

Anomalías cromosómicas clonales en tumores colorectales.

Alicia Rojas-Atencio, Karelis Urdaneta, Pedro Estrada, Marisol Soto-Alvarez, Lisbeth Borjas-Fajardo, Ana Boscan y Griselda Garcia.

Unidad de Genética Médica, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia.
Maracaibo, Venezuela. Correo electrónico: ratencio@iamnet.com

Palabras clave: Anomalías cromosómicas, tumores colorectales

Resumen. Los tumores colorectales constituyen un motivo de consulta frecuente en los servicios de gastroenterología a nivel mundial, representando la segunda causa de muerte en el mundo y la cuarta causa de mortalidad por cáncer en Venezuela. Usualmente comienza como un pólipo benigno que en muchas ocasiones se transforma en maligno debido a una mutación a nivel del código genético que controla el crecimiento y la reparación celular. El presente trabajo reporta las alteraciones cromosómicas observadas en 15 muestras de tumores colorectales benignos y malignos estudiados en la Unidad de Genética Médica de la Universidad del Zulia. Se encontraron anomalías cromosómicas clonales en 11/15 (73,33%), 4 correspondieron a carcinomas y 7 a pólipos adenomatosos, en 7/11(63,6%) se encontraron anomalías tipo monosomía de los cromosomas 8 y 22, otras anomalías correspondieron a trisomías de los cromosomas 11 y 18 y uno solo de los casos con una anomalía estructural que correspondió a una del (17p). Las anomalías cromosómicas clonales en pólipos adenomatosos han sido relacionadas con inicio de la enfermedad maligna, y en el caso de los carcinomas, se ha relacionado con progresión de la enfermedad hacia las metástasis y muerte, por lo que la utilización del análisis citogenética podría establecerse como un factor pronóstico para los pacientes con poliposis adenomatosa no familiar.

Clonal chromosomal abnormalities in colorectal tumors.

Invest Clin 2002; 43(4): 263-270.

Key words: Chromosomal abnormalities, colorectal tumors.

Abstract. Colorectal tumors constitute a reason of frequent consultation in gastroenterology services in the world. They constitute the second cause of mortality in the world and the fourth cause of mortality for cancer in Venezuela. It usually begins as a polyp that becomes malignant due to a mutation at the level of the genetic code that controls the growth and the repair of cells. The present work reports the clonal chromosomal abnormalities ob-

served in 15 samples from benign tumors as well as malignant colorectal tumors and to relate these findings. There were clonal chromosomal anomalies in 11/15 (73.33%), 4 corresponded to carcinomas and 7 to adenomatous polyps. In 7/11 (63.6%) there were anomalies of the monosomy type in the chromosomes 8 and 22, other anomalies corresponded to trisomy of the chromosomes 11 and 18, and a single case with a structural anomaly that corresponded to a del(17p). The chromosomal anomalies in adenomatous polyposis have been related with the beginning of malignant disease and, in the case of carcinomas, it has been related with progression of the illness toward metastasis and death. The use of this tool could be used as a prognostic factor for patients with non familial adenomatous polyposis.

Recibido: 30-07-2001. Aceptado: 09-09-2002.

INTRODUCCIÓN

El cáncer colorectal representa la segunda causa de mortalidad por cáncer en el mundo industrializado. En 1.995 en los Estados Unidos de Norteamérica se reportaron alrededor de 160.000 casos nuevos y 60.000 muertes por esta enfermedad (1). En Venezuela se ubica como la cuarta causa de muerte por cáncer (2).

Los tumores colorectales progresan hacia carcinoma a través de una serie de estadios clínicos e histopatológicos, estos se presentan a partir de lesiones que pueden ir desde simples lesiones crípticas hasta pequeños tumores benignos como por ejemplo los pólipos adenomatosos. Esta progresión es debida a una serie de eventos que involucran tanto activación de oncogenes como inactivación de genes supresores de tumores (3, 4). Las anomalías cromosómicas clonales han sido reportadas en más de 100 adenomas colorectales esporádicos y en más de 300 adenocarcinomas (5). Varias alteraciones recurrentes han sido identificadas (6). Estos cambios cromosómicos son siempre muy complejos y es imposible determinar de primera intención cuales son primarios y cuales secundarios, desconociéndose el orden en que ocurren las alteraciones cromosómicas. Por otra parte los cariotipos son siempre des-

critos de manera incompleta presumiblemente debido a la dificultad para obtener cromosomas técnicamente de buena calidad. Sin embargo es importante la identificación de estos cambios ya que constituyen no solo eventos fundamentales en la carcinogénesis sino que además son altamente informativos como marcadores de clonalidad tumoral (7). Nosotros utilizamos el análisis de bandeos G cromosómico para identificar las alteraciones cromosómicas encontradas en los pólipos benignos y relacionarlas con las encontradas en los cánceres colorectales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras frescas de al menos 0,5 cm de diámetro provenientes de los hospitales públicos y privados de la región, fueron recibidas de 18 pacientes con tumores colorectales, 12 de las cuales correspondieron histológicamente a pólipos adenomatosos y 6 a carcinomas. Ninguno de los pacientes presentó antecedentes de poliposis adenomatosa familiar. Las muestras fueron cultivadas a partir de técnicas de cultivo corto y disgregadas enzimáticamente con colagenasa como ha sido descrito previamente (8). Después de 5 a 15 días se agregó colcemid (GIBCO. BRL), a la concentración de 0,05 µg/mL, el cual fue agregado por 4 horas,

luego las células fueron tripsinizadas y expuestas a shock hipotónico y fijación estándar. Las preparaciones cromosómicas fueron realizadas en bandas G con colorante de Wright (FISHER) y los resultados citogenéticos fueron descritos de acuerdo a los lineamientos establecidos en el Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética de 1995 (9). Una anomalía cromosómica fue considerada clonal cuando esta se repetía al menos dos veces en el caso de las anomalías estructurales o trisomías y al menos tres veces en el caso de las monosomías. Los resultados de los cariotipos se distribuyeron en tablas.

RESULTADOS

Se recibieron 18 muestras de tumores colorectales, provenientes de 12 hombres y 6 mujeres; en 15 de ellos se obtuvo material adecuado para ser analizado, 10 de las muestras correspondieron a pólipos adenomatosos y 5 a carcinomas, las edades estuvieron comprendidas entre 37 y 41 años con un promedio de edad de 47,1 años.

La Tabla I muestra los resultados de los 5 pacientes con adenocarcinoma de colon en los cuales sólo uno de ellos presentó cariotipo normal, el resto presentaron monosomía del cromosoma 8 en 2 de los casos (Fig. 1), monosomía 22 en 2 casos, trisomía 11 en 2 casos (Fig. 2), trisomía 18 y monosomía 7 en un caso.

En el caso de los pólipos adenomatosos se reporta el hallazgo histopatológico donde 5 de ellos presentaba displasia moderada, 2 presentaron displasia severa y 3 no presentaban displasias. En 3 casos se encontró un cariotipo normal, uno de ellos presentó displasia moderada, el resto no presentó displasia. En 7 de los pacientes se encontraron alteraciones cromosómicas 2 de los cuales presentaron monosomía 7 y 8, en un caso se observó monosomía 22, trisomía 11 y 18 en dos casos, un caso con trisomía 7 y un caso con delección del brazo corto del cromosoma 7 (Tabla II).

DISCUSIÓN

En los últimos años se ha observado un considerable avance en el análisis citogenético y molecular de los tumores sólidos. En algunas patologías como las enfermedades hematológicas malignas han sido consideradas como verdaderos marcadores tanto de diagnóstico como de pronóstico y por ende de la escogencia de un tratamiento adecuado (10, 11). Por otro lado el estudio citogenético de material tumoral ha podido identificar translocaciones específicas que han llevado a dilucidar los mecanismos moleculares involucrados en estas patologías (12).

Los hallazgos citogenéticos en tumores colorectales aún no han podido ser señalados como factor pronóstico, en su mayoría han sido descritas alteraciones de tipo

TABLA I
ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS. CANCER COLORECTAL. MARZO 2000-2001

Caso	Edad	Sexo	Histología	Anomalía Cromosómica
99-16	38 a	F	Adenocarcinoma	46,XX [6], 44,XX,-8,-22 [6]
99-20	58 a	F	Adenocarcinoma	46,XX [8], 48,XX,+11,+18 [5]
99-23	41 a	F	Adenocarcinoma	46,XX [18]
00-02	50 a	M	Adenocarcinoma	46,XY [4], 45,XX,-8 [3], 48,XY,+11,+18 [3]
00-12	36 a	F	Adenocarcinoma	46,XX [9], 49,XX,+7,+8,+11 [4], 45,XX,-22 [3]

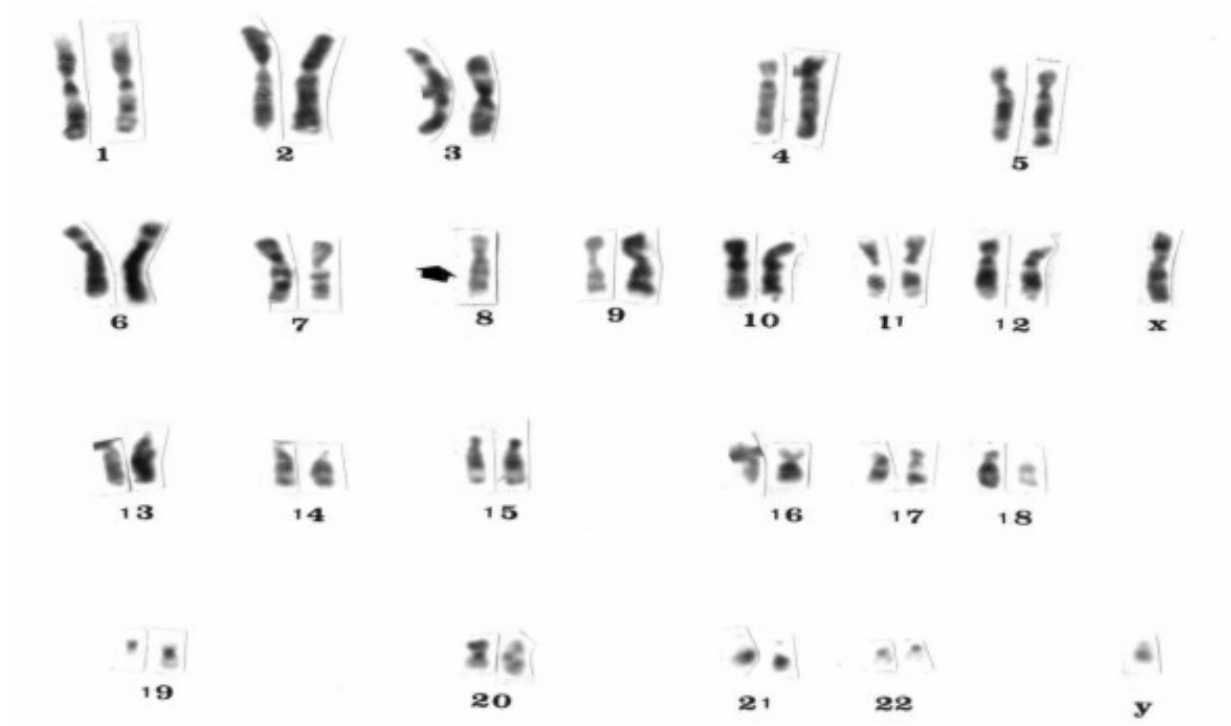


Fig. 1. Cariotipo tumor de colon muestra: 45, xy, -8.

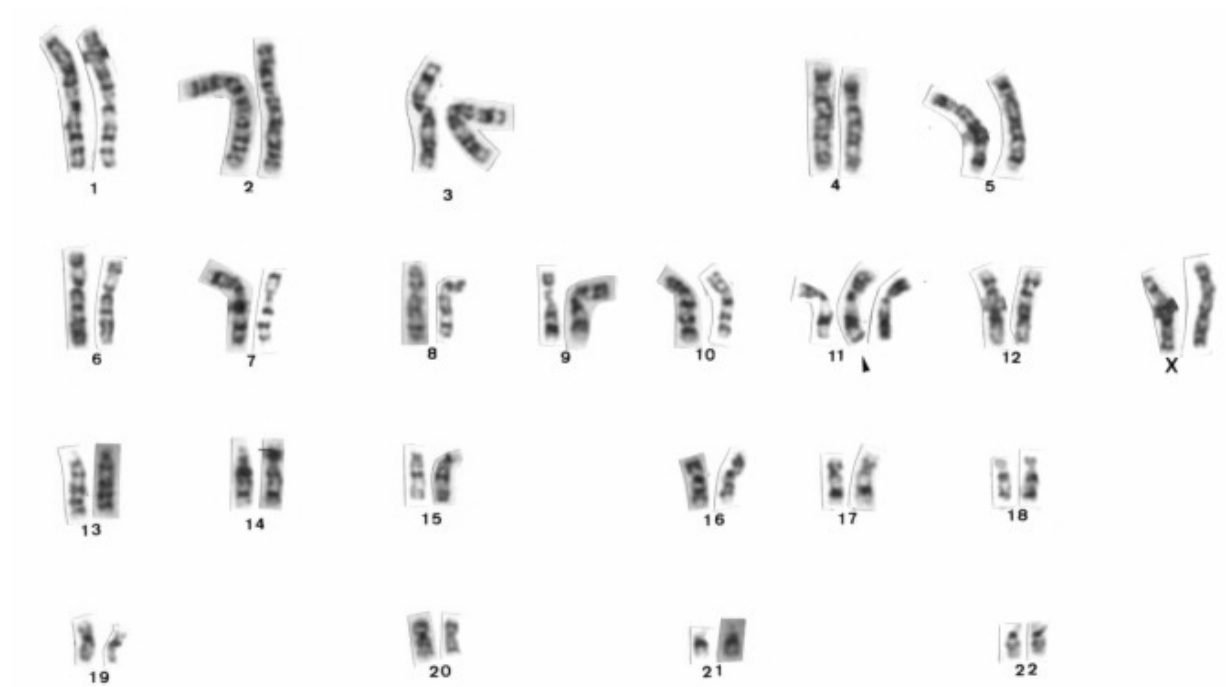


Fig. 2. Cariotipo polipo adenomatoso del colon: 47,xx, + 11.

TABLA II
ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS. PÓLIPOS ADENOMATOSOS. MARZO 2000-2001

Caso	Edad	Sexo	Histología	Anomalías Cromosómicas
99-03	42 a	M	S/D	46, XY [18]
99-08	48 a	M	D/M	44, XY,-8,-7 [4]46, XY [6],
99-12	52 a	M	D/M	45, XY, -8 [3]46, XY [7],
99-17	49 a	M	S/D	46, XY [15]
99-21	46 a	M	D/M	46, XX del (17p), 46, XY [7], (p11.2-pter)[4]
99-25	54 a	F	S/D	47, XX,-22, +11[6]46, XX [5],
00-04	39 a	M	D/S	44, XY,-8,-22[3], 45, XY,-7[4] 46, XY [8],
00-11	61 a	M	D/M	46, XY [12]
00-14	37 a	F	D/M	47, XX, +7 [3]46, XX [5],
00-16	57 a	M	D/S	47, XY, +18 [5], 48, XY, +11,+18 [3] 46, XY, [4].

S/D: Sin Displasia, D/M: Displasia Moderada, D/S: Displasia Severa.

numéricas con pocos reportes sobre alteraciones estructurales. En adenomas colorectales los estudios citogenéticos reportados revelan principalmente ganancia de cromosoma 7, esta trisomía ha sido vista sola o en combinación con otras alteraciones numéricas o con cambios estructurales o ambos, este hallazgo ha sido reportado en el 40% de todos los adenomas colorectales y en el 25% de los carcinomas (7, 8, 13-16). Nosotros encontramos un caso de pólipo adenomatoso con trisomía 7. El significado de la trisomía 7 en la tumorigenesis ha sido muy cuestionado, debido a que ha sido visto en lesiones no neoplásicas (17,18). Sin embargo estudios recientes utilizando técnicas de hibridación in situ fluorescente (FISH) han comprobado que esta es una anomalía frecuente en pólipos adenomatosos (19). En nuestro caso estuvo relacionada con una displasia moderada, lo que podría señalar a esta alteración como de inicio de la patología cancerosa o podría corresponder a una anomalía perteneciente a pólipos realmente benignos. Otras alteraciones cromosómicas

reportadas en cánceres colorectales corresponden a alteraciones tanto numéricas como estructurales de los cromosomas 11 y 17 (20). Un estudio piloto realizado en 1996 señaló que los cánceres colorectales en etapas tempranas presentan monosomía del cromosoma 11, mientras que en cánceres avanzados se observa trisomía 11 (21). Tagawa en 1997 (21) sugirió que la aneuploidía del cromosoma 11 era un importante marcador de invasión y pronóstico postoperatorio en cánceres colorectales. Por otro lado pudiera estar relacionada con metástasis a ganglios linfáticos. Keldysh (22) mostró un punto de ruptura común sobre el locus del cromosoma 11 en la región q22-23 usando fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs) y cariotipo, esto sugirió que un gen supresor no conocido podría afectar este locus. Phillips en 1996 (23) reportó en el cromosoma 11 un gen que codifica para un gen supresor metastásico en cáncer de mama humano. Otros estudios han mostrado que el gen ciclin D1 localizado en el cromosoma 11, está asocia-

do con desarrollo del cáncer (24) Nuestro estudio reporta tres casos de carcinoma con trisomía 11 y 1 caso de pólipo adenomatoso con displasia severa, lo que parece corresponder con desarrollo del proceso neoplásico. Otras de las alteraciones frecuentemente observadas corresponden a las alteraciones del cromosoma 17 (14, 19, 25), en el se encuentran genes supresores de tumores como el P53 y el BRCA-1 y oncogenes como el *erbB2* y es posible que las alteraciones numéricas o estructurales estén asociadas con inactivación o activación de estos genes respectivamente. Este tipo de alteración ha sido reportada en pólipos adenomatosos tanto utilizando técnicas de citogenética convencional como molecular (FISH) (22), pero su frecuencia es mayor en carcinoma. En nuestra muestra se presentó una delección del brazo corto de este cromosoma en un caso de pólipo adenomatoso con displasia moderada. Otras alteraciones reportadas corresponden a alteraciones de los cromosomas 1, 13, 18 y 20 (16, 18, 25, 26). En nuestra muestra se encontró una trisomía 18, en 2 casos de carcinoma y 2 casos de pólipos adenomatosos uno con displasia moderada y el otro con displasia severa. El resto de las anomalías no se encontraron en esta muestra. Sin embargo pudimos conseguir otras alteraciones como la monosomía del cromosoma 8 en cuatro de los casos y la monosomía 22, en dos casos de carcinoma y en dos casos de pólipos adenomatosos con displasia moderada y severa. Esto pudiese implicar otros genes involucrados en esta patología, o producto de la variabilidad geográfica reportada por algunos autores (27). Por otro lado una de las muestras con diagnóstico de adenocarcinoma y 3 de pólipo adenomatoso presentaron un cariotipo normal, en el caso de los carcinomas se ha señalado que los cariotipos normales probablemente representen células estromales no neoplásicas dividiéndose, las cuales siempre están presentes en carcinoma colorectal

(8). En el caso de los pólipos adenomatosos estos pudieran corresponder a verdaderas lesiones benignas o al no crecimiento de las células malignas.

Las identificación de anomalías cromosómicas en tumores colorectales podría ser considerada como una herramienta indispensable para la evaluación inicial de los pacientes con esta patología, especial interés representa esta identificación en los pacientes con pólipos adenomatosos no familiares, donde la presencia de alteraciones cromosómicas podría contribuir a la detección temprana de la transformación maligna, toda vez que las alteraciones moleculares no son posibles de detectar en todos los casos con una sola prueba, existen numerosas alteraciones moleculares que se suceden en etapas tempranas de esta enfermedad y que sería muy costoso poder identificar en su totalidad (3). Por otro lado alguna de las anomalías cromosómicas como por ejemplo la monosomía del cromosoma 14 no tiene aún un gen relevante en el modelo molecular de la secuencia adenoma carcinoma, en nuestro estudio la monosomía del cromosoma 8 encontrada en cuatro de los casos y la monosomía 22 tampoco han sido implicadas en esta secuencia adenoma-carcinoma, por lo que pudieramos inferir que este modelo molecular pudiera variar dependiendo de la variabilidad genética reportada entre las diferentes poblaciones. Por lo tanto consideramos que el estudio cromosómico de material fresco de poliposis tanto familiar como no familiar nos ayudaría a realizar una verdadera acción preventiva en estos pacientes, tomando en cuenta la limitación de contar con el total de las sondas necesarias para la realización del análisis molecular completo.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado por el FONACIT, proyecto S1 98003171 y por el CONDES-LUZ proyecto N° 1538-98.

REFERENCIAS

1. **Scriver Ch, Blaudet A, Sly W, Valle D.** The metabolic and Molecular Bases of inherited Disease. 7th Ed. New York. Mac Graw Hill, INC, 1997; Cap. 173.
2. **Anuario epidemiología y estadística.** Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, 1998.
3. **Fearon R, Vogelstein B.** A Genetic model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767
4. **Vogelstein B, Fearon E, Hedrick I, Nishisho I, Fazeli A, Lengauer C, Thiagalingam S.** Genetics of colon cancer *Science&Medicine* July/August., 1997; 34-40.
5. **Mitelman F.** Catalog of chromosome aberrations in cancer. 5th Ed. New York Wiley-Liss.
6. **Heim S, Mitelman F.** *Cancer Cytogenetics.* 1st Ed. New York: Wiley-Liss, Inc. 1991
7. **Bodmer WF.** Cancer genetics. *Br Med Bull* 1994; 50:517-526
8. **Bardi G, Johanson B, Pandis N, Bak-Jensen E, Orndal Ch, Heim S, Mandhal N, Andren-Sandberg A, Mitelman F.** Cytogenetic aberrations in colorectal adenocarcinomas and their correlation with clinicopathologic features. *Cancer* 1993; 71: 306-314
9. **Mitelman F.** *ISCN An International system for human cytogenetic nomenclature,* Ed. Karger, Basel, 1995.
10. **Sandberg A.A.** The chromosomes and human cancer and leukemia. 1st Ed. Elsevier. North Holland, New York. 1980
11. **Rojas-Atencio A, Roldan de París L, Pineda De Del V. L., Herrera N., Herrera. A.** Importancia de las alteraciones cromosómicas en la leucemia mieloide crónica. *Invest Clin* 1993; 34:75-83.
12. **Shtiveman E, Lifselutz B, Gale RP, and Canaani.** Fused transcript of abl and ber genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* 1985; 315: 550-554
13. **Bardi G, Parada LA, Bomme L, Pandis N, Johansson B, Willen R, Fenger C, Kronborg O, Mitelman F, Heim S.** Cytogenetic findings in metastases from colorectal cancer. *Int J Cancer* 1997; 72: 604-607.
14. **Bomme I, Bardi G, Pandis N, Fenger C, Kronborg O, Heim S.** Clonal karyotypic abnormalities in colorectal adenomas: Clues to the early genetic events in the adenoma-carcinoma sequence. *Genes Chromosomes Cancer* 1994; 10:190-196.
15. **Bomme L, Bardi G, Pandis N, Fenger C, Kronborg O, Heim S.** Chromosome abnormalities in colorectal adenomas: Two cytogenetic subgroups characterized by deletion of 1p and numerical aberrations. *Hum Pathol* 1996; 27: 1192-1197.
16. **Bomme L, Bardi G, Pandis N, Fenger C, Kronborg O, Heim S.** Cytogenetic analysis of colorectal adenomas: Karyotypic comparisons of synchronous tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 106: 66-71.
17. **Elfving P, Cigudosa IG, Lundgren R, LimonJ, Mandahl N, Kristoferson U, Heim S, Mitelman F.** Trisomy 7, trisomy 10, and loss of the Y chromosome in short term culture of normal kidney tissue. *Cytogenet Cell Genet* 1990; 53:123-125.
18. **Knuutila S, Larramendy ML, Elfving P, El Rifai W, Miettinen A, Mitelman F** Trisomy 7 in non-neoplastic tubular epithelial cells of the kidney. *Hum Genet* 1995; 95: 149-156.
19. **Bomme L, Lothe RA, Bardi G, Fenger C, Kronborg O, Heim S.** Assessments of clonal composition of colorectal adenomas by FISH analysis of chromosome 1, 7, 13 and 20. *Int J Cancer* 2001; 92:816-23
20. **Tagawa Y, Sawai T, Nakagoe T, Morinaga M, Yasutake T, Ayabe H, Tomita M.** Numerical aberrations of chromosomes 11 and 17 in colorectal adenocarcinoma. *Surg. Today* 1996; 26:869-874.
21. **Tagawa Y, Yasutake T, Sawai T, Nanashima A, Jibiki M, Morinaga M, Akama F, Nakagoe T, Ayabe H.** Clinical and pathological significance of numerical aberrations of chromosome 11 and 17 in colorectal neoplasm. *Clin Cancer Res* 1997; 3:1587-1592.
22. **Keldysh P, Dragani TA, Fleischman EW, Konstantinova LN, Perevoschikov AG, Pierotti MA, Della Porta GA, Kopnin BP.** 11q deletions in human colorectal carcinomas: cytogenetic, and restriction fragment

- length polymorphism analysis. *Genes Chromosomes Cancer* 1993; 6:45-50.
23. **Phillips KK, Welch DR, Miele ME, Lee JH, Wei H, Weissman BE.** Suppression of MDA-MB-435 breast carcinoma cell metastasis following the introduction of human chromosome 11. *Cancer Res* 1996; 56: 1222-1227.
 24. **Gaffey MJ, Jezzoni JC, Meredith SD, Boyd JC, Stoler MH, Weiss LM, Zukerberg LR, Levine PA, Arnold A, Williams ME.** Cyclin D1 (PRAD1, CCND1) and glutathione S-transferase pi gene expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* 1995; 26: 1221-1226.
 25. **Di Vinci A, Infusini E, Peveri C, Sciutto A, Geido E, Risio M, Rossini F, Giaretti W.** Correlation between 1p deletions and aneusomy in human colorectal adenomas. *Int J Cancer* 1998; 74: 45-50.
 26. **Korn WM, Yasutake T, Kuo WL, Warren RS, Collins C, Tomita M, Gray J, Waldman FM.** Chromosome arm 20q gains and other genomic alterations in colorectal cancer metastatic to liver, as analysed by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 2: 82-90.
 27. **Johanson B., Mertens F., Mintelman F.:** Geographic heterogeneity of neoplasia associated chromosome aberrations. *Genes Chrom Cancer* 1991; 3: 1-7.