyama T, Nakagawara G, Urano T, Shiku H, Furukawa K (1999) Expression of DCC protein in colorectal tumors and its relationship to tumor progression and metastasis. *Oncology* 56: 134-41
- Saito S, Tsuno N, Nagawa H, Sunami E, Zhengxi J, Osada T, Kitayama J, Shibata Y, Tsuruo T, Muto T (2000) Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor correlates with good prognosis in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 88: 42-9.
- Saitoh Y, Bruner JM, Levin VA, Kyritsis AP (1998) Identification of allelic loss on chromosome arm 6p in human astrocytomas by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Genes Chromosomes Cancer* 22: 165-70.
- Salahshor S, Kressner U, Fischer H, Lindmark G, Glimelius B, Pahlman L, Lindblom A (1999) Microsatellite instability in sporadic colorectal cancer is not an independent prognostic factor. *Br J Cancer* 81: 190-3.
- Sastre J, Díaz-Rubio E (1998) *Cáncer colorrectal. Oncología médica. Guía de prescripción.*, 2a edición.

- Schatzkin A, Lanza E, Corle D, Lance P, Iber F, Caan B, Shike M, Weissfeld J, Burt R, Cooper MR, Kikendall JW, Cahill J (2000) Lack of effect of a low-fat, high-fiber diet on the recurrence of colorectal adenomas. Polyp Prevention Trial Study Group. *N Engl J Med* 342: 1149-55.
- Schroer A, Schneider S, Ropers H, Nothwang H (1999) Cloning and characterization of UXT, a novel gene in human Xp11, which is widely and abundantly expressed in tumor tissue. *Genomics* 56: 340-3.
- Schwandner O, Schiedeck TH, Bruch HP, Duchrow M, Windhoevel U, Broll R (2000) p53 and Bcl-2 as significant predictors of recurrence and survival in rectal cancer. *Eur J Cancer* 36: 348-56.
- Scott CA, Desinan L, Avellini C, Bardus P, Rimondi G, Rizzi V, Beltrami CA (1998) DNA index shift with disease progression in colorectal adenocarcinoma: a morphological and flow cytometric study. *Hum Pathol* 29: 482-90.
- Shackney SE, Shankey TV (1997) Common patterns of genetic evolution in human solid tumors. *Cytometry* 29: 1-27.
- Shankey TV, Rabinovitch PS, Bagwell B, Bauer KD, Duque RE, Hedley DW, Mayall BH, Wheelless L, Cox C (1993) Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. *International Society for Analytical Cytology. Cytometry* 14: 472-7
- Shibata D, Reale MA, Lavin P, Silverman M, Fearon ER, Steele G, Jessup JM, Loda M, Summerhayes IC (1996) The DCC protein and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 335: 1727-32.
- Shiota G, Ishida M, Noguchi N, Oyama K, Takano Y, Okubo M, Katayama S, Tomie Y, Harada K, Hori K, Ashida K, Kishimoto Y, Hosoda A, Suou T, Kanbe T, Tanaka K, Nosaka K, Tanida O, Kojo H, Miura K, Ito H, Kaibara N, Kawasaki H (2000) Circulating p53 antibody in patients with colorectal cancer: relation to clinicopathologic features and survival. *Dig Dis Sci* 45: 122-8.
- Simon R, Altman DG (1994) Statistical aspects of prognostic factor studies in oncology. *Br J Cancer* 69: 979-85.
- Smith RA, Mettlin CJ, Davis KJ, Eyre H (2000) American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer. *CA Cancer J Clin* 50: 34-49.
- Span M, Moerkerk PT, De Goeij AF, Arends JW (1996) A detailed analysis of K-ras point mutations in relation to tumor progression and survival in colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 69: 241-5.
- Spruck CH, Won KA, Reed SI (1999) Deregulated cyclin E induces chromosome instability. *Nature* 401: 297-300.
- Stoler DL, Chen N, Basik M, Kahlenberg MS, Rodriguez-Bigas MA, Petrelli NJ, Anderson GR (1999) The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 15121-6.
- Sturm I, Kohne CH, Wolff G, Petrowsky H, Hillebrand T, Hauptmann S, Lorenz M, Dorken B, Daniel PT (1999) Analysis of the p53/BAX pathway in colorectal cancer: low BAX is a negative prognostic factor in patients with resected liver metastases. *J Clin Oncol* 17: 1364-74.

- Sun XF, Carstensen JM, Stal O, Zhang H, Nordenskjold B (1996) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in relation to ras, c-erbB-2,p53, clinico-pathological variables and prognosis in colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 69: 5-8.
- Sun XF, Rutten S, Zhang H, Nordenskjold B (1999) Expression of the deleted in colorectal cancer gene is related to prognosis in DNA diploid and low proliferative colorectal adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 17: 1745-50.
- Sutoh I, Kohno H, Nakashima Y, Hishikawa Y, Tabara H, Tachibana M, Kubota H, Nagasue N (2000) Concurrent expressions of metallothionein, glutathione S-transferase-pi, and P-glycoprotein in colorectal cancers. *Dis Colon Rectum* 43: 221-32.
- Tabuchi Y, Nakamura T, Kuniyasu T, Ohno M, Nakae S (1999) Expression of nm23-H1 in colorectal cancer: no association with metastases, histological stage, or survival. *Surg Today* 29: 116-20
- Takebayashi Y, Akiyama S, Akiba S, Yamada K, Miyadera K, Sumizawa T, Yamada Y, Murata F, Aikou T (1996) Clinicopathologic and prognostic significance of an angiogenic factor, thymidine phosphorylase, in human colorectal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 88: 1110-7.
- Takenoue T, Nagawa H, Matsuda K, Fujii S, Nita ME, Hatano K, Kitayama J, Tsuruo T, Muto T (2000) Relation between thymidylate synthase expression and survival in colon carcinoma, and determination of appropriate application of 5-fluorouracil by immunohistochemical method. *Ann Surg Oncol* 7: 193-8.
- Taniguchi T, Makino M, Suzuki K, Kaibara N (2000) Prognostic significance of reverse transcriptase-polymerase chain reaction measurement of carcinoembryonic antigen mRNA levels in tumor drainage blood and peripheral blood of patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 89: 970-6.
- Tatsumoto N, Hiyama E, Murakami Y, Imamura Y, Shay JW, Matsuura Y, Yokoyama T (2000) High telomerase activity is an independent prognostic indicator of poor outcome in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 6: 2696-701.
- Teh BT, Larsson C, Nordenskjold M (1999) Tumor suppressor genes (TSG). *Anticancer Res* 19: 4715-28.
- Tenjo T, Toyoda M, Okuda J, Watanabe I, Yamamoto T, Tanaka K, Ohtani M, Nohara T, Kawasaki H, Tanigawa N (2000) Prognostic significance of p27(kip1) protein expression and spontaneous apoptosis in patients with colorectal adenocarcinomas. *Oncology* 58: 45-51
- Thiagalingam S, Laken S, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C (2001) Mechanisms underlying losses of heterozygosity in human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 2698-2702.
- Thibodeau SN, Bren G, Schaid D (1993) Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260: 816-9.
- Tollenaar RA, Bonsing BA, Kuipers-Dijkshoorn NJ, Hermans J, van de Velde CJ, Cornelisse CJ, Fleuren GJ (1997) Evidence of clonal divergence in colorectal carcinoma. *Cancer* 79: 1304-14.

- Tollenaar RA, van Krieken JH, van Slooten HJ, Bruinvels DJ, Nelemans KM, van den Broek LJ, Hermans J, van Dierendonck JH (1998) Immunohistochemical detection of p53 and Bcl-2 in colorectal carcinoma: no evidence for prognostic significance. *Br J Cancer* 77: 1842-7.
- Tomlinson I, Ilyas M, Johnson V, Davies A, Clark G, Talbot I, Bodmer W (1998) A comparison of the genetic pathways involved in the pathogenesis of three types of colorectal cancer. *J Pathol* 184: 148-52.
- Tomlinson IP, Novelli MR, Bodmer WF (1996) The mutation rate and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 14800-3.
- Tortola S, Capella G, Marcuello E, Gunther K, Aiza G, Masramon L, Reymond MA, Peinado MA (1998) Analysis of differential gene expression in human colorectal tumor tissues by RNA arbitrarily primed-PCR: a technical assessment. *Lab Invest* 78: 309-17.
- Tortola S, Marcuello E, Gonzalez I, Reyes G, Arribas R, Aiza G, Sancho FJ, Peinado MA, Capella G (1999a) p53 and K-ras gene mutations correlate with tumor aggressiveness but are not of routine prognostic value in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 17: 1375-81.
- Tortola S, Marcuello E, Risques RA, Gonzalez S, Aiza G, Capella G, Peinado MA (1999b) Overall deregulation in gene expression as a novel indicator of tumor aggressiveness in colorectal cancer. *Oncogene* 18: 4383-7.
- van Triest B, Pinedo HM, Blaauwgeers JL, van Diest PJ, Schoenmakers PS, Voorn DA, Smid K, Hoekman K, Hoitsma HF, Peters GJ (2000) Prognostic role of thymidylate synthase, thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor, and proliferation markers in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 6: 1063-72.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319: 525-32.
- Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, White R (1989) Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 244: 207-11.
- von Hansemann D (1890) Über asymmetrische Zellteilung in Epithelkrebsen und deren biologische Bedeutung. *Virchow's Arch. Path. Anat* 119, 299-326.
- Wang WS, Lin JK, Chiou TJ, Liu JH, Fan FS, Yen CC, Lin TC, Jiang JK, Yang SH, Wang HS, Chen PM (2000) Preoperative carcinoembryonic antigen level as an independent prognostic factor in colorectal cancer: Taiwan experience. *Jpn J Clin Oncol* 30: 12-6.
- Webley KM, Shorthouse AJ, Royds JA (2000) Effect of mutation and conformation on the function of p53 in colorectal cancer. *J Pathol* 191: 361-7.
- Welsh J, Chada K, Dalal SS, Cheng R, Ralph D, McClelland M (1992) Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Res* 20: 4965-70.
- Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18: 7213-8.
- Wielenga VJ, van der Voort R, Mulder JW, Kruyt PM, Weidema WF, Oosting J, Seldenrijk CA, van Krimpen C, Offerhaus GJ, Pals ST (1998) CD44 splice variants as prognostic markers in colorectal cancer. *Scand J Gastroenterol* 33: 82-7.

- Williams AC, Miller JC, Collard T, Browne SJ, Newbold RF, Paraskeva C (1997) The effect of different TP53 mutations on the chromosomal stability of a human colonic adenoma derived cell line with endogenous wild type TP53 activity, before and after DNA damage. *Genes Chromosomes Cancer* 20: 44-52.
- Wilson RH, Whiteside MC, Russell SE (1997a) Molecular genetics of colorectal cancer (part 1). *Clin Oncol* 9: 14-9
- Wilson RH, Whiteside MC, Russell SE (1997b) Molecular genetics of colorectal cancer (Part 2). *Clin Oncol* 9: 79-82
- Wright CM, Dent OF, Barker M, Newland RC, Chapuis PH, Bokey EL, Young JP, Leggett BA, Jass JR, MacDonald GA (2000) Prognostic significance of extensive microsatellite instability in sporadic clinicopathological stage C colorectal cancer. *Br J Surg* 87: 1197-202.
- Yamaguchi A, Urano T, Goi T, Saito M, Takeuchi K, Hirose K, Nakagawara G, Shiku H, Furukawa K (1996) Expression of a CD44 variant containing exons 8 to 10 is a useful independent factor for the prediction of prognosis in colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 14: 1122-7.
- Yamane N, Tsujitani S, Makino M, Maeta M, Kaibara N (1999) Soluble CD44 variant 6 as a prognostic indicator in patients with colorectal cancer. *Oncology* 56: 232-8.
- Yang JL, Seetoo D, Wang Y, Ranson M, Berney CR, Ham JM, Russell PJ, Crowe PJ (2000) Urokinase-type plasminogen activator and its receptor in colorectal cancer: independent prognostic factors of metastasis and cancer-specific survival and potential therapeutic targets. *Int J Cancer* 89: 431-9.
- Yao J, Eu KW, Seow-Choen F, Cheah PY (2000) Down-regulation of p27 is a significant predictor of poor overall survival and may facilitate metastasis in colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 89: 213-6.
- Yao J, Eu KW, Seow-Choen F, Vijayan V, Cheah PY (1999) Microsatellite instability and aneuploidy rate in young colorectal-cancer patients do not differ significantly from those in older patients. *Int J Cancer* 80: 667-70.
- Yasuda J, Navarro JM, Malkhosyan S, Velazquez A, Arribas R, Sekiya T, Perucho M (1996) Chromosomal assignment of human DNA fingerprint sequences by simultaneous hybridization to arbitrarily primed PCR products from human/rodent monochromosome cell hybrids. *Genomics* 34: 1-8.
- Yin XY, Grove L, Datta NS, Long MW, Prochownik EV (1999) C-myc overexpression and p53 loss cooperate to promote genomic instability. *Oncogene* 18: 1177-84.
- Yin Y, Tainsky MA, Bischoff FZ, Strong LC, Wahl GM (1992) Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell* 70: 937-48.
- Zarbo RJ, Nakhleh RE, Brown RD, Kubus JJ, Ma CK, Mackowiak P (1997) Prognostic significance of DNA ploidy and proliferation in 309 colorectal carcinomas as determined by two-color multiparametric DNA flow cytometry. *Cancer* 79: 2073-86.
- Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, Kern SE, Hruban RH, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW (1997) Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 276: 1268-72.

Bibliografía

Zirbes TK, Baldus SE, Moenig SP, Nolden S, Kunze D, Shafizadeh ST, Schneider PM, Thiele J, Hoelscher AH, Dienes HP (2000) Prognostic impact of p21/waf1/cip1 in colorectal cancer. *Int J Cancer* 89: 14-8.