

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR III**



TESIS DOCTORAL

**Investigación de regiones cromosómicas de interés mediante
arrays de CGH en el cáncer colorrectal de aparición
temprana (≤ 45 años) y en el del anciano (≥ 70 años)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

María Arriba Domenech

DIRECTORES

**José Perea García
Miguel Urioste Azcorra**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III



**INVESTIGACIÓN DE REGIONES CROMOSÓMICAS DE INTERÉS MEDIANTE
ARRAYS DE CGH EN EL CÁNCER COLORRECTAL DE APARICIÓN TEMPRANA
(≤ 45 AÑOS) Y EN EL DEL ANCIANO (≥ 70 AÑOS)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Arriba Domènech

Bajo la dirección de los doctores

José Perea García
Miguel Urioste Azcorra

MADRID, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



**INVESTIGACIÓN DE REGIONES CROMOSÓMICAS DE INTERÉS MEDIANTE
ARRAYS DE CGH EN EL CÁNCER COLORRECTAL DE APARICIÓN TEMPRANA
(≤ 45 AÑOS) Y EN EL DEL ANCIANO (≥ 70 AÑOS)**

TESIS DOCTORAL

María Arriba Domènech

MADRID, 2015

A mi estrella polar, mi padre.

AGRADECIMIENTOS

- ◆ A los directores de esta memoria, los doctores **José Perea García** y **Miguel Urioste Azcorra**, por brindarme la oportunidad de participar en este proyecto. Su constante dedicación, entrega y entusiasmo, han hecho posible la realización de esta tesis doctoral.

- ◆ A **Juan Luis García**, quien igualmente ha representado un pilar fundamental en el desarrollo de este trabajo.

- ◆ A **Fer**, por su infinita disposición para ayudar. Por hacerme feliz cada día y caminar siempre a mi lado.

- ◆ A mi **madre** y **hermano**, por su apoyo y confianza.

- ◆ A las **personas** que han estado junto a mí en los momentos difíciles dando muestra de su cariño y amistad. Es un privilegio teneros en mi vida.

- ◆ Y por supuesto, a los **pacientes** y **familias** incluidos en este estudio por su valiosa colaboración. Porque sin su generosidad, nada de esto habría sido posible.

A todos y cada uno de ellos, mi más sincero y profundo agradecimiento.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS..... VII
 RELACIÓN DE TABLAS.....XI
 RELACIÓN DE FIGURAS..... XIII
 RESUMEN XV
 SUMMARY XIX

I. INTRODUCCIÓN 1

1. EL CÁNCER, UNA ENFERMEDAD GENÉTICA..... 3

2. EL CÁNCER COLORRECTAL. GENERALIDADES 4

2.1. ASPECTOS GLOBALES 4

2.2. EPIDEMIOLOGÍA..... 4

2.3. CLASIFICACIÓN POR ESTADIOS..... 5

2.4. MANEJO CLÍNICO 8

2.4.1. Lesiones precancerosas: pólipos colónicos 8

2.4.1.1. Pólipos adenomatosos..... 8

2.4.1.2. Pólipos serrados..... 8

2.4.2. Diagnóstico: síntomas y métodos de *screening* 9

2.4.3. Tratamiento 9

2.4.3.1. Tratamiento quirúrgico 9

2.4.3.2. Radioterapia y quimioterapia 10

Radioterapia..... 10

Quimioterapia..... 10

2.4.4. Seguimiento..... 11

2.5. FACTORES DE RIESGO 11

2.5.1. Factores de riesgo genéticos 11

2.5.2. Factores de riesgo no genéticos o ambientales 11

Edad 11

Factores dietéticos y hábitos tóxicos 12

Otros factores de riesgo..... 12

2.6. MECANISMO DE GENERACIÓN DEL CCR: SECUENCIA ADENOMA-CARCINOMA..... 13

3. CCR HEREDITARIO vs. CCR ESPORÁDICO..... 15

3.1. CCR HEREDITARIO Y SÍNDROMES RELACIONADOS 15

3.1.1. Síndrome de Lynch..... 15

3.1.2. Poliposis Adenomatosa Familiar 17

3.2. CCR ESPORÁDICO: VÍAS MOLECULARES DE CARCINOGENESIS	17
3.2.1. Vía supresora o de INC.....	18
3.2.2. Vía mutadora o de IMS.....	19
3.2.3. Vía serrada o del Fenotipo metilador de islas CpG.....	20
3.3. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CCR	21
3.3.1. Tumores MACS (<i>Microsatellite and Chromosomal Stable</i>)	22
3.4. CCR EN EL ADULTO JOVEN.....	23
4. ALTERACIONES EN LA DOSIS GÉNICA Y CCR	25
4.1. ARRAYS-CGH	26
4.2. ALTERACIONES RECURRENTES EN EL CCR.....	27
4.3. PERFIL GENÓMICO DEL CCR DE INICIO PRECOZ.....	30
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	33
A. JUSTIFICACIÓN	35
B. OBJETIVOS	35
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	37
1. POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO	39
1.1. PROCEDENCIA Y CRITERIOS DE INCLUSIÓN	39
1.2. RECOGIDA DE INFORMACIÓN.....	39
2. MUESTRAS.....	41
2.1. OBTENCIÓN	41
2.2. TEJIDO INCLUIDO EN PARAFINA.....	41
2.2.1. Tinción hematoxilina-eosina.....	41
2.2.2. Extracción de ADN a partir de muestras parafinadas.....	42
2.3. SANGRE PERIFÉRICA	43
2.3.1. Protocolo manual de extracción de ADN en sangre	43
2.3.2. Protocolo automatizado de extracción de ADN en sangre	44
2.4. VALORACIÓN DE LA CALIDAD Y CANTIDAD DEL ADN OBTENIDO.....	45
3. ANÁLISIS MEDIANTE ARRAYS DE CGH.....	47
3.1. MARCAJE FLUORESCENTE	47
3.2. HIBRIDACIÓN SOBRE EL MICROARRAY.....	48
3.3. ESCANEADO Y PROCESAMIENTO DE LOS DATOS	49
4. EVALUACIÓN DE LA INESTABILIDAD CROMOSÓMICA	50
4.1. CÁLCULO DEL ÍNDICE DE INESTABILIDAD GENÓMICA.....	50

4.2. NÚMERO Y FRECUENCIA DE LAS CNV	51
4.2.1. Alteraciones comunes y/o potencialmente grupo-específicas	51
4.2.2. Análisis no supervisado.....	52
5. ESTUDIO DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES.....	53
5.1. PANEL BETHESDA	53
5.2. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE LAS PROTEÍNAS MMR.....	55
5.3. ESTUDIO MOLECULAR DE LOS GENES MMR (<i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> Y <i>MSH6</i>).....	56
5.3.1. Genes <i>MLH1</i> y <i>MSH2</i>	56
5.3.1.1. Análisis de mutaciones.....	56
5.3.1.2. Análisis de grandes deleciones genómicas	57
5.3.1.3. Estudio de hipermetilación del promotor del gen <i>MLH1</i>	60
5.3.2. Gen <i>MSH6</i>	64
5.3.2.1. Amplificación de exones y regiones intrónicas adyacentes.....	64
6. ESTUDIO MOLECULAR DE <i>BRAF</i>	67
7. TRATAMIENTO DE LOS DATOS.....	68
7.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	68
7.2. ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES	68
IV. RESULTADOS	69
1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO.....	71
1.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	71
1.1.1. Edad de diagnóstico y sexo	71
1.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS	72
1.2.1. Localización tumoral	72
1.2.2. Histología, grado de diferenciación y producción de moco	72
1.2.3. Estadificación tumoral.....	73
1.3. CARACTERÍSTICAS EVOLUTIVAS.....	74
1.3.1. Supervivencia total.....	74
1.3.2. Recidiva.....	74
1.3.3. Mortalidad	75
1.3.4. Historia de pólipos u otras neoplasias	75
1.4. HISTORIA FAMILIAR.....	76
2. ESTUDIO DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES.....	78
2.1. ANÁLISIS DE IMS.....	78
2.2. INMUNOHISTOQUÍMICA DEL SISTEMA MMR.....	78

2.3. ESTUDIO DE LOS GENES MMR	79
3. GRADO DE INESTABILIDAD CROMOSÓMICA	80
3.1. ÍNDICE DE INESTABILIDAD GENÓMICA (GII)	80
3.2. PATRÓN GLOBAL DE INESTABILIDAD CROMOSÓMICA.....	82
3.3. NÚMERO Y TIPO DE CNV POR TUMOR	84
3.4. FRECUENCIA DE LAS ALTERACIONES: MCR.....	84
3.5. CNV COMUNES Y/O POTENCIALMENTE GRUPO-ESPECÍFICAS.....	86
3.6. ANEUPLOIDÍA.....	88
4. ANÁLISIS NO SUPERVISADO	90
4.1. AGRUPACIÓN JERÁRQUICA NO SUPERVISADA GLOBAL.....	90
4.1.1. Correlación anatomoclínica y molecular en el <i>cluster</i> global	93
4.2. AGRUPACIÓN JERÁRQUICA NO SUPERVISADA DE LOS ADULTOS JÓVENES	93
4.2.1. Correlación anatomoclínica y molecular en adultos jóvenes	97
4.3. AGRUPACIÓN JERÁRQUICA NO SUPERVISADA DE LOS ADULTOS ANCIANOS.....	100
4.3.1. Correlación anatomoclínica y molecular en adultos ancianos.....	104
5. INESTABILIDAD CROMOSÓMICA Y SÍNDROME DE LYNCH	106
V. DISCUSIÓN.....	109
1. EL CÁNCER COLORRECTAL	111
1.1. CONSIDERACIONES GENERALES	111
2. DESCRIPCIÓN DE LAS POBLACIONES ESTUDIADAS	112
2.1. CARACTERÍSTICAS ANATOMOCLÍNICAS.....	112
2.1.1. Características clínicas	112
2.1.2. Características anatomopatológicas	113
2.1.3. Pronóstico y supervivencia.....	114
2.2. CARACTERÍSTICAS FAMILIARES	116
3. ANÁLISIS DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES	116
4. INESTABILIDAD CROMOSÓMICA EN JÓVENES Y ANCIANOS	118
4.1. GRADO DE INESTABILIDAD GENÓMICA	119
4.2. PERFIL DE INESTABILIDAD: TIPO Y FRECUENCIA DE LAS ALTERACIONES	121
4.2.1. Comparación desde el punto de vista cuantitativo	121
4.2.2. Comparación desde el punto de vista cualitativo	124
4.3. ANEUPLOIDÍA.....	126
5. AGRUPACIÓN JERÁRQUICA NO SUPERVISADA	127
5.1. AGRUPACIÓN JERÁRQUICA NO SUPERVISADA GLOBAL.....	128

5.1.1. Correlación anatomoclínica y molecular para el <i>cluster</i> global.....	129
5.2. AGRUPACIÓN JERÁRQUICA NO SUPERVISADA DE LOS ADULTOS JÓVENES	130
5.2.1. Correlación anatomoclínica y molecular en adultos jóvenes	132
5.3. AGRUPACIÓN JERÁRQUICA NO SUPERVISADA DE LOS ADULTOS ANCIANOS.....	134
5.3.1. Correlación anatomoclínica y molecular en adultos ancianos.....	136
6. INESTABILIDAD CROMOSÓMICA Y SÍNDROME DE LYNCH.....	138
VI. CONCLUSIONES	141
VII. BIBLIOGRAFÍA	145
VIII. ANEXOS.....	171
ANEXO 1.....	173
ANEXO 2.....	179
ANEXO 3.....	183
ANEXO 4.....	188
ANEXO 5.....	193
ANEXO 6.....	197
ANEXO 7.....	200
ANEXO 8.....	206

ABREVIATURAS

- **A:** Adenina.
- **AAS:** Ácido acetilsalicílico.
- **Abs:** Absorbancia.
- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- **AINES:** Antiinflamatorios no esteroideos.
- **AJCC:** *American Joint Committee on Cancer.* Comisión conjunta estadounidense para el cáncer.
- **ANOVA:** *Analysis of variance.* Análisis de varianza.
- **APC:** *Adenomatous Polyposis Coli.* Gen causal de la poliposis adenomatosa familiar.
- **Arg:** Arginina.
- **Asp:** Ácido aspártico.
- **BAC:** *Bacterial artificial chromosome.* Cromosoma artificial bacteriano.
- **BAT:** Big adenina tracto. Secuencia mononucleotídica del panel Bethesda.
- **Bp:** *Base pairs.* Pares de bases.
- **°C:** Grados centígrados o Celsius.
- **c:** Codón.
- **C:** Citosina.
- **CBS:** *Circular binary segmentation.* Algoritmo matemático que permite ubicar alteraciones en la dosis génica.
- **CCHNP:** Cáncer colorrectal hereditario no Polipósico.
- **CCR:** Cáncer colorrectal.
- **CEA:** *Carcinoembryonic antigen.* Antígeno carcinoembrionario.
- **CGH:** *Comparative Genomic Hybridization.* Hibridación genómica comparada.
- **CIMP:** *CpG island methylator phenotype.* Fenotipo metilador de islas CpG.
- **CIN:** *Chromosomal instability.* Inestabilidad cromosómica.
- **Cm:** Centímetros.
- **CNA:** *Copy number abnormality.* Alteración en el número de copias.
- **CNV:** *Copy number variation.* Variación en el número de copias.
- **COBRA:** *Combined bisulfite restriction analysis.* Análisis de restricción combinado con bisulfito.
- **CRC:** *Colorectal cancer.* Cáncer colorrectal.

- **DCC:** *Deleted in colorectal cancer.* Gen deletado en el cancer colorrectal.
- **DCNA:** *DNA copy number aberration.* Aberración en el número de copias de DNA.
- **Del:** Delección.
- **dHPLC:** *Denaturing high-performance liquid chromatography.* Cromatografía líquida de alto rendimiento con gradiente desnaturizante.
- **DMSO:** Dimetilsulfóxido.
- **dNTP:** *Deoxynucleotide triphosphate.* Desoxinucleótido trifosfato.
- **Dup:** Duplicación.
- **E:** Ácido glutámico.
- **EDTA:** *Ethylenedinitrilotetraacetic acid.* Ácido etilendiaminotetraacético.
- **EEUU:** Estados Unidos.
- **EMS:** Estabilidad de microsátélites.
- **eQTL:** *Expression quantitative trait loci.* Loci genómico que contribuye a la variación de los niveles de expresión.
- **FDR:** *False Discovery Rate.* Tasa de falso descubrimiento.
- **FISH:** *Fluorescent in situ hybridization.* Hibridación fluorescente in situ.
- **FM:** Fenotipo metilador.
- **fs:** *Frameshift.* Mutación con desplazamiento del marco de lectura.
- **G:** Guanina.
- **GII:** *Genomic instability index.* Índice de inestabilidad genómica.
- **Gln:** Glutamina.
- **Glu:** Ácido glutámico.
- **GNL:** Gain, normal, loss. Ganancia, normal, pérdida.
- **GWAS:** *Genome-wide association study.* Estudio de asociación del genoma completo.
- **H:** Histidina.
- **HGVS:** *Human genome variation society.* Sociedad de Variaciones del Genoma Humano.
- **His:** Histidina.
- **HRM:** *High resolution melting.* Análisis de alta resolución de fusión.
- **I:** Isoleucina.

- **IARC:** *International agency for research on cancer.* Agencia internacional para la investigación del cáncer.
- **IHQ:** Inmunohistoquímica.
- **Ile:** Isoleucina.
- **IMS:** Inestabilidad de microsatélites.
- **INC:** Inestabilidad cromosómica.
- **L:** Leucina.
- **Leu:** Leucina.
- **LOH:** *Loss of heterocigosity.* Pérdida de heterocigosidad.
- **LS:** *Lynch syndrome.* Síndrome de Lynch.
- **M:** Molar.
- **MACS:** *Microsatellite and Chromosomal Stable.* Tumor con estabilidad microsatelital y cromosómica.
- **Mb:** Megabase.
- **MCR:** *Minimal Common Regions.* Regiones mínimas comunes.
- **MeV:** *MultiExperiment Viewer.* Herramienta para el análisis de datos procedentes de *microarrays*.
- **mg:** Miligramo.
- **ml:** Mililitros.
- **MLPA:** *Multiplex ligation-dependent probe amplification.* Amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples.
- **µm:** Micrómetro.
- **µM:** Micromolar.
- **mM:** Milimolar.
- **MMR:** *Mismatch repair.* Reparación de errores de emparejamiento.
- **MSI:** *Microsatellite instability.* Inestabilidad de microsatélites.
- **Nº:** Número.
- **NCI:** *National cancer institute.* Instituto nacional del cáncer.
- **NPCR:** *National program of cancer registries.* Programa nacional de registros del cáncer.
- **NS:** No significativo.
- **p:** Proteína.
- **P:** Prolina.
- **PAC:** *P1-derived artificial chromosome.* Cromosoma artificial derivado de P1.
- **PAF:** Poliposis adenomatosa familiar.
- **PAFA:** Poliposis adenomatosa familiar atenuada.

- **Pb:** Pares de bases.
- **PCR:** *Polymerase chain reaction*. Reacción en cadena de la polimerasa.
- **PharmGKB:** *Pharmacogenomics Knowledgebase*. Base de conocimientos farmacogenómicos.
- **Pro:** Prolina.
- **Q:** Glutamina.
- **R:** Arginina.
- **RAR:** *Recurrently Altered Regions*. Regiones recurrentemente alteradas.
- **rpm:** Revoluciones por minuto.
- **RS:** Unión rectosigmoidea.
- **S:** Serina.
- **SD:** *Standard Deviation*. Desviación estándar.
- **SEER:** *Surveillance, Epidemiology and End Results*. Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales.
- **SEOM:** Sociedad española de oncología médica.
- **Ser:** Serina.
- **SL:** Síndrome de Lynch.
- **SLE:** Supervivencia libre de enfermedad.
- **SOH:** Sangre oculta en heces.
- **SOTA:** *Self Organizing Tree Algorithm*. Algoritmo auto-organizativo de árbol.
- **ST:** Supervivencia total.
- **T:** Timina.
- **TBE:** Tris, ácido bórico y EDTA.
- **TCGA:** *The Cancer Genome Atlas*. Atlas genómico del cancer.
- **TEAA:** Acetato de trietilamonio.
- **TEF:** Test exacto de Fisher.
- **Ter:** Terminación.
- **TIGR:** *The Institute for Genomic Research*. Instituto para la investigación genómica.
- **YAC:** *Yeast artificial chromosomes*. Cromosoma artificial de levadura.
- **5-FU:** 5-Fluorouracilo

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla I.1. Categorías y subcategorías del actual sistema de estadificación del CCR	6
Tabla I.2. Equivalencia entre los diferentes sistemas de estadificación del CCR.....	7
Tabla I.3. Diferencias entre las características tumorales de la secuencia adenoma-carcinoma convencional y la teoría adenoma serrado-carcinoma	14
Tabla I.4. Características diferenciadoras de los CCR generados a partir de las distintas vías de carcinogénesis.....	21
Tabla I.5. Listado de las 45 regiones relevantes en CCR según <i>The Cancer Genome Atlas</i> (TCGA)	30
Tabla III.1. Características de los marcadores microsatélite y fluorocromos empleados para el análisis de IMS.....	53
Tabla III.2. Mezcla de PCR utilizada para el estudio de IMS.....	53
Tabla III.3. Anticuerpos, clones, proveedores y diluciones utilizadas para el estudio IHQ de las muestras	56
Tabla III.4. Mezcla de PCR utilizada para la amplificación de <i>MLH1</i> y <i>MSH2</i>	56
Tabla III.5. Mezcla de ligación utilizada en la PCR multiplex para el análisis de grandes deleciones genómicas de los genes <i>MLH1</i> y <i>MSH2</i>	58
Tabla III.6. Mezcla de PCR utilizada para el análisis de grandes deleciones en los genes <i>MLH1</i> y <i>MSH2</i> mediante MLPA	59
Tabla III.7. Mezcla de PCR utilizada en el estudio de hipermetilación del promotor del gen <i>MLH1</i>	61
Tabla III.8. Mezcla para la PCR independiente del estado de hipermetilación del promotor del gen <i>MLH1</i>	62
Tabla III.9. Mezcla para la digestión con la enzima <i>BstUI</i>	63
Tabla III.10. Mezcla de PCR utilizada para la amplificación de exones y regiones intrónicas adyacentes al gen <i>MSH6</i>	65
Tabla IV.1. Distribución por sexos de los tumores analizados	72
Tabla IV.2. Localización de las neoplasias estudiadas	72
Tabla IV.3. Características anatomopatológicas de las neoplasias estudiadas.....	73
Tabla IV.4. Estadificación tumoral y tipo de metástasis de las neoplasias estudiadas	74
Tabla IV.5. Identificación de pólipos y otras neoplasias sincrónicas/metacrónicas de los pacientes estudiados	76
Tabla IV.6. Resumen de las características clínicas, anatomopatológicas y familiares más importantes de los pacientes incluidos en el estudio	77
Tabla IV.7. Distribución de los pacientes con IMS en las dos poblaciones estudiadas	78

Tabla IV.8. Resultados del análisis inmunohistoquímico de las proteínas del sistema de reparación de los errores de emparejamiento	79
Tabla IV.9. Listado de las mutaciones y variantes de significado desconocido halladas en los pacientes jóvenes con resultado positivo de IMS.....	80
Tabla IV.10. Índices de inestabilidad genómica obtenidos en el estudio de ambas poblaciones.....	81
Tabla IV.11. Descripción global de la inestabilidad genómica observada en la totalidad de los tumores analizados	85
Tabla IV.12. Listado de las CNV que cumplieron el criterio de grupo-especificidad establecido	87
Tabla IV.13. Composición de los grupos diferenciados mediante agrupamiento jerárquico no supervisado de los 146 tumores analizados.....	90
Tabla IV.14. Datos de inestabilidad genómica para los <i>clusters</i> 1 y 2 diferenciados dentro de la agrupación jerárquica no supervisada de los 146 tumores.....	92
Tabla IV.15. Datos de inestabilidad genómica para los <i>clusters</i> A y B diferenciados dentro de la agrupación jerárquica no supervisada de los tumores de inicio temprano	95
Tabla IV.16. Datos de inestabilidad genómica para los subgrupos A1 y A2 del análisis no supervisado de los tumores de inicio temprano.....	96
Tabla IV.17. Datos de inestabilidad genómica para los subgrupos B3 y B4 del análisis no supervisado de los tumores de inicio temprano.....	97
Tabla IV.18. Correlación anatomoclínica y molecular para los 4 subgrupos obtenidos tras el análisis no supervisado de los 60 tumores de inicio temprano	99
Tabla IV.19. Datos de inestabilidad genómica para los <i>clusters</i> C y D diferenciados dentro de la agrupación jerárquica no supervisada de los tumores de inicio tardío	101
Tabla IV.20. Datos de inestabilidad genómica para los subgrupos C1 y C2 del análisis no supervisado de los tumores de inicio tardío.....	102
Tabla IV.21. Datos de inestabilidad genómica para los subgrupos D3 y D4 del análisis no supervisado de los tumores de inicio tardío.....	103
Tabla IV.22. Correlación anatomoclínica y molecular para los 4 subgrupos obtenidos tras el análisis no supervisado de los 86 tumores de inicio tardío.....	105
Tabla IV.23. Comparación de la inestabilidad genómica asociada a los 7 tumores Lynch incluidos en la serie.....	106
Tabla IV.24. Descripción detallada de la inestabilidad genómica asociada a los 4 casos Lynch con características diferenciales.....	107

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura I.1. Estructura del intestino grueso (A) y sus capas (B). Imagen tomada de <i>ADAM Images</i>	4
Figura I.2. Incidencia mundial de CCR para ambos sexos (<i>Globocan 2012</i>)	5
Figura I.3. Incidencia de los cánceres más prevalentes en España	5
Figura I.4. Clasificación por estadios del CCR en función de la afectación de la pared colónica, ganglios y órganos a distancia	7
Figura I.5. Clasificación morfológica de los pólipos adenomatosos.....	8
Figura I.6. Incidencia de CCR por grupos de edad entre los años 2007-2011 en hombres y mujeres de todas las razas	12
Figura I.7. Alteraciones genéticas en la secuencia adenoma-carcinoma.....	13
Figura I.8. Distribución de los distintos subtipos de CCR en la población general	18
Figura I.9. Solapamientos entre los subtipos de CCR en función del estatus IMS y CIMP.....	22
Figura I.10. Esquema de los pasos que componen la realización de un análisis de a-CGH.....	27
Figura I.11. Frecuencia de alteración de las distintas regiones cromosómicas obtenidas mediante CGH en 73 pacientes diagnosticados de CCR.....	28
Figura I.12. Perfiles genómicos obtenidos mediante a-CGH en 40 pacientes con CCR.....	31
Figura III.1. Esquema de los pasos que componen el marcado fluorescente necesario para la hibridación de las muestras sobre el <i>microarray</i>	47
Figura III.2. Esquema de la placa del <i>microarray</i> CGH empleado para el análisis de las muestras...	48
Figura III.3. Esquema de las condiciones de tiempo y temperatura empleadas en la PCR multiplex para el análisis de inestabilidad en las secuencias microsatélite	54
Figura III.4. Resultado de la amplificación de un ADN normal y de una muestra tumoral clasificada como inestable para todos los marcadores microsatélites analizados.....	54
Figura III.5. Esquema de las condiciones de tiempo y temperatura empleadas para la PCR del estudio molecular de los genes <i>MLH1</i> y <i>MSH2</i>	57
Figura III.6. Esquema de las condiciones de tiempo y temperatura empleadas en la reacción de PCR multiplex para el estudio molecular de los genes <i>MLH1</i> y <i>MSH2</i>	59
Figura III.7. Esquema de las condiciones de tiempo y temperatura empleadas en la reacción de PCR utilizada para el estudio de hipermetilación del promotor del gen <i>MLH1</i>	62
Figura III.8. Secuencia de pasos que conforman el método COBRA	63
Figura III.9. Ejemplo de la secuencia obtenida en un paciente con hipermetilación del promotor de <i>MLH1</i> en uno de sus alelos.....	64

Figura III.10. Esquema de los tres programas de temperatura diseñados para la amplificación de los distintos fragmentos de <i>MSH6</i>	66
Figura III.11. Ejemplo de la visualización del estado mutacional del gen <i>MSH6</i> mediante dHPLC... 66	66
Figura III.12. Esquema de las condiciones de tiempo y temperatura empleadas en el análisis HRM para el estudio molecular del gen <i>BRAF</i>	67
Figura IV.1. Distribución de los casos de CCR en función de la edad de diagnóstico	71
Figura IV.2. Representación gráfica del índice de inestabilidad genómica (GII) total en ambas poblaciones.....	81
Figura IV.3. Representación gráfica del índice de inestabilidad genómica (GII) diferenciando el tipo de alteración.....	82
Figura IV.4. Frecuencia de ganancias y pérdidas obtenidas para cada grupo de edad	83
Figura IV.5. Gráfico de frecuencia que recoge los perfiles de inestabilidad observados para cada población y las bandas cromosómicas donde se localizan las alteraciones	83
Figura IV.6. Número medio de segmentos alterados por tumor clasificados en función de su tamaño superior o inferior a 1Mb	84
Figura IV.7. Distribución de las regiones recurrentemente alteradas a lo largo de los autosomas ..	85
Figura IV.8. Perfil de aneuploidía observado globalmente en la totalidad de muestras estudiadas y de manera independiente en población joven y anciana	89
Figura IV.9. Agrupación jerárquica no supervisada obtenida a partir de los datos a-CGH de los 146 tumores analizados	91
Figura IV.10. Agrupación jerárquica no supervisada de los 60 adultos jóvenes	94
Figura IV.11. Curvas de supervivencia para los <i>clusters</i> principales y secundarios obtenidos tras el análisis no supervisado de los tumores de inicio temprano	98
Figura IV.12. Agrupación jerárquica no supervisada de los 86 adultos ancianos.....	100

RESUMEN

Introducción.- En España, el cáncer colorrectal (CCR) constituye la tercera neoplasia más común en varones (tras los cánceres de próstata y pulmón) y la segunda en mujeres (tras el cáncer de mama). Es causado por la acumulación progresiva de alteraciones genéticas y epigenéticas que convierten la mucosa colónica normal, en hiperplásica o adenomatosa (con los diversos tipos evolutivos: tubular, túbulo-velloso y vellosa), cáncer “*in situ*” y finalmente cáncer invasor. Este proceso, conocido como “secuencia adenoma-carcinoma”, requiere algunos años para la formación del tumor. Actualmente se conocen tres vías principales de carcinogénesis: la vía de inestabilidad cromosómica (INC) o vía supresora, la vía de inestabilidad de microsatélites (IMS) o vía mutadora, y la vía del fenotipo metilador de islas de CpG.

El CCR en el adulto joven (edad de diagnóstico ≤ 45 años) constituye una entidad poco frecuente (2-8% de todos los CCR) que no sólo engloba casos hereditarios, de hecho, las mutaciones germinales únicamente son responsables de una pequeña parte de ellos. Los tumores de inicio temprano habitualmente presentan características clínicas y pronósticas más desfavorables que sus homólogos diagnosticados en adultos ancianos (edad de diagnóstico ≥ 70 años), por lo que algunos autores han sugerido la existencia de diferentes mecanismos moleculares en función de la edad de inicio de la enfermedad. Teniendo en cuenta la relevancia que los cambios en la dosis génica ejercen sobre el proceso de oncogénesis, herramientas como los *arrays* de hibridación genómica comparada (a-CGH) podrían ser de gran utilidad en la búsqueda e identificación de *loci* específicamente relacionados con la edad.

En el presente trabajo hemos realizado un análisis descriptivo comparativo de las características clínicas, anatomopatológicas, evolutivas y familiares asociadas a las neoplasias colorrectales de adultos jóvenes y ancianos. Asimismo, hemos evaluado la frecuencia de tumores con IMS y la proporción de neoplasias asociadas al síndrome de Lynch (SL) en cada una de las poblaciones. Por otra parte, hemos abordado la caracterización del patrón de cambios genómicos presentes en los tumores de inicio temprano y tardío, para compararlos y definir los cambios en el

número de copias (CNV) potencialmente comunes y/o específicos de cada grupo de edad. Finalmente, hemos sometido los resultados a diferentes análisis de agrupación jerárquica no supervisada.

Material y métodos.- Se han estudiado mediante a-CGH 146 tumores (60 de adultos jóvenes y 86 de adultos ancianos) pertenecientes a una cohorte de pacientes del Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid) diagnosticados de adenocarcinoma colorrectal primario entre enero de 2002 y diciembre de 2009. Todos los pacientes, o un familiar de primer grado en caso de fallecimiento del caso índice, firmaron el consentimiento informado. El estudio fue aprobado por el comité ético del Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid).

Resultados.- Los tumores de inicio temprano se asientan preferentemente en el colon izquierdo, y presentan menor grado de diferenciación y mayor frecuencia de neoplasias mucosecretoras o con células en “anillo de sello” que los de inicio tardío. Con mayor frecuencia muestran un componente familiar que, por lo general, cumple los criterios clínicos establecidos para la sospecha del SL.

Nuestros resultados confirman la existencia de diferentes perfiles de INC en función de la edad de inicio de la enfermedad. Desde un punto de vista cuantitativo, los jóvenes presentan alteraciones recurrentes (frecuencia $\geq 30\%$) más diversas y frecuentes. En los ancianos predominan las pérdidas en 18q21 (donde se localizan *DCC* y *SMAD4*) y en 5q22 (donde se localiza *APC*), es decir, alteraciones características del modelo más conocido de carcinogénesis colorrectal. Desde un punto de vista cualitativo, se han identificado 24 regiones diferentemente afectadas en función de la edad de diagnóstico, siendo las pérdidas en 1p36, 1p12, 1q21, 9p13, 14q11, 16p13 y 16p12 más frecuentes en jóvenes, y las ganancias en 7q11 y 7q22 más frecuentes en ancianos.

El análisis no supervisado también ha demostrado discrepancias entre los perfiles de INC asociados a ambas poblaciones, estratificando las muestras en dos *clusters* diferentemente relacionados con la edad de aparición. Aunque no se obtuvo correlación entre el perfil de INC y el pronóstico de la enfermedad, la IMS parece ser un factor asociado con resultados clínicos más favorables, como ya se conocía.

Conclusiones.- El CCR en el adulto joven presenta características clínicas, anatomopatológicas y familiares diferentes al del adulto anciano. Nuestros hallazgos confirman la existencia de diferencias entre la inestabilidad genómica identificada en los adultos jóvenes y ancianos, demostrando correlación entre el perfil de INC y la edad de inicio de la enfermedad. Aunque las diferencias encontradas han sido más importantes desde un punto de vista cuantitativo, también se han identificado regiones sugestivas de especificidad de grupo que tal vez puedan servir como punto de partida para la búsqueda de nuevos genes y de nuevas vías de carcinogénesis.

SUMMARY

Background.- In Spain, colorectal cancer (CRC) is the third most frequent neoplasm in men (after prostate cancer and lung cancer) and the second most frequent neoplasm in women (after breast cancer). It is caused by a progressive accumulation of genetic and epigenetic alterations that lead to the transformation of normal colonic epithelial cells into colon adenocarcinoma cells, in a process called the adenoma-carcinoma sequence. Three distinct mechanisms of genomic instability may be operative in CRC: chromosomal instability (CIN) also known as the “suppressor” pathway, microsatellite instability (MSI) also known as the “mutator” pathway and CpG island methylator phenotype (CIMP).

Although young age at diagnosis (≤ 45 years old) is a characteristic of hereditary forms of cancer, early-onset CRC can also be sporadic. Because of the low frequency of CRC in young people (2-8%), sporadic early-onset tumors remain still poorly characterized. In comparison with late-onset CRC (patients ≥ 70 years old at the time of diagnosis), sporadic early-onset tumors are more frequently associated with poor prognosis, invasive phenotype, early metastasis, and familial clustering, and patients with such tumors are in general considered as a high-risk group within CRC. It has been proposed that early-onset and late-onset CRC might evolve in distinct ways, and that there may be a different molecular basis for each age at onset. For this reason, copy number alterations (CNAs) detected by array comparative genomic hybridization (a-CGH) may contribute to the identification of specific altered loci that might include important genes for tumor progression in the different age groups.

In this work, we have performed a comparative descriptive analysis of clinical, pathological and familial features associated with early-onset and late-onset CRC. We have also evaluated the frequency of MSI tumors and the proportion of neoplasms associated with Lynch syndrome (LS) in each population. Moreover, we have addressed the characterization of genomic changes in early-onset and late-onset tumors in order to compare them to each other and define the CNAs potentially common and/or specific to each age group. Finally, we submitted the results to an unsupervised analysis.

Materials and methods.- Array comparative genomic hybridization profiling of 146 colorectal tumors (60 early-onset and 86 late-onset) in combination with an unsupervised analysis were used. Samples were collected from a cohort of patients diagnosed with primary colorectal adenocarcinoma between January 2002 and December 2009 at the 12 de Octubre University Hospital in Madrid. All patients or a first degree relative in case of death of the index case, provided written consent and the study was approved by the Ethics Committee of the Institution.

Results.- Early-onset tumors are commonly located at the left colon and they are frequently poorly differentiated. In addition, histologic subtypes are often mucinous (signet ring cells), being in general more likely to associate a familial component and to fulfill the clinical criteria for the LS.

Our results confirm the existence of differences between the CIN profiles of early-onset and late-onset tumors. From a quantitative point of view, the younger subset showed more recurrent alterations (frequency $\geq 30\%$) and more extreme values in the frequencies of these recurrent alterations. The older subset showed a higher proportion of losses in 18q21 (where *DCC* and *SMAD4* are located) and in 5q22 (where *APC* is located), that is, alterations including genes described in the traditional genetic model for colorectal tumorigenesis. From a qualitative point of view, a total of 24 chromosomal segments showed differences between both populations, being losses at 1p36, 1p12, 1q21, 9p13, 14q11, 16p13 and 16p12 significantly more frequent in younger patients and gains at 7q11 and 7q22 more frequent in the older ones.

Moreover, the unsupervised analysis stratified tumors based on their CIN profiles into two main clusters each one of which was enriched in patients from one of the age subsets. Although no correlation was obtained between the CIN profile and the prognosis of the disease, MSI seems to be a factor related with favorable clinical outcomes, as it was already known.

Conclusions.- Early-onset CRC shows different clinical, anatomopathological and familial features than the late-onset one. Our findings confirm the existence of substantial differences between the CIN pattern of early-onset and late-onset tumors, showing association between age at diagnosis and specific patterns of

CNAs. Although these differences were more important from a quantitative point of view, we also did find differences between the CNAs arising in sporadic early-onset and late-onset CRC which included some chromosomal segments differentially affected between both groups of age. These results may contribute to the identification of new genomic regions involved in tumorigenesis and ultimately lead to the discovery of new pathways of colorectal carcinogenesis.

I. INTRODUCCIÓN

1. EL CÁNCER, UNA ENFERMEDAD GENÉTICA

El término cáncer engloba un grupo de enfermedades caracterizadas por la proliferación excesiva y descontrolada de células anormales. Su proceso de formación, también denominado carcinogénesis, desemboca en la aparición de una masa conocida con el nombre de tumor o neoplasia, que posteriormente puede diseminarse y extenderse a diferentes partes del cuerpo.

Genéticamente, el cáncer constituye una entidad compleja cuyo origen se vincula a la acumulación de múltiples alteraciones en el genoma de las células que lo componen (Al-Sohaily *et al.* 2012). Las alteraciones que originan la neoplasia pueden ser tanto genéticas como epigenéticas. Las primeras afectan a la secuencia de ADN, abarcando deleciones, amplificaciones, mutaciones e incluso pérdidas o ganancias de cromosomas enteros. En cambio, las alteraciones epigenéticas afectan a la expresión de los genes, englobando entre otros, el silenciamiento por hipermetilación de las islas CpG de los promotores génicos (Snover, 2011). El extenso abanico de combinaciones que puede tener lugar entre las alteraciones genéticas y epigenéticas, es el principal responsable de la amplia heterogeneidad, variabilidad morfológica y variedad pronóstica de los tumores (Blanco-Calvo *et al.* 2015).

La mayor parte de los cánceres aparece de forma esporádica como resultado de la acumulación de mutaciones somáticas en el tejido que da lugar a la neoplasia. Sin embargo, en torno a un 5% de los casos presenta un componente hereditario relacionado con mutaciones germinales (Binefa *et al.* 2014), que otorga unos rasgos característicos diferenciadores con respecto a los casos esporádicos. Entre estos rasgos destacan:

- Edad de aparición temprana.
- Multifocalidad de los tumores o bilateralidad en caso de órganos pares.
- Aparición de varios tumores primarios en el mismo individuo.
- Antecedentes familiares de la misma neoplasia.
- Alta incidencia de cáncer dentro de la familia.

2. EL CÁNCER COLORRECTAL. GENERALIDADES

2.1. Aspectos globales

El intestino grueso o colon, es el órgano comprendido entre la válvula ileocecal y el ano. Posee un calibre que disminuye progresivamente y una longitud variable que oscila entre los 120 y los 160 cm. Clásicamente se divide en seis partes: ciego, colon ascendente, colon transverso, colon descendente, sigma y recto (Figura I.1A), y al igual que el resto del tracto digestivo, presenta una pared dispuesta en cuatro capas: mucosa, submucosa, muscular y serosa (Figura I.1B).

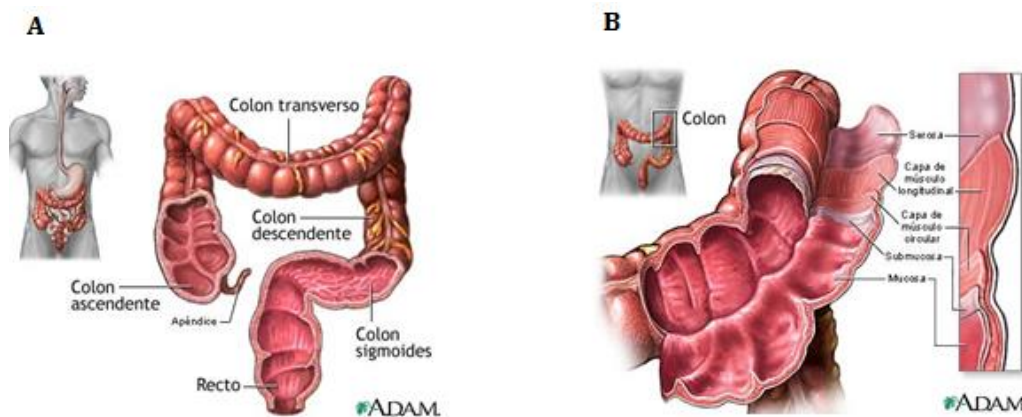


Figura I.1. Estructura del intestino grueso (A) y sus capas (B). Imagen tomada de *ADAM Images*.

Se entiende por cáncer colorrectal (CCR) aquella formación maligna iniciada en la mucosa del colon o del recto cuya histología típica corresponde a un adenocarcinoma (Schneider *et al.* 2014). Está considerada una enfermedad multifactorial en la que intervienen tanto factores genéticos como ambientales (Arvelo *et al.* 2015).

2.2. Epidemiología

En Europa, el CCR constituye la segunda neoplasia más común en mujeres tras el cáncer de mama, y la tercera más común en varones tras los cánceres de próstata y pulmón (Ferlay *et al.* 2013), con una incidencia ligeramente superior en el sexo masculino (relación 1,4:1).

Los últimos datos publicados en la base de datos de la Agencia Internacional para Investigación sobre Cáncer (IARC, *International agency for research on cancer*), recogen la tasa mundial de incidencia en el año 2012 para ambos sexos

(Globocan, 2012) (Figura I.2). Las mayores tasas de incidencia se sitúan en Australia, Nueva Zelanda, Europa y América del Norte, mientras que las tasas más bajas se sitúan en África (excepto Sudáfrica) y Asia Sur-Central. Estos datos apuntan directamente hacia la innegable repercusión que ejerce la occidentalización del estilo de vida sobre el desarrollo del CCR.

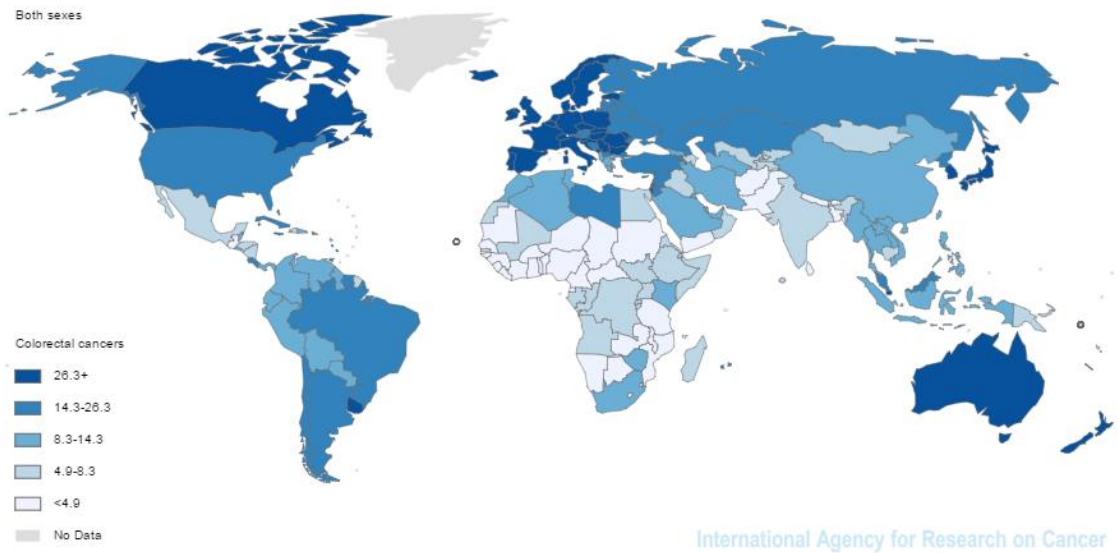


Figura I.2. Incidencia mundial de CCR para ambos sexos (Globocan 2012).

En España, se estima que los diagnósticos de CCR aumentaron un 13,2% en hombres y un 6,6% en mujeres entre los años 2006 y 2012, convirtiéndose en uno de los tumores con mayor tasa de crecimiento dentro de los más prevalentes (Center MM *et al.* 2009) (Figura I.3). Actualmente, constituye el tipo de cáncer más frecuente (15%) y el segundo en mortalidad, tanto en hombres como en mujeres (Corral *et al.* 2015).

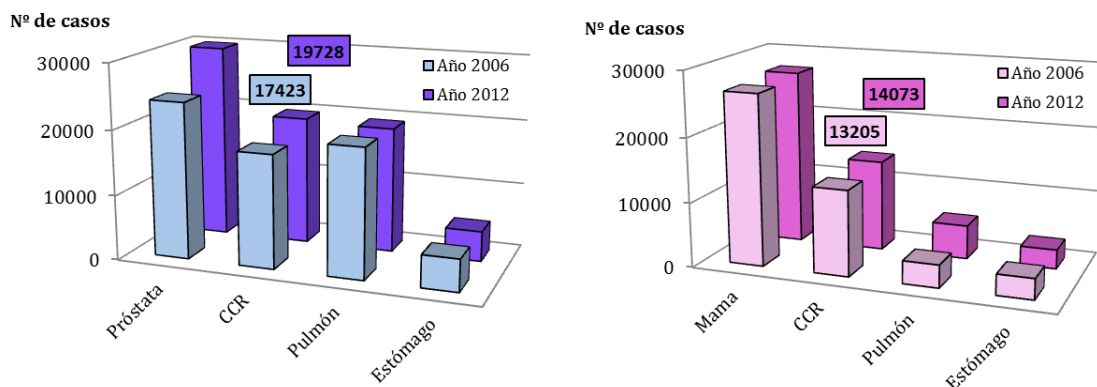


Figura I.3. Incidencia de los cánceres más prevalentes en España en hombres (izquierda) y mujeres (derecha) en los años 2006 y 2012. Datos de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM).

2.3. Clasificación por estadios

La clasificación por etapas (estadios) o estadificación patológica del CCR, es el proceso que determina hasta dónde se ha extendido la enfermedad en el organismo.

En 1932 Dukes propuso una clasificación en la que definía tres estadios (A, B y C) en función de que el tumor invadiese la pared sin alcanzar la capa subserosa, la rebasase, o hubiese afectación de ganglios locorregionales, respectivamente. Posteriores modificaciones introdujeron la letra “D” para indicar la presencia de metástasis a distancia (Turnbull *et al.* 1967) y los estadios B1, B2, B3, C1, C2 y C3 para hacer referencia al espesor de pared colónica afectada y al grado de invasión linfática (Astler y Coller, 1954, Greene *et al.* 2002). En la actualidad, el sistema TNM establecido por el *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) y la Unión Internacional Contra el Cáncer constituye el método de estadiaje más utilizado (Edge, 2010). En este sistema las letras T, N y M aportan información sobre el grado de extensión tumoral, la propagación a ganglios linfáticos regionales y la presencia o ausencia de metástasis a distancia (Tabla I.1).

T: Tumor primario	
T_x	El tumor primario no puede determinarse.
T₀	No hay evidencias de tumor primario.
T_{is}	Carcinoma “ <i>in situ</i> ”: intraepitelial o invasión de la lámina propia.
T₁	El tumor invade la submucosa.
T₂	El tumor invade la capa muscular propia.
T₃	El tumor invade la subserosa o tejidos pericólicas.
T₄	El tumor invade otros órganos o estructuras.
N: Invasión de ganglios linfáticos	
N_x	No se puede valorar el número de ganglios afectados.
N₀	No hay ganglios linfáticos regionales afectados.
N₁	Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos regionales.
N₂	Metástasis en más de 4 ganglios linfáticos regionales.
M: Metástasis a distancia	
M_x	No se puede comprobar la existencia de metástasis a distancia.
M₀	No hay metástasis a distancia.
M₁	Metástasis a distancia presente.

Tabla I.1. Categorías y subcategorías en las que se basa el actual sistema de estadificación del CCR.

Frecuentemente, la combinación de las diferentes categorías y subcategorías que pueden expresar las letras T, N y M es representada con números romanos que abarcan desde el “0” hasta el “IV” y dan una idea de la etapa en la que se encuentra la enfermedad (Figura I.4).

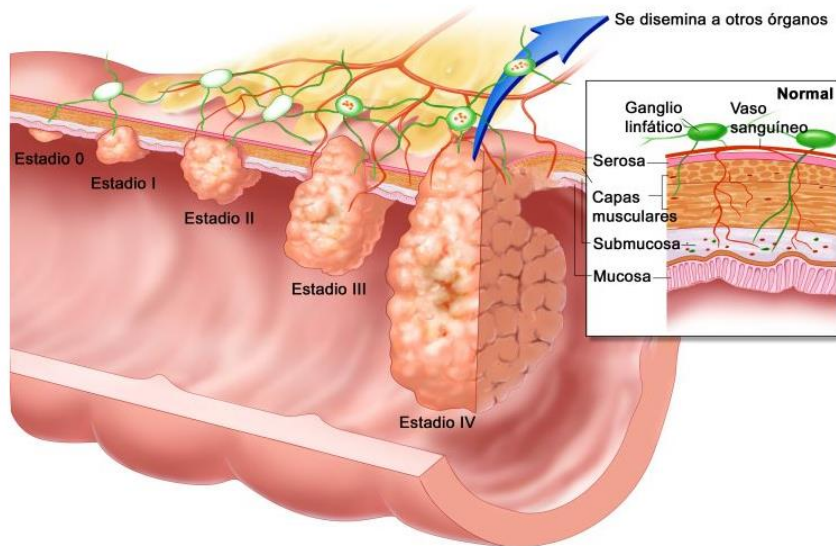


Figura I.4. Clasificación por estadios del CCR en función de la afectación de la pared colónica, ganglios y órganos a distancia. Imagen tomada del *National Cancer Institute* (www.cancer.gov).

Los diferentes sistemas de estadificación tumoral son intercambiables entre sí, de modo que todos pueden ser utilizados de forma indistinta. Por este motivo, se han desarrollado tablas de equivalencia que permiten establecer el paralelismo entre ellos de una forma rápida y sencilla (Tabla I.2).

Estadio	Clasificación (AJCC)			Estadio de Astler-Coller	Estadio de Dukes
	T	N	M		
0	Tis	N0	M0	--	--
I	T1, T2	N0	M0	A/B1	A
II	T3, T4	N0	M0	B2/B3	B
III	T1-T2	N1	M0	C1	C
	T3-T4	N1	M0	C2, C3	C
	Cualquier T	N2	M0	C1, C2, C3	C
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1	D	--

Tabla I.2. Equivalencia entre los diferentes sistemas de estadificación del CCR.

2.4. Manejo clínico

2.4.1. Lesiones precancerosas: pólipos colónicos

El *National Polyp Study Workgroup* estableció que más del 95% de los CCR son precedidos por lesiones pre-malignas que progresan durante varios años hasta desarrollar la enfermedad (Winawer *et al.* 1993). Estas lesiones, que generalmente aparecen en forma de acúmulos de células de tamaño y morfología variables (pólipos), son lesiones fácilmente detectables y extirpables.

2.4.1.1. Pólipos adenomatosos

Son los más frecuentes y de mayor potencialidad maligna. Morfológicamente se clasifican en sesiles, pediculados y planos o deprimidos (Figura I.5).

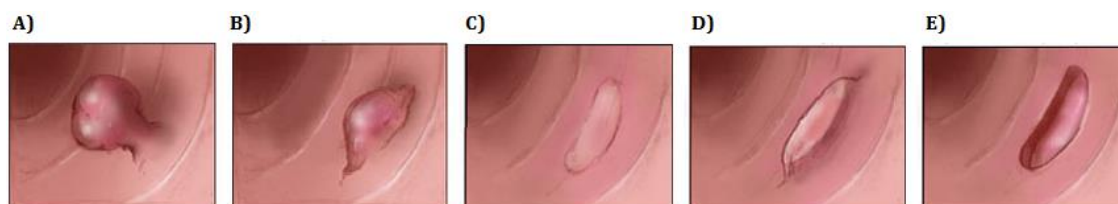


Figura I.5. Clasificación morfológica de los pólipos adenomatosos: (A) pediculados, (B) sesiles, (C) planos, (D) planos elevados, (E) planos deprimidos. ©Mayo Foundation for Medical Education and Research.

Su naturaleza neoplásica viene determinada por la histología, pudiendo mostrar alto o bajo grado de displasia, y ser clasificados como tubulares, vellosos o túbulo-vellosos. La incidencia del cáncer invasor está directamente relacionada con el número de pólipos, el tamaño, el grado de displasia y la proporción de componente velloso (Bas *et al.* 2015, Silva *et al.* 2014).

2.4.1.2. Pólipos serrados

Son responsables del 35% de los CCR, aunque su origen todavía no se conoce con detalle. Por un lado se presume que podrían deberse a alteraciones epigenéticas en los genes responsables de la proliferación y diferenciación celular, y por otro, parecen estar relacionados con mutaciones en el gen *BRAF*.

Frecuentemente se localizan en el colon proximal y se caracterizan por un aspecto dentado del epitelio de las criptas. Existen diferentes subtipos, cada uno de los cuales presenta un potencial de malignización y unas características histológicas y genéticas propias (Rex *et al.* 2012, Sweetser *et al.* 2013).

2.4.2. Diagnóstico: síntomas y métodos de *screening*

Aunque el CCR se caracteriza por la ausencia de signos clínicos durante las etapas iniciales de la enfermedad, se han descrito una serie de síntomas que pueden ser indicativos de un proceso neoplásico de este tipo. Entre las principales señales de alarma se encuentran el dolor abdominal, el cambio en el hábito intestinal, la falta de apetito, la anemia ferropénica y la presencia de sangre en las heces. Otras manifestaciones como la oclusión intestinal, la existencia de una masa abdominal o la pérdida de peso sin causas aparentes, pueden ser indicativas de un proceso neoplásico avanzado.

La falta de síntomas durante los estadios iniciales del CCR hace que los pólipos a menudo representen un hallazgo fortuito durante la realización de una colonoscopia. Por este motivo, se han desarrollado programas de cribado poblacional orientados a la detección precoz de la enfermedad, que aumentan el número de diagnósticos en fases en las que el tratamiento puede resultar curativo y mejoran el pronóstico en el caso de neoplasias ya establecidas. Actualmente, las recomendaciones para el cribado del CCR en nuestro medio contemplan la realización de exploraciones periódicas a todos los individuos sin factores de riesgo a partir de los 50 años, o a edades inferiores en el caso de individuos con antecedentes familiares u otros factores de predisposición (Segura *et al.* 2014). La determinación de sangre oculta en heces (SOH) constituye la prueba inicial empleada en el *screening*, y ante una positividad de la misma, el diagnóstico definitivo debe realizarse mediante colonoscopia (Segura *et al.* 2014).

2.4.3. Tratamiento

Las opciones sobre el tratamiento a aplicar dependen tanto del estadio de la enfermedad como de la localización tumoral. En base a estos criterios, los procedimientos aplicados son fundamentalmente tres: cirugía, radioterapia y quimioterapia.

2.4.3.1. Tratamiento quirúrgico

La cirugía constituye el tratamiento más efectivo para la curación del CCR localizado, y una opción potencialmente curativa en pacientes con enfermedad metastásica limitada (Dinu *et al.* 2014). Debe ser ofrecida como primera opción

cuando el paciente presenta unas condiciones físicas adecuadas, circunstancia que se cumple en torno al 90% de los casos.

En ocasiones, el tratamiento quirúrgico puede ser complementado con tratamiento oncológico (quimioterapia y/o radioterapia), habiéndose demostrado que la administración de adyuvancia antes y después de la cirugía reduce el riesgo de recaída tras la misma (Nordlinger *et al.* 2008).

2.4.3.2. Radioterapia y quimioterapia

La terapia adyuvante contribuye a erradicar tanto las micrometástasis clínicamente ocultas en el momento de la cirugía, como los posibles nuevos focos cancerosos. Los resultados obtenidos al aplicar este tipo de tratamiento son diferentes en función del estadio en el que se encuentre la enfermedad. Así, en el estadio I no se considera necesaria su administración, mientras que en el estadio III ha demostrado una reducción del 30% en el riesgo de recurrencia y del 22-32% en la mortalidad. El empleo de adyuvancia en el estadio II todavía es objeto de debate, constituyendo únicamente una práctica habitual en los pacientes de alto riesgo (Dunn *et al.* 2011, Teufel *et al.* 2015).

Radioterapia

La terapia neoadyuvante con radioterapia preoperatoria logra una mayor tasa de respuestas locales y una menor toxicidad para el cáncer de recto, mientras que administrada de forma postoperatoria combate eficazmente la enfermedad microscópica residual (Burbach *et al.* 2014, Kye *et al.* 2014).

Quimioterapia

Se basa en el empleo de fármacos que incluyen fluoropirimidinas [5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina y tegafur], oxaliplatino e irinotecan, y anticuerpos monoclonales (cetuximab, panitumumab y bevacizumab). Aunque las células cancerosas son más susceptibles a la acción de este tipo de medicamentos, el daño a las células normales constituye un efecto inevitable que provoca la aparición de toxicidad asociada al tratamiento en la mayor parte de los pacientes.

Distintos estudios han descrito la importancia de la variabilidad genética en la toxicidad farmacológica (Cortejoso *et al.* 2012, Panczyk 2014, Ross *et al.* 2010), motivo por el que cada vez resulta más frecuente el empleo de terapias dirigidas

que actúan sobre genes específicos, proteínas o condiciones del tejido que favorecen el crecimiento y la supervivencia tumoral. Iniciativas como *Pharmacogenomics Knowledgebase (PharmGKB)* ponen a disposición del público información sobre polimorfismos, genes, medicamentos y dosis en función de genotipo, favoreciendo la incorporación de la farmacogenética a la práctica clínica habitual (Whirl-Carrillo *et al.* 2012).

2.4.4. Seguimiento

Se estima que el 40% de los pacientes con enfermedad en estadios II o III presentará recurrencia de la enfermedad, por lo que un adecuado seguimiento tras la cirugía y/o el tratamiento adyuvante, conseguirá identificar recidivas en estadios potencialmente curables (Baca *et al.* 2011, Hveem *et al.* 2014).

Distintas sociedades nacionales e internacionales publican periódicamente recomendaciones para el seguimiento de los pacientes intervenidos de CCR (Jorgensen *et al.* 2015), destacando todas ellas la importancia de las visitas rutinarias de control, los procedimientos de exploración por imagen, la realización de colonoscopias y las analíticas de sangre a la hora de llevar a cabo esta tarea.

2.5. Factores de riesgo

Constituyen todos aquellos aspectos que afectan a la probabilidad de padecer una enfermedad. Dada la etiología multifactorial del CCR, se han identificado varios agentes implicados en su desarrollo.

2.5.1. Factores de riesgo genéticos

Los individuos con antecedentes familiares de CCR tienen mayor riesgo de padecer la enfermedad. La asociación se vuelve más acentuada en las personas que proceden de familias con síndromes hereditarios relacionados con esta neoplasia, como la Poliposis adenomatosa familiar (PAF) o el síndrome de Lynch (SL).

2.5.2. Factores de riesgo no genéticos o ambientales

Edad

El riesgo de padecer CCR aumenta exponencialmente con la edad, alcanzando su máxima incidencia entre los 65 y los 74 años. El diagnóstico a edades inferiores o

iguales a los 45 años es infrecuente y representa menos del 10% de los casos (Figura I.6).

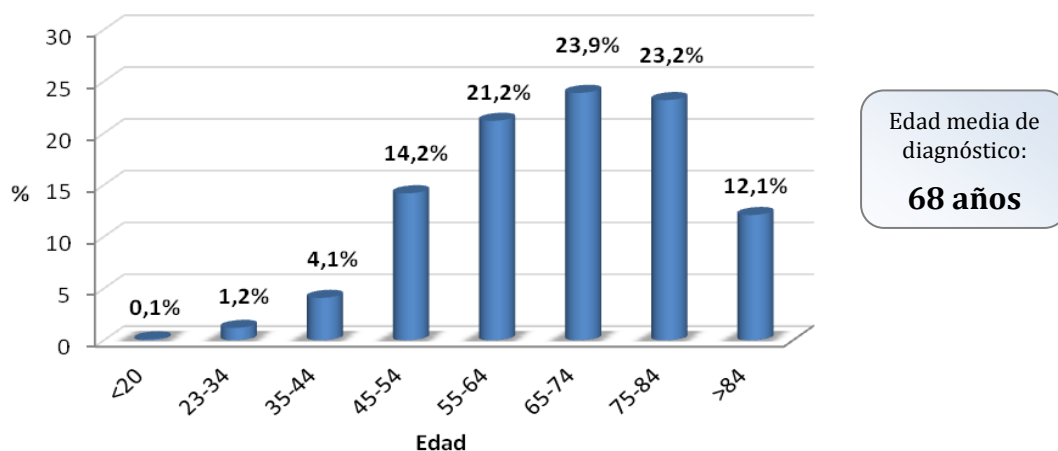


Figura I.6. Incidencia de CCR por grupos de edad entre los años 2007-2011 en hombres y mujeres de todas las razas. Datos de *Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program, 2007-2011*.

Factores dietéticos y hábitos tóxicos

Puesto que el colon es un órgano expuesto de forma continuada a sustancias ingeridas o producidas por la digestión, resulta inevitable pensar que los factores dietéticos van a desempeñar un papel relevante en la probabilidad de sufrir CCR. No obstante, los estudios realizados carecen de la suficiente consistencia como para fijar unas directrices claras a este respecto.

De forma general, se acepta que el riesgo de padecer CCR aumenta con el consumo de tabaco y alcohol (Parajuli *et al.* 2014, Song *et al.* 2015). Se recomienda moderar el consumo de carne procesada o en contacto con el fuego y aumentar el consumo de productos lácteos, vegetales, fruta y fibra (Norat *et al.* 2015). Aunque la administración de folatos, calcio, betacarotenos, selenio y vitaminas A, B, C, D o E parece ejercer un efecto protector (Lee y Chan, 2011), son necesarios más estudios prospectivos que confirmen esta hipótesis.

Otros factores de riesgo

También constituyen factores de riesgo la diabetes, la obesidad, la escasa actividad física, la sepsis por *Streptococcus bovis* (Guraya 2015, Paritsky *et al.* 2015, Segura *et al.* 2014) y la enfermedad inflamatoria intestinal en sus dos variantes: enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa (Bae *et al.* 2014, Cunningham *et al.* 2010). Aunque es posible que los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) o el

ácido acetilsalicílico (AAS) a baja dosis puedan contribuir a reducir el riesgo de CCR, la evidencia actual no apoya su uso como forma de prevención primaria (Friis *et al.* 2015, Segura *et al.* 2014).

2.6. Mecanismo de generación del CCR: secuencia adenoma-carcinoma

El modelo tradicional de carcinogénesis colorrectal considera la formación del tumor como un proceso progresivo de acumulación de alteraciones genéticas en la mucosa del colon (Fearon y Vogelstein, 1990). Los modelos matemáticos han estimado que el número de alteraciones requeridas para el desarrollo de la enfermedad debe ser superior o igual a siete, siendo la suma de éstas, y no su orden cronológico, quien determina las propiedades biológicas del tumor (Kinzler y Vogelstein, 1996). Publicaciones más recientes que combinan estudios epidemiológicos con datos de secuenciación de todo el genoma, han sugerido que únicamente es necesaria la alteración de tres genes *driver* para que se produzca el desarrollo de la enfermedad (Tomasetti *et al.* 2015).

La acumulación de alteraciones tiene lugar mediante un esquema conocido como “secuencia adenoma-carcinoma” que requiere algunos años para la formación del tumor. Durante este tiempo la mucosa colónica inicialmente normal se transforma en hiperplásica o adenomatosa (con los diversos tipos evolutivos: tubular, túbulo-velloso y vellosa), cáncer “*in situ*” y finalmente cáncer invasor (Figura I.7).

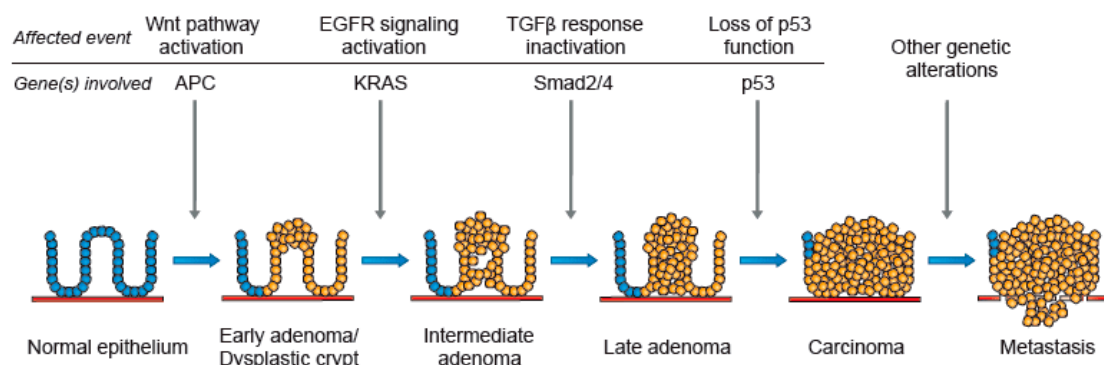


Figura I.7. Alteraciones genéticas en la secuencia adenoma-carcinoma (Davies *et al.* 2005).

El aumento de la proliferación celular se inicia mediante la inactivación del gen *APC*, mutado en un 80% de los pacientes (Arvelo *et al.* 2015). La posterior activación del oncogén *KRAS*, mutación y pérdida de heterocigosidad (LOH, *Loss of heterocigosity*) de *DCC*, *SMAD2*, *SMAD4* e inactivación del gen *p53*, conducen a la inhibición de la apoptosis y modificación de la actividad de la vía *TGF-β*, potenciando el desarrollo tumoral, la invasión y la metástasis (Arvelo *et al.* 2015). Paralelamente a estos cambios tienen lugar alteraciones epigenéticas que ejercen un efecto sinérgico sobre la activación de oncogenes e inactivación de genes supresores de tumores (Yi *et al.* 2015).

Aunque la mayor parte de los tumores se genera a partir de adenomas clásicos de acuerdo al modelo de carcinogénesis postulado por Fearon y Vogelstein, recientemente se ha señalado la importancia de los adenomas serrados como lesiones precursoras del adenocarcinoma serrado, una nueva variante de CCR. Inicialmente, los adenomas serrados fueron clasificados como pólipos hiperplásicos por ser considerados benignos. Sin embargo, en los últimos años se ha visto que parecen seguir un mecanismo de carcinogénesis diferente al convencional, que da lugar a tumores con características histológicas y genéticas propias (Al-Sohaily *et al.* 2012, Sweetser *et al.* 2013) (Tabla I.3).

Características	Secuencia adenoma-carcinoma convencional	Teoría adenoma serrado-carcinoma
Lesión precursora	Adenoma clásico	Adenoma serrado
Localización	A lo largo de todo el colon	Predilección colon derecho
Morfología	Pediculado (adenoma tubular) Sesil (adenoma vellosa)	Sesil, plano
Malignización	Menos frecuente	Más frecuente
Alteración genética	Mutación <i>APC</i> , <i>p53</i>	Mutación <i>BRAF</i>
Hipermetilación de ADN	Infrecuente	Frecuente
% de CCR esporádico	65%	35%

Tabla I.3. Diferencias entre las características tumorales de la secuencia adenoma-carcinoma convencional y la teoría adenoma serrado-carcinoma. Modificado de Cappell 2008.

3. CCR HEREDITARIO vs. CCR ESPORÁDICO

El CCR se clasifica como familiar o esporádico, en función de la presencia/ausencia de historia de la enfermedad en el seno de la familia (Stigliano *et al.* 2014).

3.1. CCR hereditario y síndromes relacionados

El CCR presenta una de las proporciones más importantes de casos familiares dentro de las neoplasias malignas más comunes, con un porcentaje aproximado del 30% atribuible a causas heredadas (Binefa *et al.* 2014). Dentro de este porcentaje se considera CCR hereditario aquel en el que se identifica un claro modelo de herencia y en el que suele detectarse una alteración genética en línea germinal (1-5%), mientras que se considera CCR familiar aquel en el que se observa agregación de casos en la familia sin un claro patrón de herencia y, por lo general, con base genética desconocida (25-30%) (Shiovitz *et al.* 2014). La agregación familiar implica un mayor riesgo de padecer la enfermedad, tanto mayor cuanto mayor es el número de parientes afectos y más cercano el grado de parentesco (Armelaio *et al.* 2014).

3.1.1. Síndrome de Lynch

También mal llamado Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (CCHNP), el SL representa entre el 1% y el 5% de todos los CCR. Constituye una enfermedad genética de herencia autosómica dominante que confiere un riesgo aumentado de padecer distintos tipos de cáncer, principalmente CCR y cáncer de endometrio (Balmaña *et al.* 2013, Pinheiro *et al.* 2015, Schneider *et al.* 2014).

Aunque la enfermedad no se caracteriza por un gran número de pólipos, sus adenomas surgen a edades más tempranas y presentan una rápida progresión hacia la malignización, con una edad media de diagnóstico situada en torno a los 43 años. Los tumores asociados al SL frecuentemente se localizan en el colon proximal y se relacionan con una mayor incidencia de tumores sincrónicos (18%) y/o metacrónicos (24%) (Kastrinos *et al.* 2013, Schneider *et al.* 2014). Desde el punto de vista anatomopatológico, son comunes los bajos grados de diferenciación, la presencia de mucina, las células en “anillo de sello”, el patrón de infiltración

Crohn like y la infiltración linfoide tumoral (Valle, 2014). Además, se han descrito variantes en las que el CCR se asocia con tumores sebáceos de piel (síndrome de Muir-Torre) o con tumores del sistema nervioso central, especialmente gliomas (síndrome de Turcot).

El SL tiene su origen en las mutaciones de los genes reparadores del ADN (*MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS2*), también conocidos como genes de reparación de los errores de emparejamiento o genes MMR (*Mismatch repair*). Dichas mutaciones interfieren en las tareas de replicación y provocan el mal funcionamiento del sistema MMR, favoreciendo la acumulación de errores en la secuencia de ADN. Los errores acumulados pueden afectar tanto a regiones codificantes de genes relacionados con la progresión tumoral (*TGF-βRII*, *IGFIIR*, *MSH3* y *BAX*) (Pinheiro *et al.* 2015, Sameer *et al.* 2014) como a unas secuencias altamente repetitivas denominadas microsatélites, siendo éstas últimas las responsables del fenómeno molecular característico del síndrome: la inestabilidad de microsatélites (IMS) (Stigliano *et al.* 2014). El SL se caracteriza por una cierta correlación genotipo-fenotipo en la que se observan algunas particularidades en función del gen afectado (Karahan *et al.* 2015). Así, mutaciones en *MLH1* se relacionan con mayor riesgo de desarrollar CCR a una edad precoz, mutaciones en *MSH2* se relacionan con mayor riesgo de desarrollar tumores extracolónicos, mutaciones en *MSH6* se relacionan con mayor riesgo de desarrollar cáncer endometrial, y mutaciones en *PMS2* se relacionan con menor riesgo de desarrollar cáncer endometrial y CCR (Balmaña *et al.* 2013).

Inicialmente, el diagnóstico de la enfermedad se basaba en la historia personal y familiar del paciente, por lo que la definición del síndrome era muy heterogénea. En un intento de promover una terminología uniforme se establecieron los criterios de Ámsterdam, aunque su gran rigidez y falta de consideración respecto a las neoplasias extracolónicas hicieron que poco más tarde se propusiesen los criterios de Ámsterdam II (Vasen *et al.* 1999). En la actualidad, los criterios más utilizados para el diagnóstico del SL son los criterios de Bethesda, propuestos en 1996 y posteriormente revisados (Umar *et al.* 2004). En ellos se describen las condiciones clínicas bajo las que se debe sospechar la existencia de la enfermedad, y por tanto, las situaciones en las que se recomienda la realización de estudios

moleculares adicionales (IMS, inmunohistoquímica [IHQ] de las proteínas de reparación), que determinen la necesidad de llevar a cabo el consiguiente análisis mutacional (Schneider *et al.* 2014).

3.1.2. Poliposis Adenomatosa Familiar

Se produce como resultado de una mutación en la línea germinal del gen *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*), un gen localizado en el brazo largo del cromosoma 5. Supone menos del 1% del total de CCR y aunque se hereda de acuerdo a un patrón de herencia autosómico dominante, la tercera parte de los casos no presenta antecedentes familiares de la enfermedad. Su prevalencia es de 1 por cada 10.000-20.000 habitantes y su penetrancia del 100% (Laurent *et al.* 2011).

La PAF se inicia durante la segunda década de vida mediante la aparición de cientos o miles de adenomas a lo largo de todo el colon con potencial de malignización del 100%, lo que supone una progresión inevitable a CCR alrededor de los 35-40 años. Aunque la PAF puede presentar manifestaciones extraintestinales, el CCR con localización izquierda es su expresión más característica (70-80%) (Balmaña *et al.* 2013, Schneider *et al.* 2014).

Existe una variante menos agresiva denominada Poliposis adenomatosa familiar atenuada (PAFA) que se caracteriza por un menor número de pólipos (normalmente entre 10 y 100), una aparición de los adenomas a una edad más tardía, y una mayor tendencia al desarrollo de neoplasias en el colon derecho. Otra variante a tener en cuenta es la Poliposis adenomatosa familiar asociada a *MUTYH*, una forma de poliposis transmitida de forma recesiva, que puede llegar a explicar hasta el 30% de las familias con adenomas múltiples sin mutación en *APC* (Brand *et al.* 2012). Además, existen síndromes que ligan la PAF a otras manifestaciones extracolónicas, como el síndrome de Gardner (asociación con osteomas craneales y mandibulares) y el síndrome de Turcot (asociación con tumores del sistema nervioso central, principalmente meduloblastomas).

3.2. CCR esporádico: vías moleculares de carcinogénesis

Se entiende por CCR esporádico aquel que se presenta en personas sin antecedentes familiares ni alteración genética constitucional, por lo que engloba la mayor parte de los casos (70-85%) (Figura I.8).

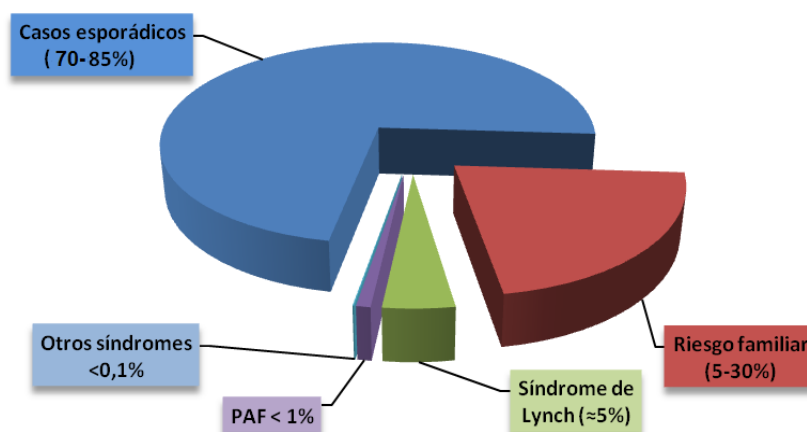


Figura I.8. Distribución de los distintos subtipos de CCR en la población general.

Durante más de dos décadas el modelo de carcinogénesis colorrectal propuesto por Fearon y Vogelstein (descrito en el Apartado 2.6) ha evolucionado hasta conceptos más complejos, de forma que en la actualidad se conocen tres vías principales para el desarrollo del CCR: la vía supresora o de inestabilidad cromosómica (INC), la vía mutadora o de IMS, y la vía serrada o del fenotipo metilador de islas de *CpG* (FM o CIMP [*CpG island methylator phenotype*]) (Arvelo *et al.* 2015). Aunque estas tres vías son diferentes desde el punto de vista molecular, histopatológico y pronóstico, pueden existir solapamientos entre ellas. No obstante, será la vía seguida de forma mayoritaria la encargada de otorgar al tumor sus características fenotípicas (Mundade *et al.* 2014).

3.2.1. Vía supresora o de INC

Engloba la mayor parte de los CCR esporádicos (85%) y se caracteriza por el desarrollo de tumores con ganancias y pérdidas de cromosomas enteros (aneuploidía), pérdidas de fragmentos en los cromosomas 5q y 7p, alta frecuencia de LOH para el brazo largo del cromosoma 18 (donde se localiza el gen *DCC*) y mutaciones en el oncogén *KRAS*. Además, son comunes fenómenos como la activación de pro-oncogenes (*c-MYC*) y la inactivación de genes supresores de tumores (*APC*, *p53*, *SMAD2* y *SMAD4*) (Arvelo *et al.* 2015, Osorio *et al.* 2014, Fearon 2011). Recientemente se han descrito las mutaciones en *TGFBR* y *PIK3CA* como implicadas en la secuencia adenoma-carcinoma (Armaghany *et al.* 2012, Pino *et al.* 2010).

El proceso tumoral se inicia con la aparición de un adenoma que va acumulando alteraciones genéticas conforme aumenta de tamaño. Primeramente se produce la pérdida o inactivación del gen *APC*, seguida de mutaciones en *KRAS* y pérdidas cromosómicas en 18q (*DCC*) y 17p (*p53*) (Fearon y Vogelstein, 1990). Trabajos más recientes afirman que los genes *APC*, *KRAS* y *p53* únicamente se encuentran alterados de manera simultánea en un porcentaje de casos inferior al 10%, aunque sostienen la existencia de una posible codependencia en el estado mutacional de los genes *APC* y *KRAS* (Smith *et al.* 2002, Lüchtenborg *et al.* 2005, Vasovcak *et al.* 2011).

Los tumores desarrollados a través de esta vía presentan estabilidad de microsatélites (EMS), suelen localizarse en el lado izquierdo del colon y se asocian con características pronósticas más desfavorables. Sus restantes rasgos fenotípicos se encuentran recogidos en la Tabla I.4.

3.2.2. Vía mutadora o de IMS

Paralelamente a la secuencia adenoma-carcinoma propuesta por Fearon y Vogelstein, hubo trabajos que apuntaron hacia la existencia de una nueva vía de carcinogénesis aplicable al 10-15% de los tumores esporádicos y a algunos casos hereditarios (Aaltonen *et al.* 1993, Ionov *et al.* 1993, Thibodeau *et al.* 1993). Más tarde se descubrió que cerca del 95% de los tumores asociados al SL y un 10-15% de los tumores esporádicos siguen esta vía de desarrollo (Jover *et al.* 2003).

La vía mutadora o de IMS es consecuencia del mal funcionamiento del sistema encargado de corregir los errores producidos durante la replicación del ADN. Cualquier alteración en este sistema conlleva la acumulación de errores que pueden afectar a las regiones codificantes de genes relacionados con la progresión tumoral (*TGF β -R-II*, *IGF2-R*), la apoptosis (*BAX*, *Caspasa-5*) y la señalización de la vía WNT (*Axina*, *β -catenina*, *Tcf4*) (Pinheiro *et al.* 2015, Sameer *et al.* 2014), o a las secuencias microsatélites (sucesiones de nucleótidos cortas y altamente repetitivas) (Stigliano *et al.* 2014). Cuando la acumulación de errores afecta a estas últimas y el sistema MMR presenta alguna alteración que lo inactiva, los errores no pueden ser corregidos y el ADN de las células tumorales muestra un número de repeticiones diferente al observado en el ADN normal, fenómeno conocido como IMS y anteriormente señalado.

Más del 95% de los CCR hereditarios y en torno a un 10-15% de los esporádicos presenta IMS. Curiosamente, se ha visto que el mecanismo que origina dicha inestabilidad varía en función de la naturaleza hereditaria o esporádica de los tumores. Así, en los casos hereditarios su origen se debe a mutaciones germinales, mientras que en los casos esporádicos es consecuencia del silenciamiento epigenético (Osorio *et al.* 2014).

Existen miles de microsatélites repartidos a lo largo del genoma que en condiciones normales serían válidos para valorar el grado de IMS tumoral. Sin embargo, la falta de compatibilidad entre los resultados derivados del empleo de unos u otros hizo que el *National Cancer Institute* (NCI) recomendase un panel de referencia en un intento de estandarizar la medida. Dicho panel, conocido como panel de Bethesda, está constituido por dos secuencias de repeticiones mononucleotídicas (*Big Adenina Tracto* [BAT]-25 y BAT-26) y tres secuencias de repeticiones dinucleotídicas (D2S123, D5S346 y D17S250) (Boland *et al.* 1998), de modo que los tumores con inestabilidad en dos o más marcadores se definen como IMS alta (IMS-*High* o IMS-H), los tumores con inestabilidad en un marcador se definen como IMS baja (IMS-*Low* o IMS-L) y tumores sin marcadores alterados se definen como estables (EMS).

En general, los carcinomas con IMS suelen mostrar dotaciones cromosómicas intactas y ausencia de mutaciones en los genes alterados en la vía supresora (*APC*, *KRAS* y *p53*). Habitualmente se localizan en la parte proximal del colon y están asociados a mejor pronóstico, aunque algunos estudios otorgan mayor fiabilidad a la INC como marcador predictivo (Hveem *et al.* 2014, Mouradov *et al.* 2013). Otras características diferenciadoras de estos tumores se muestran en la Tabla I.4.

3.2.3. Vía serrada o del Fenotipo metilador de islas CpG

Responsable del 35% de los CCR, se basa en la regulación ejercida por los mecanismos epigenéticos sobre la expresión de oncogenes (activados por hipometilación) y genes supresores de tumores (inhibidos por hipermetilación) (Snover, 2011). La evidencia acumulada sugiere que esta vía se desarrolla de forma más rápida que las otras, lo que por un lado podría ser reflejo de la mayor agresividad de sus tumores, y por el otro, ser consecuencia de la mayor dificultad en la identificación de sus lesiones precursoras (Kocarnik *et al.* 2015).

Los tumores originados por esta vía surgen a partir de pólipos serrados y parecen no seguir los mecanismos habituales de la secuencia clásica adenoma-carcinoma (Anderson 2014, Yamane *et al.* 2014). La vía parece iniciarse mediante una mutación que activa el gen *BRAF*, ocasionando la inhibición de la apoptosis y la metilación aleatoria de los islotes *CpG* localizados en las regiones promotoras de múltiples genes (Arvelo *et al.* 2015). Las investigaciones realizadas indican que los carcinomas con CIMP positivo suelen presentar IMS (Schneider *et al.* 2014, Snover 2011) y están asociados a un perfil clínico, patológico y molecular propio (Tabla I.4). Frecuentemente muestran localización proximal, histología mucinosa, bajos grados de diferenciación, alta tasa de mutaciones en *BRAF* (o *KRAS*) y baja tasa de mutaciones en *p53* (Nazemalhosseini *et al.* 2013). Además, algunos autores han sugerido peores pronósticos cuando no se asocian a IMS (Kocarnik *et al.* 2015, Phipps *et al.* 2015).

Vía INC	Vía IMS	Vía CIMP o FM
LOH generalizada	IMS generalizada	Metilación de islas <i>CpG</i> promotoras de genes
Aneuploidía o poliploidía	Diploidía	Alteraciones epigenéticas
Colon izquierdo	Colon derecho	Colon derecho
Bien diferenciados	Pobrementemente diferenciados	Pobrementemente diferenciados
No infiltración linfocítica	Infiltración linfocítica	
Raramente mucinosos	Frecuentemente mucinosos	
Peor pronóstico	Mejor pronóstico	

Tabla I.4. Características diferenciadoras de los CCR generados a partir de las distintas vías de carcinogénesis.

3.3. Clasificación molecular del CCR

Inicialmente, las vías supresora y mutadora fueron consideradas mutuamente excluyentes, barajando únicamente la existencia de dos clases de tumores: aquellos con INC y estabilidad de microsatélites (INC+IMS-), y aquellos con estabilidad cromosómica e IMS (INC-IMS+). Estudios posteriores demostraron que más del 50% de los tumores IMS- también eran INC-, y que una pequeña porción de los tumores IMS+ eran INC+ (Georgiades *et al.* 1999, Tang *et al.* 2004), sugiriendo una nueva estratificación del CCR en cuatro genotipos bien diferenciados: IMS+INC+ (3%), IMS+INC- (11%), IMS-INC+ (48%), IMS-INC- (38%) (Goel *et al.* 2003).

Poco más tarde se demostró el solapamiento entre la vía CIMP y las vías INC e IMS (Figura I.9), por lo que en los últimos años está adquiriendo especial importancia una renovada forma de clasificación basada en la superposición de las tres vías. Partiendo del estado IMS y CIMP, parece probable la existencia de al menos cuatro grupos homogéneos con características anatomoclínicas y moleculares diferentes, en los que además parece haber correlación entre las categorías IMS y CIMP (tumores *IMS-High* se asocian mayoritariamente con genotipos *CIMP-High* y tumores *IMS-Low* se asocian mayoritariamente con genotipos *CIMP-Low/0*) (Figura I.9) (Ogino y Goel, 2008).

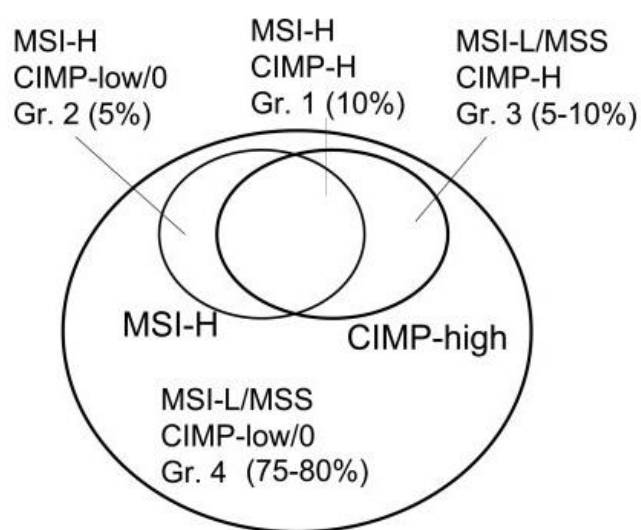


Figura I.9. Solapamientos entre los subtipos de CCR en función del estatus IMS y CIMP (Ogino y Goel, 2008).

GRUPO 1: *IMS-High, CIMP-High* → Incluye la hipermetilación de *MLH1*.

GRUPO 2: *IMS-High, CIMP-Low/0* → Incluye los tumores asociados al SL.

GRUPO 3: *IMS-Low/EMS, CIMP-High*.

GRUPO 4: *IMS-Low/EMS, CIMP-Low/0* → Incluye los pacientes con PAF.

3.3.1. Tumores MACS (*Microsatellite and Chromosomal Stable*)

Se define con las siglas MACS al conjunto de tumores *IMS-* que, debiendo presentar *INC+*, no lo hacen (Osorio *et al.* 2014). Son por tanto tumores *INC-IMS-* que tampoco pertenecen estrictamente a la vía serrada. Representan cerca del 40% de los CCR esporádicos, y sus diferentes implicaciones clínicas y pronósticas

podrían ser reflejo de vías de carcinogénesis todavía no identificadas (Osorio *et al.* 2014).

Aunque presentan algunos rasgos similares a los descritos en la vía mutadora, los MACS constituyen un grupo de tumores con características particulares (Fadhil *et al.* 2014). Son tumores más frecuentemente diagnosticados en población joven, con predilección por el colon izquierdo o el recto, y asociados a un peor pronóstico (Osorio *et al.* 2014). Algunos autores han reportado longitudes teloméricas mayores que en sus análogos IMS-INC+, y baja la tasa de mutaciones en *p53* (Boardman *et al.* 2013). No suelen mostrar ausencia de expresión de *MLH1* ni mutaciones en *BRAF*, y aunque parecen asociar un genotipo de metilación bajo, por el momento no existe unanimidad al respecto (Silver *et al.* 2012).

3.4. CCR en el adulto joven

El CCR de inicio precoz constituye una entidad poco frecuente que representa el 2-8% de todos los CCR (Stigliano *et al.* 2014). Aunque la edad de corte para definir este grupo de tumores varía en función de los estudios, habitualmente se limita a los diagnósticos efectuados antes de la quinta década de vida. Durante los últimos años, la incidencia de CCR en individuos menores de 50 años parece estar aumentando, dato que contrasta con la progresiva disminución de los diagnósticos en personas de mayor edad. En EE.UU entre los años 1992 y 2005 la tasa de aumento anual fue de un 1,5% para los hombres y de un 1,6% para las mujeres (Stigliano *et al.* 2014). Probablemente, ello sea un fiel reflejo de la importancia que ejercen los programas de cribado poblacional en el diagnóstico de las personas.

Pese a que el diagnóstico a edades tempranas suele ser sugestivo de la existencia de un componente hereditario (generalmente vinculado al SL), el CCR en el adulto joven constituye una entidad heterogénea que también incluye casos esporádicos. De hecho, la proporción de tumores IMS+ en población joven oscila entre el 19,7% y el 41% (Perea *et al.* 2014), y sin embargo, el SL únicamente justifica la tercera parte de ellos (Kirzin *et al.* 2014). Las características clinicopatológicas de los tumores IMS+ no vinculados a factores genéticos son similares a las descritas para el SL: inicio precoz, predominio por el colon derecho, mayor frecuencia de tumores sincrónicos y/o metacrónicos, y mayor proporción

de CCR pobremente diferenciados, mucinosos y con células en “anillo de sello” (Osorio *et al.* 2014).

El CCR en jóvenes en los que no se identificó ningún factor genético conocido parece constituir una entidad específica y claramente distinta dentro de la enfermedad. Un informe basado en la experiencia de dos registros americanos de cáncer (Programa Nacional de Registros del Cáncer [NPCR, *National program of cancer registries*] y SEER), destacó las implicaciones clinicopatológicas asociadas al CCR en adultos jóvenes y ancianos (diagnóstico a edad ≥ 70 años), subrayando la existencia de comportamientos biológicos diferentes (Fairley *et al.* 2006). Desde un punto de vista general, el CCR en el adulto joven presenta características más desfavorables que sitúan a la variable “edad precoz” como un factor inevitablemente asociado a un peor pronóstico, pues suelen poseer un fenotipo invasivo que convierte a la metástasis en un hallazgo más frecuente en el momento del diagnóstico. Además, son comunes los bajos grados de diferenciación, la presencia de mucina y el mayor porcentaje de células en “anillo de sello” (Wang *et al.* 2015). Frecuentemente asocian tumores sincrónicos y/o metacrónicos, un mayor desarrollo de pólipos durante el seguimiento y una mayor tendencia a la agregación familiar. Las series publicadas difieren en cuanto a su localización, y mientras unas apuntan hacia el predominio en el colon izquierdo y el recto, otras insisten en la predilección por el colon derecho, posiblemente por la mayor inclusión de pacientes con antecedentes familiares en estos últimos (Osorio *et al.* 2014).

Algunos autores han sugerido diferencias en los mecanismos moleculares que subyacen tras la edad de inicio de la enfermedad, pues se ha visto que los factores desencadenantes de la inestabilidad genómica son diferentes en función de la misma. Así, pese a que la IMS en población joven suele deberse a mutaciones en alguno de los genes que componen el sistema MMR, en población anciana suele estar relacionada con fenómenos epigenéticos (Perea *et al.* 2011).

En el otro extremo se encuentran los tumores de inicio temprano con INC y EMS, un grupo heterogéneo caracterizado por edades de diagnóstico ligeramente superiores, un menor predominio de la localización derecha, un menor porcentaje de tumores sincrónicos y/o metacrónicos y un mayor porcentaje de diagnósticos

en fases avanzadas. En comparación con los tumores EMS de los ancianos, los adultos jóvenes muestran predominio de la localización izquierda y el recto, mayor presencia de mucina o células en “anillo de sello”, menores tasas de mutación en *BRAF* y frecuencias de alteraciones epigenéticas mucho más bajas (Kirzin *et al.* 2014). Además, se han observado diferencias respecto a los genotipos tumorales predominantes en cada población, y mientras los tumores IMS-INC- (MACS) prevalecen entre las personas jóvenes, los tumores IMS-INC+ lo hacen entre las ancianas (Boardman *et al.* 2007).

Tomando como premisa estas diferencias, parece razonable pensar que los tumores de inicio temprano y tardío puedan tener diferentes bases moleculares, que quizá también impliquen vías de carcinogénesis todavía no caracterizadas (Perea *et al.* 2010). De ser esto cierto, las nuevas vías podrían incluir determinados *loci* específicamente alterados en función de la edad de diagnóstico, que podrían identificarse mediante el estudio detallado de los cromosomas. Herramientas como la hibridación genómica comparada (CGH, *Comparative genomic hybridization*) serían de gran utilidad para este fin, no sólo por su contribución a la caracterización de dichas regiones, sino porque además permitirían la validación de nuevos genes causantes de cáncer en pacientes sin síndromes hereditarios conocidos.

4. ALTERACIONES EN LA DOSIS GÉNICA Y CCR

Las alteraciones en el número de copias (*copy number variations* [CNV], *chromosome copy number abnormalities* [CNA] o *DNA copy number aberrations* [DCNA]), son una forma de alteración cromosómica estructural en la que una región de ADN posee un número de copias diferente al de un genoma de referencia. Son alteraciones típicas de la inestabilidad genómica que a menudo albergan genes implicados en la formación y progresión tumoral (Tattini *et al.* 2015).

Aunque el CGH convencional (Kallioniemi *et al.* 1992) constituye una herramienta muy útil para llevar a cabo la investigación de CNV (Kallioniemi *et al.* 1994), su resolución resulta insuficiente cuando se pretenden evaluar cambios submicroscópicos. Esta limitación queda solventada cuando la metodología CGH se

combina con la tecnología de *microarrays*, dando lugar a los *arrays*-CGH (a-CGH) (Pinkel *et al.* 1998).

4.1. Arrays-CGH

Los a-CGH permiten identificar y analizar ganancias y/o pérdidas de material genético en una muestra de ADN sin necesidad de pasar por un cultivo celular previo al análisis. Desde su desarrollo a finales de la década de los 90 han sido ampliamente utilizados en la búsqueda de CNV, pues su rapidez, cobertura y alta resolución, hacen de ellos una técnica imprescindible en el estudio de los desequilibrios genómicos.

La metodología a-CGH consigue examinar de forma simultánea miles de localizaciones cromosómicas puntuales con una elevada resolución (1-2Mb), posibilitando la detección de CNV a lo largo del genoma completo de los tumores sólidos (Pollack *et al.* 1999). Por este motivo, su aplicación en el estudio del CCR supone un pilar fundamental para la identificación de los posibles defectos genéticos responsables de los diferentes rasgos fenotípicos asociadas a la edad, así como para el descubrimiento de potenciales nuevas dianas terapéuticas (Labots *et al.* 2014).

El análisis de a-CGH se basa en la hibridación de cantidades iguales de dos especímenes de ADN genómico marcado fluorescentemente: uno procedente de una muestra problema (tumor, habitualmente marcado en color verde) y otro procedente de una muestra de referencia (normal, habitualmente marcado en color rojo). La hibridación tiene lugar sobre una matriz inmovilizada en un soporte físico (generalmente de vidrio) (Figura I.10), compuesta por fragmentos del ADN genómico de interés (*target*) en forma de cromosomas artificiales de levaduras (YAC, tamaño de 0.2-2Mb), cromosomas artificiales bacterianos (BAC, tamaño de 75-200kb), cromosomas artificiales de bacteriófagos P1 (PAC, tamaño de 75-200kb), cósmidos (tamaño de 30-40kb), fósidos (tamaño de 40-50kb) u oligonucleótidos (tamaños inferiores a 50pb).

Tras la hibridación existe una correlación entre el número de copias de la secuencia a analizar y las intensidades de fluorescencia obtenidas, por lo que mediante el empleo de un *software* adecuado se puede conocer la ganancia (verde),

pérdida (rojo), o igualdad (amarillo) de material genético en la muestra problema con respecto a la de referencia (Figura I.10).

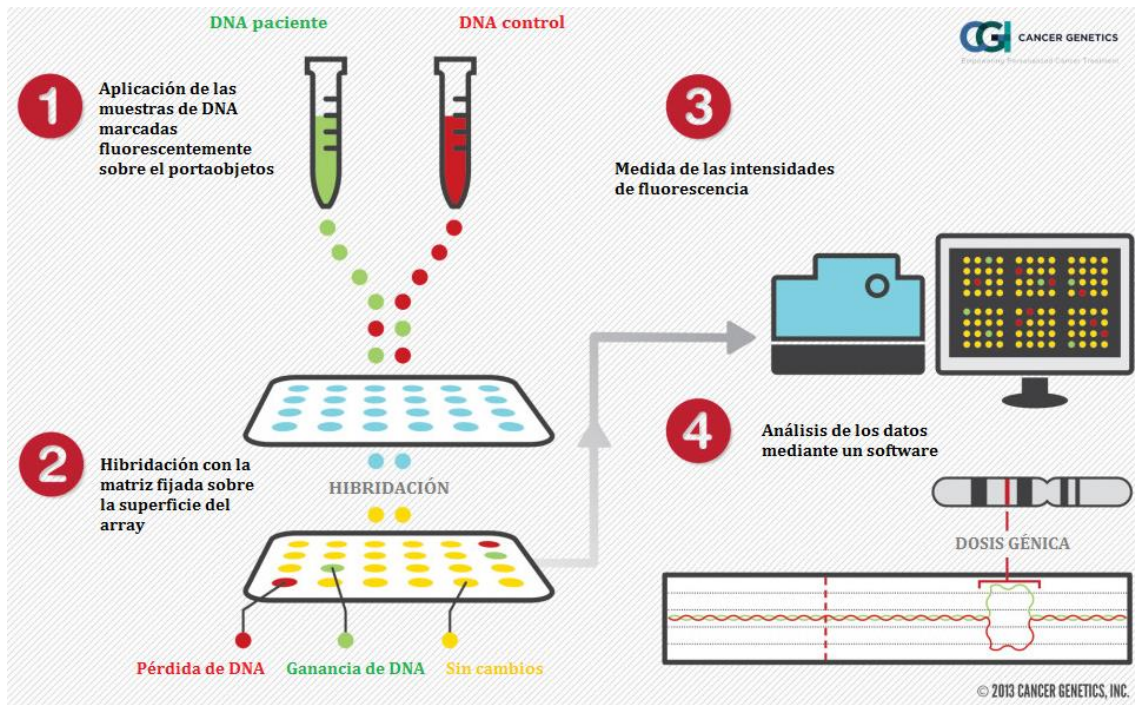


Figura I.10. Esquema de los pasos que componen la realización de un análisis de a-CGH. Imagen modificada de www.cgimatba.com. ©Cancer Genetics, INC.

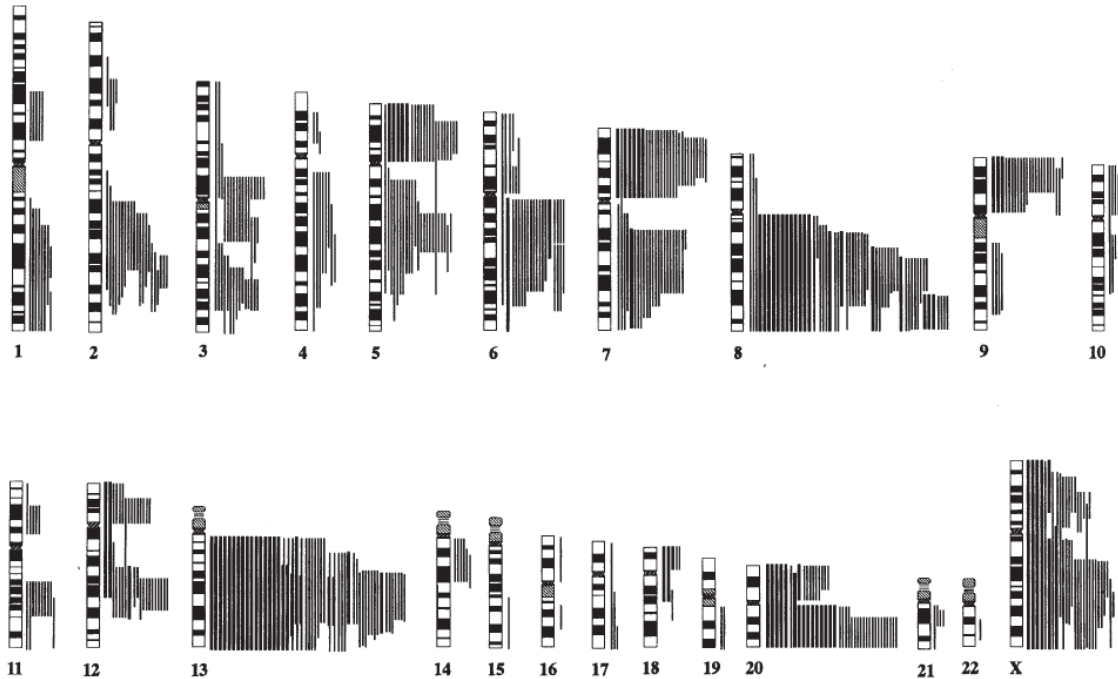
4.2. Alteraciones recurrentes en el CCR

La incorporación de herramientas como el CGH al estudio del CCR ha permitido identificar diferentes regiones cromosómicas y vías metabólicas (WNT, RAS-MAPK, PI3K, TGF- β , P53) frecuentemente alteradas en la enfermedad (Arvelo *et al.* 2015, Bass *et al.* 2011). Se ha visto que algunas de estas regiones aparecen afectadas de forma muy repetida, por lo que han sido denominadas “regiones recurrentemente alteradas” o RAR (de sus siglas en inglés *Recurrently altered regions*). La elevada frecuencia de aparición de algunas de estas regiones ha llevado a sugerir su utilidad como marcadores pronósticos, sin embargo, a día de hoy continúa sin existir una visión integrada acerca de la significación que estos cambios pueden ejercer sobre la carcinogénesis colorrectal.

La Figura I.11 muestra en forma de ideograma las regiones cromosómicas alteradas con mayor frecuencia dentro del CCR. Los resultados corresponden a un análisis llevado a cabo mediante CGH en 73 individuos diagnosticados de CCR a una edad promedio de 64 años (Liu *et al.* 2007). Como puede observarse, la falta de

aleatoriedad en la distribución de las RAR queda evidenciada por la existencia de zonas más propensas a la acumulación de cambios, que algunos autores han denominado “regiones calientes” (Kim *et al.* 2006).

(A)



(B)

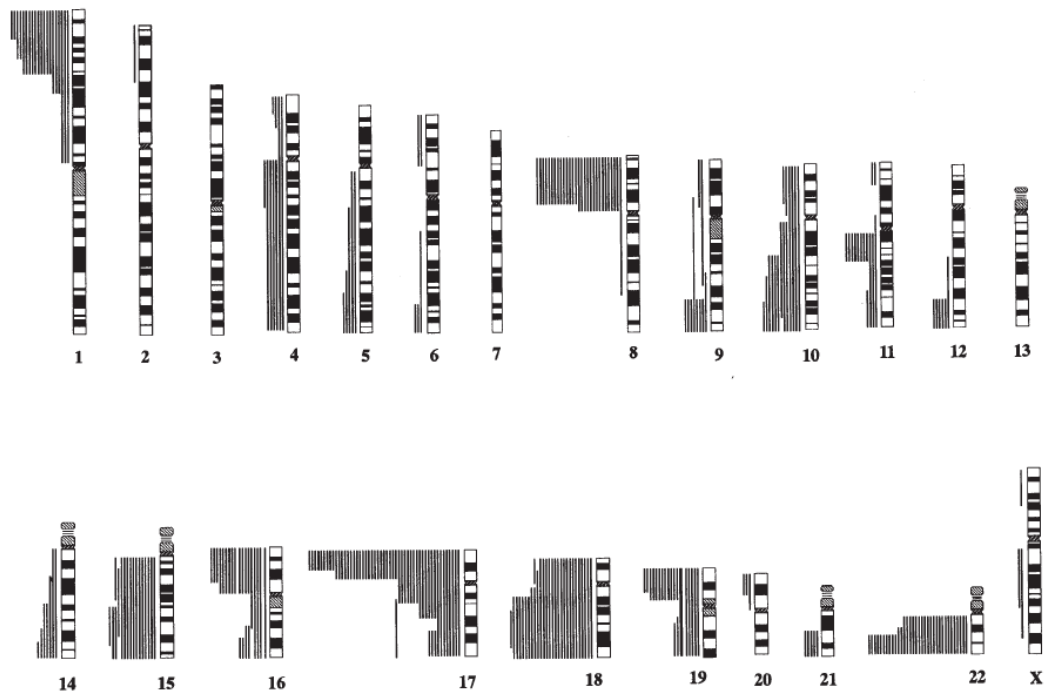


Figura I.11. Frecuencia de alteración de las distintas regiones cromosómicas obtenidas mediante CGH en 73 pacientes diagnosticados de CCR. La parte superior corresponde a las ganancias (A) y la inferior a las pérdidas (B) (Liu *et al.* 2007).

Las alteraciones encontradas con mayor frecuencia en el CCR incluyen ganancias de material en 7p (que contiene *EGFR*), 8q (que contiene *MYC*), 13q y 20q (que contiene *ZNF217*, *CYP24* y *Aurora2Kinasa*), y pérdidas en 8p (que contiene *FGFR1*), 17p (que contiene TP53) y 18p/q (que contienen *SMAD4* y *DCC*, respectivamente). De forma menos recurrente también se han descrito ganancias en 1q, 3p/q, 7q, 11q y 20p, y pérdidas en 4p, 5q, 6q, 9p/q, 14q, 15q y 21q (Hughes *et al.* 2006, Kim *et al.* 2006, Nakao *et al.* 2004, Nakao *et al.* 2011, Pouligiannis *et al.* 2010). En un estudio más reciente y completo sobre CCR llevado a cabo por *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), se identificaron 28 regiones frecuentemente delecionadas y 17 regiones significativamente amplificadas en la enfermedad, entre las que se incluyeron las pérdidas en 18p/q (presentes en el 66% de los tumores) y las ganancias en 17p/q (presentes en el 56% de los tumores) (Cancer Genome Atlas Network, 2012) (Tabla I.5).

Regiones frecuentemente delecionadas en CCR según TCGA			
Citobanda	Región	Nº de genes	Genes candidatos
1p13.1	95482528-119852137	155	
1p33	48965982-50352419	1	<i>AGBL4</i>
1p36.11	23114189-29091503	109	
2q37.3	223626608-242951149	152	
3p14.2	59009803-61522370	1	<i>FHIT</i>
3q26.31	175482500-178221491	1	<i>NAALAD2</i>
4p16.1	1-9439317	93	
4q22.1	91092757-91979209	1	<i>FAM190B</i>
4q35.1	179148277-186744180	25	<i>CASP3</i>
5q11.2	58296055-59035772	1	<i>PDE4D</i>
5q22.2	111776899-112346826	3	<i>APC</i>
6p25.3	1553836-2569051	2	<i>GMDS</i>
6q26	161613089-163073197	1	<i>PARK2</i>
7q31.1	110512908-111163100	1	<i>LRRN3</i>
8p23.2	1-6255647	11	
10q11.23	52727599-53131580	1	<i>PRKG1</i>
10q23.2	89302988-90338798	4	<i>PTEN</i>
10q25.2	114195084-115436489	4	<i>TCF7L2</i>
11q22.3	104476434-113438897	60	<i>ATM</i>
15q12	1-43105206	161	
15q21.1	40284212-45800187	55	

Regiones frecuentemente deletcionadas en CCR según TCGA (Continuación)			
Citobanda	Región	Nº de genes	Genes candidatos
15q22.33	64854850-65281876	1	<i>SMAD3</i>
16p13.3	5085718-7704198	1	<i>A2BP1</i>
16q23.1	76686559-78186084	1	<i>WWOX</i>
17p12	10681334-12512565	3	<i>MAP2K4</i>
18q21.2	46600023-46959369	3	<i>SMAD4</i>
20p12.1	14250876-15984135	2	<i>MACROD2</i>
21q21.1	1-25870718	21	
Regiones frecuentemente amplificadas en CCR según TCGA			
Citobanda	Región	Nº de genes	Genes candidatos
5p12	45462158-45636350	1	<i>HCN1</i>
6p21.1	41642900-44525459	65	<i>VEGFA</i>
8p11.21	41591746-42484529	11	
8p12	38258898-38345433	1	<i>WHSC1L1</i>
8q24.21	128222988-129039208	1	<i>MYC</i>
10q22.3	79223568-82887959	21	
11p15.5	2114098-2212856	3	<i>IGF2</i>
12p13.32	2980135-4569646	12	<i>CCND2</i>
13q12.13	26419847-26442633	0	
13q12.2	26694966-27905729	13	
13q22.1	72540493-72940621	1	<i>KLF5</i>
16p11.2	30258263-30878942	27	
17q12	35058337-35173221	7	<i>ERBB2</i>
17q24.1	60636301-64119752	21	<i>AXIN2</i>
20p11.23	20133875-20492135	3	
20q11.21	29339506-29741647	11	<i>BCL1L1</i>
20q13.12	41763214-42791312	14	<i>HNF4A</i>

Tabla I.5. Listado de las 45 regiones relevantes en CCR según *The Cancer Genome Atlas* (TCGA).

4.3. Perfil genómico del CCR de inicio precoz

El mayor conocimiento de la historia natural del CCR, ha llevado a desarrollar diferentes líneas de investigación focalizadas en la mejora de la caracterización de esta enfermedad. Se ha visto que los tumores diagnosticados en personas jóvenes parecen estar asociados a fenotipos más agresivos que sus homólogos en ancianos, y dado que el desarrollo tumoral es fruto de la acumulación de múltiples alteraciones genéticas, resulta lógico suponer que tales diferencias puedan tener

su origen en desviaciones ocurridas durante alguna etapa de su proceso de formación. Mediante la comparación de los perfiles de inestabilidad genómica manifestados por tumores cuya única diferencia conocida sea la edad de inicio de la enfermedad, se podrían encontrar discrepancias que finalmente confirmen o desmientan la teoría que sugiere la implicación de distintos mecanismos de carcinogénesis en función de dicha edad. Algunos autores ya están trabajando en este aspecto y han presentado resultados que parecen avalar la hipótesis, sugiriendo como primera aproximación una discrepancia del 3,2% entre los perfiles genómicos de ambas poblaciones (Berg *et al.* 2010) (Figura I.12).

Aunque la existencia de CNV específicamente relacionadas con la edad de diagnóstico parece estar confirmada, actualmente no existe unanimidad en cuanto a la localización de las mismas, hecho posiblemente derivado de la baja incidencia que presenta el CCR a edades inferiores o iguales a los 45 años (2-8%) (Stigliano *et al.* 2014). Por el momento, los escasos trabajos que han abordado el CCR en población joven resultan contradictorios, y mientras que unos apuntan hacia mayores frecuencias de delección en 14q (Mourra *et al.* 2007), otros no confirman este hallazgo pero reportan mayores frecuencias de ganancias en 2q, 10q y 19q, y de pérdidas en 1p/q, 2q, 4p/q, 10p y 19p (Berg *et al.* 2010).

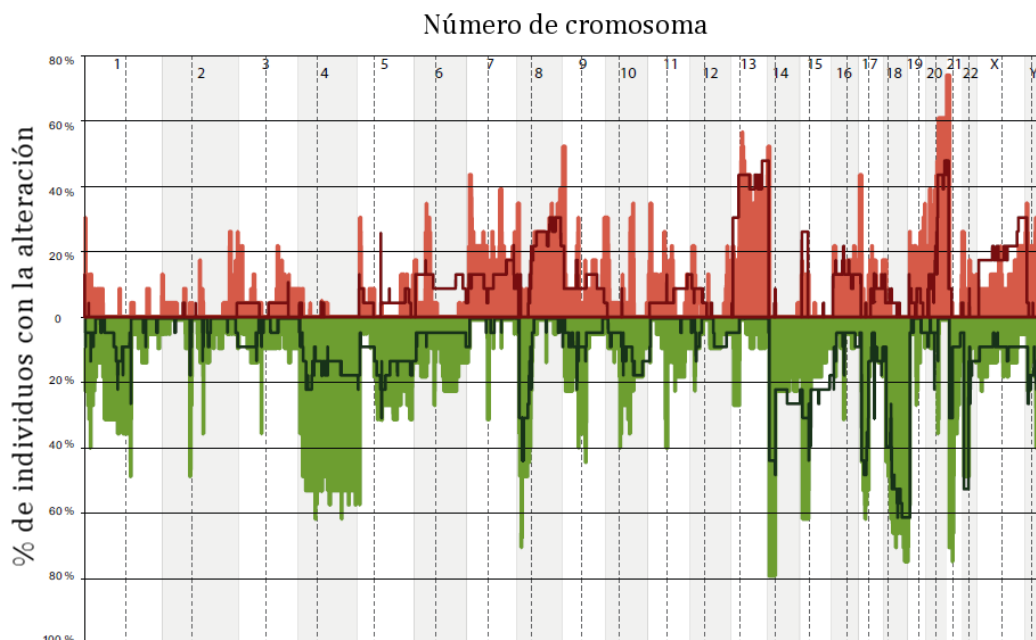


Figura I.12. Perfiles genómicos obtenidos mediante a-CGH en 40 pacientes con CCR. Los colores sólidos corresponden al grupo de tumores de inicio temprano, mientras que la línea negra corresponde a los de inicio tardío. En color rojo se representan las ganancias y en verde las pérdidas. Los trazos discontinuos indican la posición de los centrómeros. Imagen modificada de Berg *et al.* 2010.

La evidencia acumulada aporta indicios que otorgan credibilidad a la suposición de que los diferentes fenotipos observados en personas jóvenes y ancianas puedan tener su origen en mecanismos moleculares también diferentes: por un lado, ambos tumores discrepan en cuanto a sus características clinicopatológicas, y por el otro, la carcinogénesis asociada a tumores esporádicos de inicio temprano parece implicar un subtipo de la vía CIN, sin participación de la vía CIMP y ausencia de mutación en *BRAF* (Kirzin *et al.* 2014). De ser esto así, la comparación y búsqueda de diferencias entre ambos perfiles genómicos y posterior indagación de los genes albergados en las regiones diferenciales, podría proporcionar información acerca de potenciales nuevas vías de carcinogénesis. Por ello, se requieren estudios más exhaustivos que permitan ahondar en este campo tan poco explorado y ofrezcan una mayor comprensión del desarrollo de la enfermedad. Sólo así se podrán identificar nuevas dianas terapéuticas que conviertan la medicina individualizada en una realidad cada día más cercana.

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

A. JUSTIFICACIÓN

El CCR se origina como resultado de la acumulación de diferentes eventos moleculares que conducen a la pérdida del control sobre la proliferación, diferenciación y/o supervivencia celular. La existencia de diferentes rasgos fenotípicos asociados al CCR en el adulto joven (≤ 45 años) y en el anciano (≥ 70 años), ha llevado a barajar la hipótesis de que tras ellos puedan subyacer diferentes mecanismos moleculares de carcinogénesis.

Pese a que los estudios genéticos realizados en tejido tumoral y en las lesiones precursoras han conseguido mejorar la caracterización del perfil molecular del CCR, la base molecular de la enfermedad en personas jóvenes continúa siendo poco conocida. Aunque se han sugerido diferencias en los perfiles genómicos de los tumores con diferente edad de diagnóstico, esas diferencias aún no están bien establecidas ni se conocen sus implicaciones.

B. OBJETIVOS

Partiendo de estos antecedentes, y teniendo en cuenta la relevancia que los cambios en la dosis génica ejercen sobre la carcinogénesis, nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

1. Realizar un **análisis descriptivo comparativo** de las características clínicas, anatomopatológicas, evolutivas y familiares asociadas al CCR de los adultos jóvenes y ancianos.
2. Evaluar la **frecuencia** de tumores **IMS** en cada grupo de edad, así como la proporción de sujetos con alteraciones en los genes relacionadas con el **SL** (*MLH1*, *MSH2* y *MSH6*) en cada uno de ellos.
3. Caracterizar los **perfiles de alteración genómica** presentes en las neoplasias colorrectales de jóvenes y ancianos mediante *arrays* de CGH, para:
 - a. Describir los **patrones generales** de INC asociados a cada población.

- b. Definir las regiones cromosómicas **recurrentemente alteradas** en cada población.
 - c. Definir las regiones cromosómicas **compartidas** por las dos poblaciones.
 - d. Definir las regiones cromosómicas **diferencialmente alteradas** en las dos poblaciones.
4. Determinar si el patrón de alteraciones **guarda relación** con las **características clínicas** de los pacientes.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO

1.1. Procedencia y criterios de inclusión

Los pacientes incluidos en esta memoria fueron identificados a partir del registro de tumores del Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid). Se seleccionaron un total de 185 individuos diagnosticados de adenocarcinoma colorrectal primario entre enero de 2002 y diciembre de 2009, todos ellos confirmados mediante análisis histológico de la biopsia o de la pieza quirúrgica. Los pacientes fueron seleccionados consecutivamente en orden de aparición y divididos en dos grupos de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión:

- ❖ Grupo de pacientes jóvenes: diagnóstico de CCR primario a una edad inferior o igual a 45 años.
- ❖ Grupo de pacientes ancianos: diagnóstico de CCR primario a una edad superior o igual a 70 años.

Fueron excluidos del estudio los CCR metacrónicos, las poliposis familiares y la enfermedad inflamatoria intestinal en cualquiera de sus dos vertientes (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa).

1.2. Recogida de información

Para cada uno de los casos seleccionados se recogió información referente a varios aspectos. Los datos recopilados incluyeron:

- ❖ Datos clínicos:
 - Edad en el momento del diagnóstico.
 - Sexo.
- ❖ Datos clínico-patológicos:
 - Localización tumoral:
 - Derecha o proximal (ciego, colon ascendente, ángulo hepático y primera mitad del colon transversal).
 - Izquierda o distal (segunda mitad del colon transversal, ángulo esplénico, colon descendente y sigma).

- Recto o unión rectosigmoidea.
 - Histología: adenocarcinoma o pólipo malignizado (adenoma tubular, adenoma tubulovelloso, adenoma vellosos).
 - Grado de diferenciación: bajo, moderado, alto.
 - Producción de moco: tumor mucosecretor o con presencia de células en “anillo de sello”.
 - Estadificación TNM: los pólipos malignizados se consideraron estadio I.
- ❖ Datos evolutivos:
- Supervivencia total (ST): tiempo transcurrido (en meses) desde la cirugía hasta el fallecimiento o hasta la última revisión
 - Supervivencia libre de enfermedad (SLE): tiempo transcurrido (en meses) desde la cirugía hasta la aparición de una recaída, desarrollo de metástasis tras una remisión completa, o fallecimiento motivado por el cáncer. Se asignó el valor cero a los individuos que no presentaron remisión completa en ningún momento.
 - Fallecimiento: consecuencia o no del cáncer.
 - Historia de pólipos: tipo (adenomatosos, hiperplásicos o mixtos).
 - Historia de otros CCR sincrónicos o metacrónicos.
- ❖ Información familiar: siempre que fue posible la anamnesis incluyó un mínimo de tres generaciones. Todos pacientes, o un familiar de primer grado en caso de fallecimiento del probando, fueron informados de los objetivos del estudio, del alcance del mismo y firmaron el consentimiento informado (Anexo 1). Los individuos fueron clasificados en tres grupos en base a su árbol genealógico:
- Sospecha de SL: cuando cumplían los criterios clínicos de Ámsterdam II.
 - Agregación familiar: cuando existía historia familiar de neoplasias asociadas al SL, sin llegar a cumplir los criterios de Ámsterdam II.
 - Esporádico: cuando el caso índice era el único miembro de la familia con diagnóstico de CCR y no existían antecedentes familiares de neoplasias asociadas al SL.

2. MUESTRAS

2.1. Obtención

La cirugía constituyó el método de obtención de la muestra en la mayor parte de los pacientes. Únicamente se careció de pieza quirúrgica en aquellos individuos que presentaron displasia severa con carcinoma “*in situ*”, y en aquellos en los que el tumor fue considerado irresecable (estadio IV). Las muestras fueron enviadas al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid), donde se realizó el análisis histológico, fijación y posterior inclusión en parafina del tejido extirpado.

Aquellos casos en los que el estudio de IMS resultó positivo o en los que el paciente cumplía los criterios clínicos de Ámsterdam II para el SL, se obtuvo una muestra de sangre periférica (15 ml en tubo de EDTA) para el despistaje de mutaciones en los genes MMR (*MLH1*, *MSH2* y *MSH6*). En caso de fallecimiento del probando, la muestra de sangre recogida correspondió al familiar más cercano que hubiera desarrollado un CCR (o en su defecto una neoplasia Lynch) a menor edad.

2.2. Tejido incluido en parafina

Con el propósito de evitar una contaminación con células de origen no tumoral, las muestras fueron sometidas a un análisis histológico mediante tinción con hematoxilina-eosina y posterior inspección microscópica. Únicamente se seleccionaron aquellas muestras en las que el examen histológico demostró un componente tumoral superior al 70%.

2.2.1. Tinción hematoxilina-eosina

Pasos del procedimiento:

- ❖ Cortar el tejido parafinado con la ayuda de un microtomo (secciones de aproximadamente 3 µm de grosor).
- ❖ Incubar el corte 1 hora a 70°C.
- ❖ Desparafinar con xilol durante 2 minutos, dos veces.
- ❖ Hidratar 2 minutos con etanol absoluto y otros 2 minutos con etanol al 95%.

- ❖ Lavar 2 minutos con agua destilada.
- ❖ Teñir con hematoxilina de Mayer durante 15 minutos.
- ❖ Lavar 2 minutos con agua destilada.
- ❖ Teñir 2 minutos con eosina.
- ❖ Eliminar los restos de eosina con etanol al 70%.
- ❖ Deshidratar mediante pasos sucesivos con etanol al 95% (30 segundos), etanol absoluto (2 minutos) y xilol (2 minutos, dos veces).
- ❖ Montar el cubre con Eukitt o DPX.

2.2.2. Extracción de ADN a partir de muestras parafinadas

Pasos del procedimiento:

- ❖ Recoger 3 cortes de tejido (aproximadamente de 10 μm de grosor) en un tubo de 1,5 ml.
- ❖ Añadir 1000 μl de xilol y agitar en vórtex. Incubar 5 minutos a 65°C.
- ❖ Centrifugar a 12.000 rpm y temperatura ambiente durante 10 minutos. Eliminar el sobrenadante.
- ❖ En caso de persistir restos de parafina, repetir los dos pasos anteriores.
- ❖ Añadir 1000 μl de etanol absoluto para eliminar los restos de xilol y mezclar con vórtex. Incubar 5 minutos a 65°C.
- ❖ Centrifugar a 12.000 rpm y temperatura ambiente durante 10 minutos. Eliminar el sobrenadante.
- ❖ Repetir el lavado con etanol al 50%. Incubar 5 minutos a 65°C.
- ❖ Centrifugar a 12.000 rpm y temperatura ambiente durante 10 minutos. Eliminar el sobrenadante y dejar secar hasta que se hayan evaporado los restos de etanol.
- ❖ Resuspender el precipitado en 400 μl de una disolución reguladora compuesta por KCl 50mM, Tris-HCl 10mM, MgCl_2 2,5mM, *Nonidet* P-40 0,45% y Tween-20 4,5%).

- ❖ Añadir 40 µl de Proteinasa K (10mg/ml), mezclar con vórtex e incubar a 55°C hasta que el tejido esté completamente digerido.
- ❖ Volver a agitar con vórtex y añadir 440 µl de mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico en proporciones 25:24:1.
- ❖ Pasar la mezcla a una columna de purificación *Phase Lock Gel™ Light* (Eppendorf AG, Hamburg, Alemania) y centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos.
- ❖ Recuperar la fase acuosa (superior) y añadir 440 µl de mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico en proporciones 25:24:1. Pasar la mezcla a una nueva columna de purificación *Phase Lock Gel™ Light* (Eppendorf AG, Hamburg, Alemania) y centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos.
- ❖ Recuperar la fase acuosa y añadir 440 µl de cloroformo. Pasar la mezcla a una nueva columna de purificación *Phase Lock Gel™ Light* (Eppendorf AG, Hamburg, Alemania) y centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos.
- ❖ Recuperar la fase acuosa y añadir 1 volumen de acetato sódico 3M por cada 9 volúmenes de fase acuosa. Mezclar y añadir 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Dejar precipitar el ADN durante toda la noche a -20°C.
- ❖ Centrifugar a 12.000 rpm y 4°C durante 15 minutos. Retirar el sobrenadante.
- ❖ Lavar con 1 ml de etanol frío al 75% y centrifugar a 12.000 rpm y 4°C durante 10 minutos.
- ❖ Retirar el sobrenadante y resuspender el ADN en 30 µl de agua destilada estéril.

2.3. Sangre periférica

La extracción de ADN genómico fue efectuada tanto de forma manual, como de forma automatizada. Ambos protocolos se detallan a continuación.

2.3.1. Protocolo manual de extracción de ADN en sangre

Se empleó el kit *DNA purification system Puregene™* (Gentra Systems, Minneapolis, MN). Pasos del procedimiento:

- ❖ Añadir 10 ml de sangre a un tubo Falcon de 50 ml que contenga 30 ml de *RBC Lysis Solution*. Homogeneizar e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- ❖ Centrifugar a 3.000 rpm y 4°C durante 15 minutos. Decantar el sobrenadante dejando el *pellet* de leucocitos en un volumen de 200-400 µl de líquido residual.
- ❖ Agitar en vórtex para resuspender las células.
- ❖ Añadir 10 ml de *Cell Lysis Solution + RNase A Solution*. Homogeneizar e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- ❖ Centrifugar a 3.000 rpm y 4°C durante 15 minutos.
- ❖ Añadir 3,5 ml de *Protein Precipitation Solution* a las células lisadas y agitar en vórtex durante 20 segundos.
- ❖ Centrifugar a 3.000 rpm y 4°C durante 15 minutos.
- ❖ Desechar el *pellet* de proteínas y pasar el sobrenadante (contiene la suspensión de ADN) a un tubo Falcon estéril de 50 ml que contenga 10 ml de isopropanol al 100%.
- ❖ Invertir el tubo un mínimo de 50 veces. Observar la aparición de la madeja de ADN.
- ❖ Tomar la madeja con ayuda de una pipeta Pasteur esterilizada y pasarla por dos tubos que contengan un pequeño volumen de etanol frío al 70%.
- ❖ Dejar secar durante 5 minutos para eliminar los restos del etanol.
- ❖ Resuspender en 30 µl de agua destilada estéril.
- ❖ Agitar suavemente durante 2 horas a 37°C para conseguir la correcta disolución del ADN.

2.3.2. Protocolo automatizado de extracción de ADN en sangre

Se empleó el sistema *Magna Pure LC* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) en el que a partir de 1 ml de sangre periférica, el sistema añade:

- ❖ 0,115 ml de solución de Proteinasa K (digestión de proteínas).

- ❖ 0,84 ml de tampón de lisis-unión (favorece la lisis celular y genera las condiciones salinas adecuadas para los pasos posteriores).
- ❖ 0,54 ml de reactivo MGP (retiene el ADN en sus partículas magnéticas).
- ❖ 2,42 ml de “Tampón de lavado I” (elimina todo lo que no se haya unido a las partículas magnéticas del reactivo MGP).
- ❖ 1,28 ml de “Tampón de lavado II” (retira restos celulares y reduce la concentración salina).
- ❖ 0,84 ml de “Tampón de lavado III” (elimina restos de etanol).
- ❖ 200 μ l de “Tampón de disolución” previamente calentado (para resuspender el ADN purificado).

2.4. Valoración de la calidad y cantidad del ADN obtenido

Concluida la extracción de ADN, se procedió a evaluar su calidad y cantidad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Pasos del procedimiento:

- ❖ Preparación del gel de agarosa al 1%:
 - Colocar 1,5 g de agarosa (Agarosa Media, Pronadisa, Laboratorios Conda, Madrid) en un matraz de 250 ml y añadir 150 ml de tampón TBE 1x (Tris, ácido bórico, EDTA). Llevar a ebullición en un microondas hasta que se disuelva la agarosa.
 - Añadir 3 μ l de una disolución de bromuro de etidio (10mg/ml).
 - Verter la mezcla TBE 1x/agarosa/bromuro de etidio sobre una bandeja sellada por los extremos con cinta adhesiva y colocar un peine cerca del borde. Dejar solidificar durante 30 minutos.
 - Retirar la cinta adhesiva y el peine. Colocar el gel en una cubeta de electroforesis horizontal (Laboratorios Bio-Rad, High Wycomb, Gran Bretaña) y cubrirlo completamente con tampón TBE 1x.
- ❖ Migración electroforética:
 - Cargar en cada pocillo del gel una mezcla de 2 μ l del ADN extraído y 3 μ l de tampón de carga (glicerol, azul de bromofenol y xilencianol).

- Conectar la cubeta de electroforesis a una fuente de alimentación y dejar migrar la muestra durante 20 minutos.
- Visualizar el gel en un transiluminador de luz ultravioleta (*GelDoc 2000*, Bio-Rad, High Wycomb, Gran Bretaña). Comprobar la intensidad de las bandas obtenidas.

❖ Cuantificación del ADN y evaluación de su grado de pureza:

- Preparar una dilución 1:200 del ADN extraído (2 µl de ADN en 400 µl de agua destilada).
- Colocar la dilución en una cubeta de cuarzo y recoger las medidas de absorbancia a 260, 280 y 230 nm en un espectrofotómetro de luz ultravioleta *Beckman DU530 Life Science* (Beckman Coulter Inc., California). Los ácidos nucleicos presentan un máximo de absorción a 260 nm, por lo que a esa longitud de onda la concentración puede ser calculada mediante la fórmula:

$$C = \frac{\text{Abs}_{260} \times 100 \times \text{Factor de dilución}}{\epsilon \times b}$$

Siendo:

C: Concentración (mol/L).

Abs₂₆₀: Absorbancia a 260 nm.

Factor de dilución: Volumen de la dilución dividido entre la cantidad alicuotada (en este trabajo toma un valor de 200).

ε: Coeficiente de extinción molar. Se encuentra tabulado para unas condiciones determinadas.

b: Trayecto óptico. Habitualmente estandarizado a 1 cm.

- Los ratios de absorbancia 280/260 nm y 260/230 nm se utilizan para evaluar la pureza del ADN. Se acepta que un ADN es puro cuando ambos ratios oscilan entre 1,8 y 2,0. Valores inferiores a 1,8 en el ratio 280/260 indican contaminación por proteínas, y valores inferiores a 1,8 en el ratio 260/230 indican contaminación por restos de sales.

3. ANÁLISIS MEDIANTE ARRAYS DE CGH

El estudio de a-CGH fue realizado en colaboración con el Dr. Juan Luis García del Departamento de Genética molecular en Oncohematología del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca.

3.1. Marcaje fluorescente

Como espécimen de referencia se emplearon los controles *Human Genomic DNA Male G1471/Female G1521* de Promega (Promega Corporation, Madison, USA). Las muestras de ADN control y problema fueron diferencialmente marcadas con el kit *NimbleGen Dual-Color DNA Labeling* (Roche Diagnostics, Penzberg, Alemania). El ADN tumoral fue etiquetado con Cy3 (fluoróforo verde), mientras que el ADN de referencia fue etiquetado con Cy5 (fluoróforo rojo). La elongación de la cadena se produjo tras la incubación (2 horas a 37°C) con el fragmento Klenow de la DNA Polimerasa I y una mezcla de dNTPs (concentración 5mM de cada uno de ellos). Transcurrido este tiempo, la reacción fue parada con EDTA 0,5M para posteriormente precipitar, lavar con etanol y cuantificar (Figura III.1).

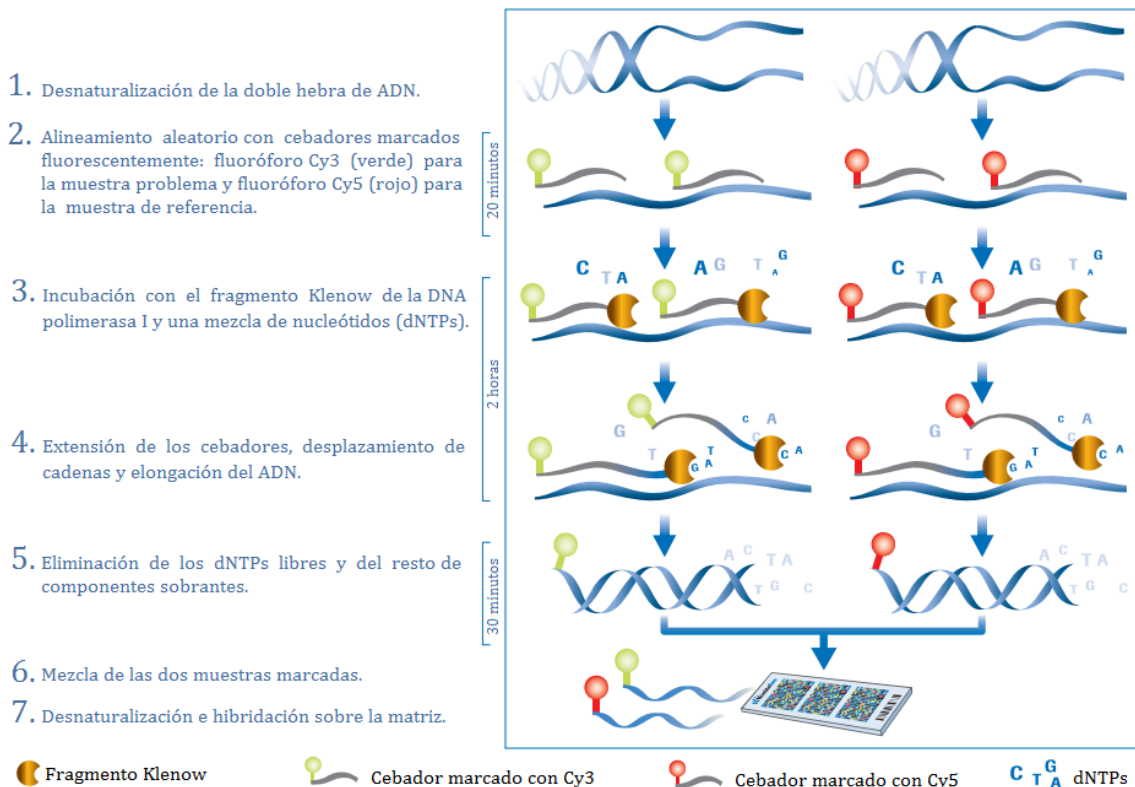


Figura III.1. Esquema de los pasos que componen el marcado fluorescente necesario para la hibridación de las muestras sobre el *microarray*. Imagen modificada del manual “*NimbleGen Dual-Color DNA Labeling Kits 48 and 192 Reactions*” (Roche Diagnostics).

3.2. Hibridación sobre el *microarray*

Una vez cuantificadas las cantidades de ADN marcado, se procedió a su hibridación sobre la matriz del *microarray* de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Brevemente, se aplicaron cantidades equimolares de las muestras control y problema (1 µg de cada una) sobre un *microarray* de oligonucleótidos provisto por NimbleGen (Roche NimbleGen Inc., Reykjavik, Islandia). El formato de *microarray* empleado (12x135K) permitió la determinación simultánea de 12 pares de muestras independientes sobre el mismo soporte (Figura III.2), cada uno de los cuales fue evaluado mediante 135.000 sondas isotérmicas empíricamente testadas. Dichas sondas abarcaron el genoma humano completo con una separación media de 12.524 pares de bases, y una longitud aproximada de 45-75 bases.

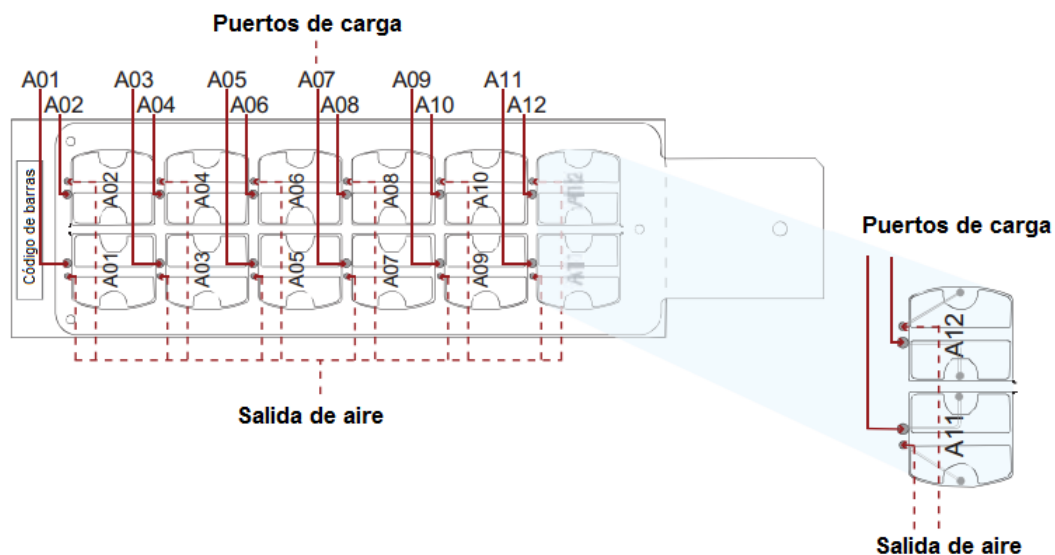


Figura III.2. Esquema de la placa del *microarray* CGH empleado para el análisis de las muestras (formato 12x135, Roche NimbleGen Inc., Reykjavik, Islandia). Imagen modificada del manual “*NimbleGen Arrays User’s Guide*” (Roche Diagnostics).

La hibridación (48 horas a 42°C) fue llevada a cabo en una cámara de hibridación de Roche NimbleGen. Finalizada esta etapa, las placas fueron sometidas a varias etapas de lavado y secado para garantizar la calidad de los datos generados.

3.3. Escaneado y procesamiento de los datos

Las placas fueron examinadas con un escáner de *microarrays* MS 200 (Roche NimbleGen Inc., Reykjavik, Islandia), que midió las intensidades de Cy3 y Cy5 a 532 y 635 nm, respectivamente. Las imágenes fueron procesadas mediante el MS 200 *Data Collection Software* (Roche NimbleGen Inc.) e importadas (en formato .tif) al software DEVA v1.2.1 (Roche NimbleGen Inc.) para su análisis.

Todas las intensidades de fluorescencia fueron corregidas restando el valor de la señal de fondo. Posteriormente se calculó el ratio Cy5/Cy3 de cada segmento y se transformó en el logaritmo en base 2 (\log_2 ratio), que fue normalizado con respecto a los ratios de todos los autosomas (los cromosomas sexuales fueron excluidos del estudio). En condiciones normales, las dos muestras de ADN compiten de igual manera para hibridar sobre las sondas del *array*, observándose el color correspondiente a la suma de ambos fluorocromos (amarillo). Por el contrario, en situaciones de ganancia o pérdida de material genético la competencia resulta desigual, observándose el color correspondiente al fluorocromo hibridado en mayor proporción. En esta memoria:

- ❖ Cuando $\log_2 \text{ratio} > 0 \rightarrow \text{Cy5} > \text{Cy3}$. El color observado fue rojo, indicando una menor dosis génica en el ADN tumoral que en la muestra de referencia.
- ❖ Cuando $\log_2 \text{ratio} < 0 \rightarrow \text{Cy5} < \text{Cy3}$. El color observado fue verde, indicando una mayor dosis génica en el ADN tumoral que en la muestra de referencia.
- ❖ Cuando $\log_2 \text{ratio} = 0 \rightarrow \text{Cy5} = \text{Cy3}$. El color observado fue amarillo (suma de rojo y verde), indicando la misma dosis génica en el ADN tumoral que en la muestra de referencia.

En todos los casos se aplicó el método CBS (*Circular Binary Segmentation*), un procedimiento que permite ubicar las CNV mediante una serie de hipótesis estadísticas (Olshen *et al.* 2004). Este método se encuentra disponible en el software waviCGH, un servidor web para el análisis y visualización de datos procedentes de *arrays*-CGH (Carro *et al.* 2010). Todas las regiones cromosómicas que exhibieron cambios en el número de copias fueron examinadas utilizando el navegador *UCSC Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/>) para determinar la ubicación y la importancia del cambio hallado.

4. EVALUACIÓN DE LA INESTABILIDAD CROMOSÓMICA

4.1. Cálculo del índice de inestabilidad genómica

La INC tumoral fue estimada a partir de la proporción de genoma aberrante, considerándose estables todos aquellos tumores con porcentajes de alteración inferiores al 20%.

Los datos obtenidos mediante el análisis a-CGH fueron utilizados para calcular un índice representativo del grado de inestabilidad tumoral. Este índice, conocido como índice de inestabilidad genómica (GII, *Genomic Instability Index*), fue computado de dos maneras de acuerdo al método descrito por Bonnet y colaboradores (Bonnet *et al.* 2012):

- ❖ Por un lado, fue computado como la fracción de genoma alterado en base al valor normalizado del número total de segmentos evaluados.
- ❖ Por el otro, a partir del número de copias de los segmentos alterados con respecto a la totalidad de los segmentos ensayados.

Posteriormente, todos los segmentos analizados fueron comparados con el valor normalizado de segmentos alterados, para tratar de definir su estado GNL (*gain, normal, loss*).

Matemáticamente, el GII^{total} puede ser calculado como la suma de los segmentos que no se encuentran en un estado GNL “normal” dentro de cada cromosoma, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$GII^{total} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i \neq 0) = 1 - \frac{1}{n \sum_{i=1}^n (x_i = 0)}$$

Donde “n” es el número total de brazos cromosómicos estudiados y “X₁”, ..., “X_n” los datos obtenidos para cada segmento.

La escala ordinal de los datos permite descomponer el GII^{total} en distintas fracciones, posibilitando el cálculo de la porción de genoma alterado por cada tipo de aberración (ganancia o pérdida) únicamente cambiando la etiqueta $x_i \neq 0$ por las etiquetas $x_i = +1$ y $x_i = -1$, respectivamente:

$$\text{GII ganancias} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (X_i = +1)$$

$$\text{GII pérdidas} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (X_i = -1)$$

Siendo “n” el número total de brazos cromosómicos estudiados y “X₁”, ..., “X_n” los datos obtenidos para cada segmento.

4.2. Número y frecuencia de las CNV

Para tratar de establecer una comparativa entre los perfiles de inestabilidad genómica manifestados por cada población y definir así las alteraciones potencialmente específicas de cada una de ellas, primeramente se generaron curvas de frecuencia que plasmaron gráficamente los patrones globales de INC.

Establecida una idea general de dichos perfiles desde el punto de vista cualitativo, se procedió a la comparación desde el punto de vista cuantitativo. Inicialmente se calculó la cifra promedio de alteraciones por tumor, para posteriormente enumerar aquellas más frecuentes dentro de cada grupo. Tanto las alteraciones recurrentes como su frecuencia fueron comparadas en busca de rasgos comunes y/o diferenciadores, entendiendo que diferencias estadísticamente significativas tal vez pudiesen significar la existencia de *loci* específicamente relacionados con la edad, que sirviesen como punto de partida en la búsqueda de nuevas vías de carcinogénesis. En una etapa final, se procedió a la identificación de los genes albergados en las regiones significativamente diferenciales, y a la búsqueda de información sobre su posible relación con el cáncer.

4.2.1. Alteraciones comunes y/o potencialmente grupo-específicas

Se conocen como regiones recurrentemente alteradas (MCR, *Minimal Common Regions*), aquellas zonas del genoma con mayor probabilidad de acumular cambios en la dosis génica. Habitualmente se definen por comparación con un umbral de referencia establecido a partir de los datos del análisis, de modo que en este trabajo dicho umbral quedó fijado en un 30%. Teniendo en cuenta esto, para la realización de esta memoria fueron catalogadas como MCR todas las alteraciones con frecuencias de aparición superiores o iguales al 30%.

Las alteraciones encontradas en cada grupo fueron sometidas a un análisis estadístico posterior. Se empleó el Test exacto de Fisher (TEF) para evaluar la asociación entre el perfil de inestabilidad genómica y la edad de inicio de la enfermedad, considerándose estadísticamente significativos los p-valores inferiores a 0,05. Por otro lado, se empleó la prueba de Chi-cuadrado (χ^2) para la comparación de las alteraciones recurrentes comunes a ambos grupos, con el objeto de revelar diferencias significativas sugestivas de especificidad de grupo. Al igual que en el caso anterior, se consideraron estadísticamente significativos los p-valores inferiores a 0,05.

Para aumentar la capacidad de encontrar resultados verdaderamente significativos y minimizar el riesgo de informar falsos positivos, todos los p-valores fueron corregidos utilizando una tasa de falso descubrimiento (FDR, *false discovery rate*) (Benjamini y Hochberg, 1995). El cálculo de esta tasa fue realizado en el software estadístico “R” (<http://www.r-project.org>) (R Core Team, 2012), considerándose significativos los valores inferiores a 0,09. Únicamente se definieron como regiones potencialmente grupo-específicas, aquellas con FDR inferior a 0,09 y grado de significación inferior a 0,05 en TEF y χ^2 .

4.2.2. Análisis no supervisado

Los datos también fueron examinados mediante métodos de agrupación jerárquica no supervisados, habitualmente conocidos como métodos de *clustering*. Estos métodos emplean algoritmos de clasificación que agrupan las muestras en función de su grado de similitud, por lo que sus resultados podrían ayudar a confirmar la existencia de asociación entre los patrones de inestabilidad genómica y la edad.

El agrupamiento no supervisado fue realizado en base al estado GNL de cada tumor, utilizándose para ello algoritmos SOTA (*Self Organizing Tree Algorithm*). La herramienta empleada para la visualización, clasificación y análisis de los datos fue *MultiExperiment Viewer* (MeV) versión 4.8.1, desarrollada por el TIGR (*The Institute for Genomic Research*).

5. ESTUDIO DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

El estudio fue realizado en colaboración con el Dr. Daniel Rueda del Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid).

5.1. Panel Bethesda

Fueron evaluados los 5 microsatélites (BAT-25, BAT-26, D5S346, D17S250 y D2S123) incluidos en el panel de Bethesda recomendado por el *National Cancer Institute* (Boland *et al.* 1998) (Tabla III.1). Se consideraron tumores IMS+ aquellos con dos o más marcadores del panel alterados y tumores IMS-/EMS el resto.

Marcador microsatélite	Localización cromosómica (gen próximo al marcador)	Tamaño del fragmento (Bp)	Fluorescencia
BAT-25	4q12 (c-kit)	110-130	6-FAM
BAT-26	2p16.3-p21 (<i>MSH2</i>)	100-120	TET
D5S346	5q21-q22 (<i>APC</i>)	100-130	HEX
D17S250	17q11.2-q12 (<i>BRCA1</i>)	140-170	TET
D2S123	2p16 (<i>MSH2</i>)	200-230	6-FAM

Tabla III.1. Características de los marcadores microsatélite y fluorocromos empleados para el análisis de IMS (*HNPCC Microsatellite Instability Test*, Roche Molecular Biochemicals). Bp: pares de bases.

Se empleó el kit *HNPCC Microsatellite Instability Test* (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante (Tabla III.2), un termociclador *GeneAmp® 9700* (PE Applied Biosystems) y el programa de temperaturas detallado en la Figura III.3.

	Volumen (µl)
ADN purificado (200 ng)	x ^[1]
<i>Multi Primer Mix</i>	5
<i>Enzyme Master Mix</i>	5
Agua destilada	y ^[2]
Volumen final de reacción	25

Tabla III.2. Mezcla de PCR utilizada para el estudio de IMS. ^[1]Volumen necesario para conseguir 200 ng de ADN. ^[2]Cantidad de agua necesaria para completar el volumen final de reacción (depende del valor de X).

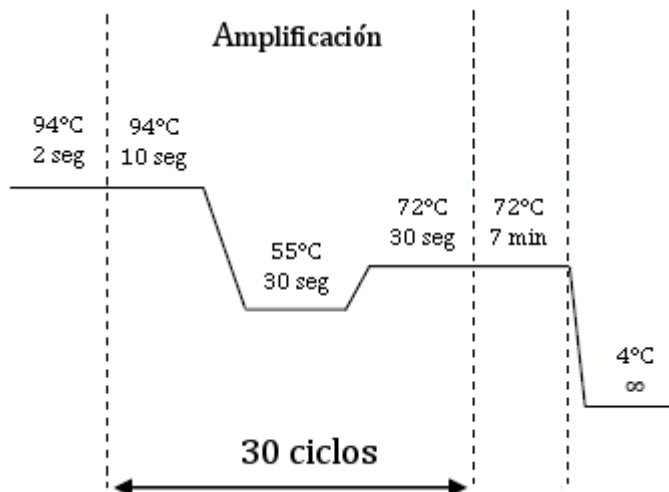


Figura III.3. Esquema de las condiciones de tiempo y temperatura empleadas en la PCR multiplex para el análisis de inestabilidad en las secuencias microsatélite.

A continuación, se tomó 1 μ l del producto de PCR purificado y se le añadieron 12 μ l de formamida desionizada y 0,1 μ l de estándar interno TAMRA-500. Los fragmentos fueron sometidos a electroforesis de alta resolución en un secuenciador *ABI PRISM® 3700* (PE Applied Biosystems), y analizados con el software *GeneScan 3.5* (PE Applied Biosystems) (Figura III.4).

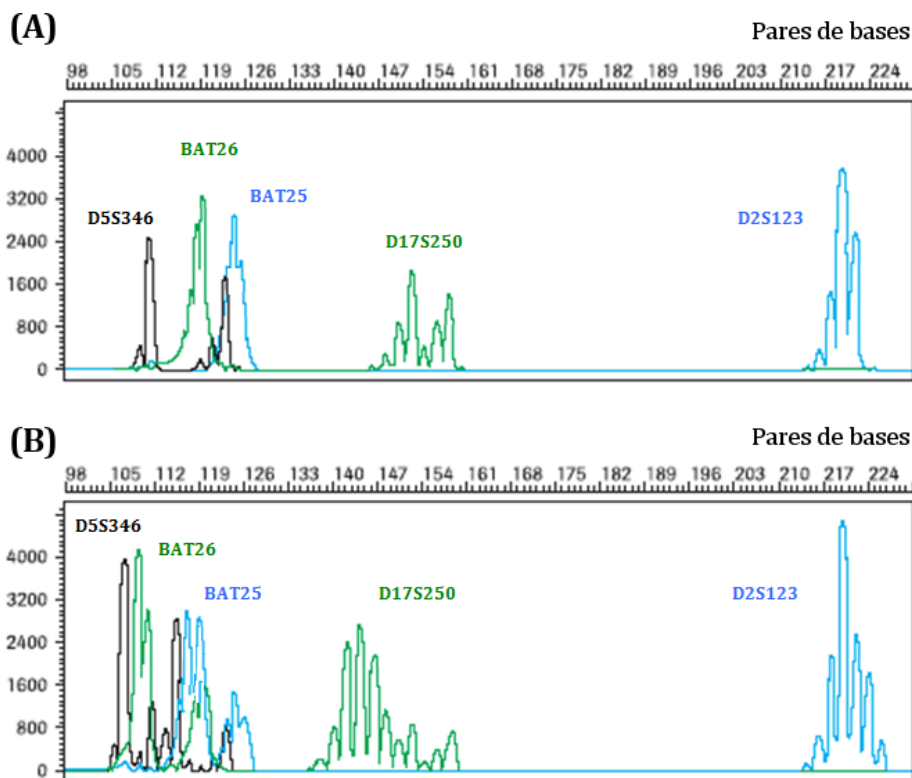


Figura III.4. Resultado de la amplificación de un ADN normal (A) y de una muestra tumoral clasificada como inestable para todos los marcadores microsatélites analizados (B).

5.2. Análisis inmunohistoquímico de las proteínas MMR

El estudio IHQ fue llevado a cabo en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid). Todas las tinciones fueron realizadas en el inmunoteñidor automático *TechMate 500* (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca).

Pasos del procedimiento:

- ❖ Corte del tejido parafinado fijado en formol (secciones de aproximadamente 4 μm de grosor).
- ❖ Desparafinado en estufa a 36°C durante 12 horas.
- ❖ Hidratación durante 10 minutos en xileno (2 veces), 5 minutos en etanol absoluto, 5 minutos en etanol al 95%, 5 minutos en etanol al 70% y 2 minutos en agua destilada.
- ❖ Desenmascaramiento antigénico en olla a presión con *buffer* de $\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$ 10mM a pH 5,6 o Tris-EDTA pH=9 (Tabla III.3) durante 3 minutos.
- ❖ Inactivación de la peroxidasa endógena con H_2O_2 al 3% (solución bloqueante S2023, DAKO, Glostrup, Dinamarca), durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- ❖ Incubación con el anticuerpo primario (Tabla III.3).
- ❖ Inmunodetección con polímeros de alta sensibilidad unidos a moléculas inmunoglobulinas anti-ratón (anticuerpo secundario) biotiniladas.
- ❖ Adición de estreptavidina marcada con peroxidasa e incubación con diaminobenzidina como sustrato.
- ❖ Contratinción con hematoxilina de Harry.
- ❖ Lavado y deshidratado en etanol al 95% (30 segundos), etanol absoluto (30 segundos), xileno (10 minutos) y nuevamente xileno (1 hora).

El análisis fue informado como positivo o negativo en función de la presencia o ausencia de expresión de cada una de las proteínas estudiadas.

Proteína	Clon	Proveedor	Dilución	Desenmascaramiento
MLH1	G168-15	BD PharMingen	1:50	Tris-EDTA, pH=9
MSH2	FE11	Oncogene	1:50	Tris-EDTA, pH=9
MSH6	44	BD Transduction Lab	1:50	Na3C3H5O(COO)3, pH=5,6

Tabla III.3. Anticuerpos, clones, proveedores y diluciones utilizadas para el estudio IHQ de las muestras.

5.3. Estudio molecular de los genes MMR (*MLH1*, *MSH2* y *MSH6*)

El estudio fue realizado en colaboración con el Dr. Daniel Rueda del Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid).

5.3.1. Genes *MLH1* y *MSH2*

5.3.1.1. Análisis de mutaciones

La mezcla de PCR (Tabla III.4) fue amplificada en un termociclador *GeneAmp® 9700* (PE Applied Biosystems) de acuerdo al programa de temperaturas detallado en la Figura III.5.

	Volumen (µl)
ADN purificado (50 ng)	x^[1]
Primer Sentido (10 µM)	2,5
Primer Antisentido (10 µM)	2,5
Tampón PCR 10x (BioTaq)	2,5
dNTPs (1.25 mM)	2
ADN Taq Polimerasa (BioTaq)	2
Agua destilada	y^[2]
Volumen final de reacción	25

Tabla III.4. Mezcla de PCR utilizada para la amplificación de *MLH1* y *MSH2*. ^[1]Volumen necesario para conseguir 50 ng de ADN. ^[2]Cantidad de agua necesaria para completar el volumen final de reacción (depende del valor de X).

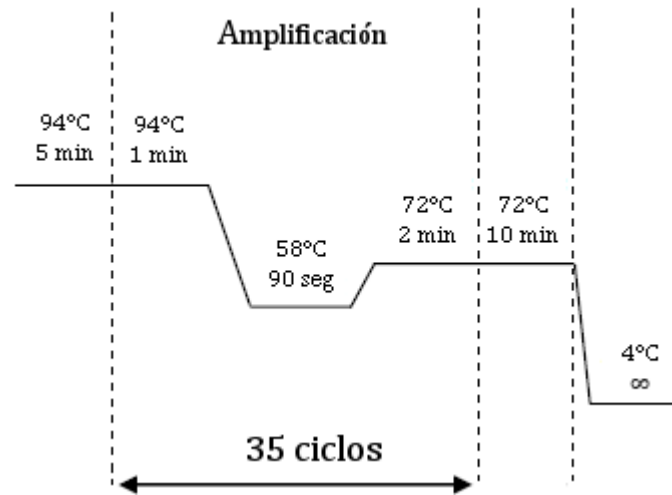


Figura III.5. Esquema de las condiciones de tiempo y temperatura empleadas para la PCR del estudio molecular de los genes *MLH1* y *MSH2*.

Concluida la PCR, los fragmentos fueron purificados y sometidos a electroforesis vertical con gradiente de desnaturalización sobre geles de poliacrilamida (Guldberg y Guttler 1993, Makec *et al.* 1997). Se fijó una temperatura de 65°C, un tiempo de 18 horas y una intensidad de corriente de 17 mA. La electroforesis se llevó a cabo en un sistema *DCode™ Universal Mutation Detection System* (Bio-Rad, California, USA) y tras la tinción con bromuro de etidio, el gel fue visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta (*GelDoc 2000*, Bio-Rad, California, USA). Tanto los cebadores, como las condiciones de desnaturalización empleadas en este trabajo, fueron modificados con respecto a los descritos por otros autores (Wijnen *et al.* 1995, Wijnen *et al.* 1996) y se encuentran recogidos en los Anexos 2A y 2B.

Los fragmentos con patrón de migración anómalo fueron secuenciados empleando como cebador la secuencia complementaria de M13 (Anexos 2A y 2B). Las variantes genéticas halladas fueron descritas siguiendo la nomenclatura recomendada por la Sociedad de Variaciones del Genoma Humano (HGVS, *Human Genome Variation Society*) (<http://www.hgvs.org>).

5.3.1.2. Análisis de grandes deleciones genómicas

Los cambios en el número de copias de un gen no suelen ser detectables por secuenciación, puesto que la presencia del alelo sano enmascara la ausencia en la otra copia. Por este motivo, el análisis de grandes deleciones genómicas fue realizado mediante MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*), un

método de PCR *multiplex* que consigue solventar esta limitación y permite detectar anomalías en el número de copias de las secuencias de ADN genómico.

Se utilizó el reactivo comercial *Salsa MLPA Kit P003-B1 MLH1/MSH2* (MRC-Holland, Ámsterdam, Holanda), un reactivo compuesto por una mezcla de 43 sondas diferentes (una para cada exón de *MLH1*, una para cada exón de *MSH2* y 8 sondas control) (Anexo 2C). Pasos del procedimiento:

❖ Desnaturalización del ADN e hibridación de las sondas:

- Diluir la muestra de ADN hasta disponer de una concentración de 100 ng en 5 μ l.
- Desnaturalizar en un termociclador a 98°C durante 5 minutos y dejar atemperar.
- Añadir 1,5 μ l de la mezcla de sondas SALSA y 1,5 μ l del tampón MLPA.
- Incubar a 95°C durante 1 minuto y a 60°C durante 16 horas.

❖ Reacción de ligación:

- Preparar en hielo la mezcla de ligación (Tabla III.5) y añadir 32 μ l a cada muestra desnaturalizada e hibridada con las sondas.
- Incubar a 54°C durante 15 minutos y a 98°C durante 5 minutos.

	Volumen (μ l)
Tampón A de la Ligasa-65	3
Tampón B de la Ligasa-65	3
Ligasa-65	1
Agua destilada	25

Tabla III.5. Mezcla de ligación utilizada en la PCR multiplex para el análisis de grandes deleciones genómicas de los genes *MLH1* y *MSH2*.

❖ Reacción de PCR:

- Calentar a 60°C una mezcla de 4 μ l de Tampón SALSA de PCR 10x, 26 μ l de agua destilada y 10 μ l de mezcla de ligación.

- Una vez alcanzada la temperatura, añadir 10 µl de mezcla de PCR (Tabla III.6). Amplificar de acuerdo al programa de temperaturas especificado en la Figura III.6.
- Chequear el producto de PCR en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y visualizar en un transiluminador de luz ultravioleta.

	Volumen (µl)
Primer Sentido (SALSA)^[1]	2
Primer Antisentido (SALSA)^[2]	2
Tampón de dilución de enzima	2
ADN Taq Polimerasa (SALSA)	0,5
Agua destilada	5,5

Tabla III.6. Mezcla de PCR utilizada para el análisis de grandes deleciones en los genes *MLH1* y *MSH2* mediante MLPA. ^[1]Secuencia sentido 5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGA-3' (marcado fluorescentemente). ^[2]Secuencia antisentido 5'-GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA-3'.

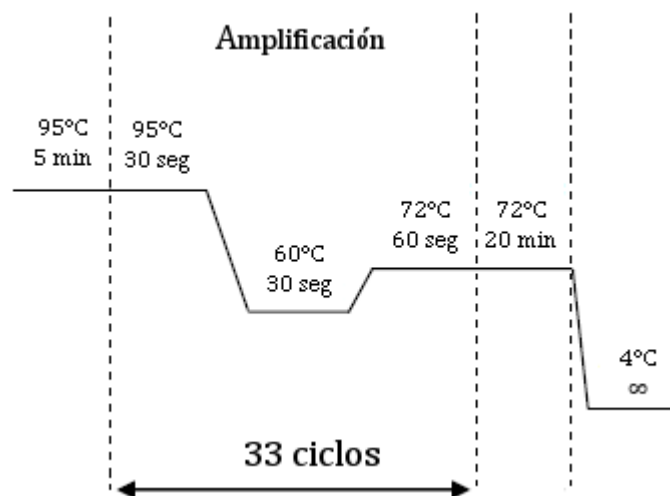


Figura III.6. Esquema de las condiciones de tiempo y temperatura empleadas en la reacción de PCR multiplex para el estudio molecular de los genes *MLH1* y *MSH2*.

❖ Visualización:

- Añadir 12 µl de formamida desionizada y 0,1 µl de estándar interno TAMRA-500 a 1 µl del producto de PCR purificado. Analizar la mezcla en un secuenciador *ABI PRISM® 3700* (PE Applied Biosystems) con ayuda del software *GeneScan 3.5* (PE Applied Biosystems).

5.3.1.3. Estudio de hipermetilación del promotor del gen *MLH1*

Como controles positivos se utilizaron las líneas celulares RKO y SW48, caracterizadas por mostrar IMS con ausencia de mutación en los genes MMR y presencia de hipermetilación del promotor del gen *MLH1* de ambos alelos. Como control negativo se empleó sangre periférica de un individuo sano.

El análisis fue realizado mediante modificación con bisulfito sódico, una técnica basada en la capacidad de este reactivo para convertir los residuos de citosina no metilados en uracilos (Frommer *et al.* 1992). Posteriormente, el ADN modificado puede ser amplificado y secuenciado, proporcionando información detallada sobre el estado de metilación de las islas CpG. Para la ejecución de la técnica se utilizaron protocolos descritos por otros autores (Herman *et al.* 1998, Suter *et al.* 2004) a los que fueron incorporadas ciertas variaciones. Pasos del procedimiento:

❖ Modificación con bisulfito:

- Incubar una mezcla de 10 µl de ADN (100ng/µl), 40 µl de agua destilada y 5,7 µl de NaOH 3M, a 37°C durante 15 minutos.
- Añadir 33 µl de hidroquinona 16,4mM y 530 µl de bisulfito sódico 3,03M pH=5, ambos preparados en fresco.
- Agregar una gota de aceite de mineral e incubar en oscuridad a 50°C durante 16 horas.
- Separar el aceite de la muestra y proceder a la purificación de las muestras mediante el kit *Wizard[®] DNA Clean-Up System* (Promega Corporation, Madison, USA).
 - Añadir 1 ml de resina *DNA Clean-Up* a la muestra, resuspender y pasar a la jeringa.
 - Filtrar mediante vacío y lavar la columna con 1 ml de isopropanol al 80% (2 veces). Descartar la jeringa y transferir la columna a un tubo de 1,5 ml.
 - Centrifugar a 14.000 rpm y temperatura ambiente durante 1 minuto. Transferir la columna a otro tubo y añadir 40 µl de agua destilada a 50°C para extraer el ADN.

- Añadir 4,4 µl de NaOH 3M a los 40 µl de ADN extraído. Incubar durante 15 minutos a 37°C.
- Añadir 1 µl de glucógeno (10 mg/ml), 17 µl de acetato amónico 10 M y 500 µl de etanol absoluto frío para precipitar el ADN. Centrifugar a 14.000 rpm y 4°C durante 15 minutos. Descartar el sobrenadante.
- Lavar con 800 µl de etanol frío al 75%. Centrifugar a 14.000 rpm y 4°C durante 15 minutos. Descartar el sobrenadante. Dejar secar y resuspender el sedimento de ADN en 20 µl de agua destilada.

❖ PCR específicas de presencia/ausencia de hipermetilación:

- Se utilizaron los *primers* descritos en la bibliografía (Herman *et al.* 1998), adquiridos a través de *Sigma-Genosys Ltd* (Sigma-aldrich, Cambridgeshire, Gran Bretaña). La mezcla de PCR (Tabla III.7) fue amplificada en un termociclador *GeneAmp® 9700* (PE Applied Biosystems) de acuerdo al programa de temperaturas de la Figura III.7.

	Volumen (µl)
ADN modificado	x ^[3]
<i>Primer Sentido</i> (20 µM) ^[1]	0,5
<i>Primer Antisentido</i> (20 µM) ^[2]	0,5
Tampón PCR 10x (+MgCl ₂)	2,5
dNTPs (1.25 mM)	4
ADN Polimerasa (Herculase [®] , Stratagene, California, USA)	0,2
Agua destilada	y ^[4]
Volumen final de reacción	25

Tabla III.7. Mezcla de PCR utilizada en el estudio de hipermetilación del promotor del gen *MLH1*. ^[1]Secuencia sentido del cebador específico de metilación 5'-ACGTAGACGTTTTATTAGGGTCGC-3'. Secuencia sentido del cebador específico de ausencia de metilación 5'-TTTTGATGTAGATGTTTTATTAGGGTTGT-3'. ^[2]Secuencia antisentido del cebador específico de metilación 5'-CCTCATCGTAACTACCCGCG-3'. Secuencia antisentido del cebador específico de ausencia de metilación 5'-ACCACCTCATCATAACTACCCACA-3'. ^[3]Volumen necesario para conseguir 100 ng de ADN. ^[4]Cantidad de agua necesaria para completar el volumen final de reacción (depende del valor de X).

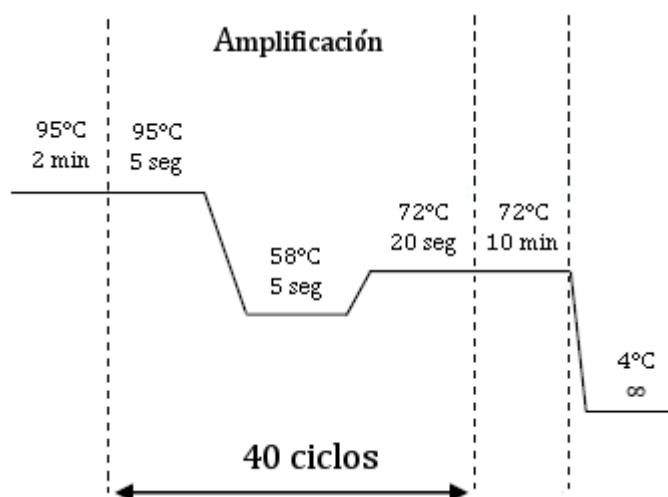


Figura III.7. Esquema de las condiciones de tiempo y temperatura empleadas en la reacción de PCR utilizada para el estudio de hipermetilación del promotor del gen *MLH1*.

❖ PCR independiente del estado de hipermetilación:

- Se utilizaron los *primers* descritos en la bibliografía (Herman *et al.* 1998), adquiridos a través de *Sigma-Genosys Ltd* (Sigma-aldrich, Cambridgeshire, Gran Bretaña). La mezcla de PCR (Tabla III.8) fue amplificada bajo las condiciones descritas en la Figura III.7.

	Volumen (µl)
ADN modificado	x^[3]
Primer Sentido (100 µM)^[1]	1
Primer Antisentido (100 µM)^[2]	1
Tampón PCR 10x (+MgCl₂)	2,5
dNTPs (1.25 mM)	4
DMSO	1,25
ADN Polimerasa (Herculase[®], Stratagene, California, USA)	0,2
Agua destilada	y^[4]
Volumen final de reacción	25

Tabla III.8. Mezcla para la PCR independiente del estado de hipermetilación del promotor del gen *MLH1*.

^[1]Secuencia sentido 5'-GAGTAGTTTTTTTTTTAGGAGTGAAG-3'. ^[2]Secuencia antisentido 5'-AAAACTATAAACCTATACCTAATCTA-3'. ^[3]Volumen necesario para conseguir 100 ng de ADN. ^[4]Cantidad de agua necesaria para completar el volumen final de reacción (depende del valor de X).

- ❖ Digestión con la enzima de restricción *BstUI*: La modificación del ADN con bisulfito fue combinada con la digestión mediante enzimas de restricción (método COBRA, *Combined Bisulfite Restriction Analysis*). El producto de PCR (5 μ l) fue digerido con la enzima *BstUI*, capaz de reconocer específicamente la secuencia 5'-CGCG-3'. Puesto que la secuencia de ADN se ve afectada por la modificación con bisulfito, los lugares de restricción quedarán determinados por el estado de metilación (Figura III.8).

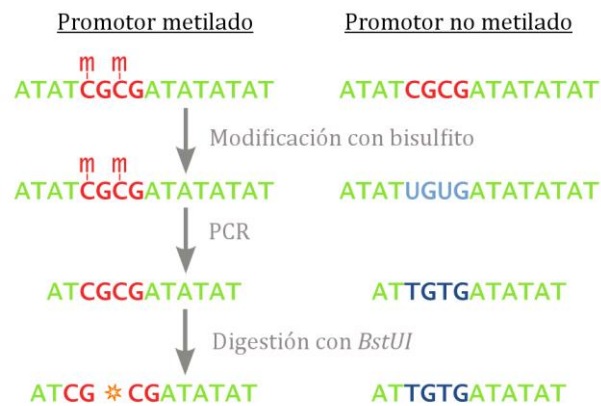


Figura III.8. Secuencia de pasos que conforman el método COBRA. Cuando las islas *CpG* se encuentran no metiladas, la modificación con bisulfito transforma las citosinas en uracilos y el producto de PCR no es reconocido por la enzima *BstUI*.

- La mezcla de digestión (Tabla III.9) fue incubada a 60°C durante 4 horas. Transcurrido este tiempo, los fragmentos digeridos fueron visualizadas en un gel de agarosa al 3%.

	Volumen (μ l)
Producto de PCR	x^[1]
Disolución Tampón^[3]	1,5
BstUI (10 U/μl)	0,3
Agua destilada	y^[2]
Volumen final de reacción	15

Tabla III.9. Mezcla para la digestión con la enzima *BstUI*. ^[1]Volumen de dilución de ADN necesario para conseguir una adecuada visualización de los productos digeridos. ^[2]Cantidad de agua necesaria para completar el volumen final de reacción (depende del valor de X). ^[3]Disolución tampón compuesta por Tris-HCl 10mM, NaCl 50mM, MgCl₂ 10mM y ditiotreititol 1mM.

❖ Secuenciación:

- El volumen restante de producto de PCR no digerido fue purificado para su posterior secuenciación. Los fragmentos fueron purificados con el kit *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, los fragmentos fueron sometidos a electroforesis de alta resolución en un secuenciador *ABI PRISM® 3700* (PE Applied Biosystems), y analizados con el software *GeneScan 3.5* (PE Applied Biosystems) (Figura III.9).

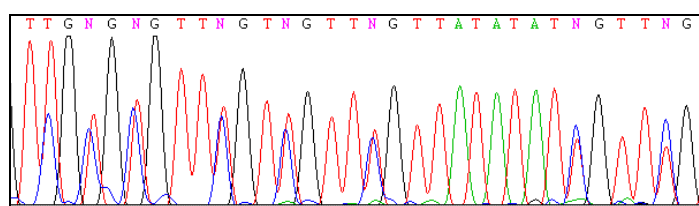


Figura III.9. Ejemplo de la secuencia obtenida en un paciente con hipermetilación del promotor de *MLH1* en uno de sus alelos. Cuando solamente uno de los alelos está metilado (heterocigosis) se observan dos picos superpuestos (C y T).

5.3.2. Gen *MSH6*

5.3.2.1. Amplificación de exones y regiones intrónicas adyacentes

Los cebadores fueron diseñados (Anexo 2D) y posteriormente comprados a *Sigma-Genosys Ltd* (Sigma-aldrich, Cambridgeshire, Gran Bretaña). La composición de la mezcla de PCR fue común para todos los fragmentos (Tabla III.10), sin embargo, las condiciones de reacción fueron diferentes en función del fragmento a amplificar (Anexo 2D). Se definieron tres programas de temperatura (“PCR tiempo corto”, “PCR tiempo intermedio” y “PCR tiempo largo”) (Figura III.10), que contuvieron las condiciones de reacción más favorables para la amplificación de cada uno de los fragmentos (Anexo 2D). La reacción fue llevada a cabo en un termociclador *GeneAmp® 9700* (PE Applied Biosystems).

El estado mutacional del gen *MSH6* fue evaluado mediante cromatografía líquida de alta resolución en condiciones parcialmente desnaturizantes (dHPLC, *denaturing high-performance liquid chromatography*). Se utilizó el sistema *WAVE®* (Transgenomic, Gran Bretaña), basado en cromatografía de intercambio iónico en fase reversa, con posterior detección ultravioleta. La fase estacionaria estuvo

compuesta por una matriz no porosa de bolas de polímeros de poliestireno-divinilbenceno recubiertas de cadenas de 18 carbonos (columna C-18), mientras que la fase móvil consistió en una combinación de TEAA 0,1 M y acetonitrilo al 25%. Los resultados fueron analizados con el software *NavigatorTM* (Transgenomic, Gran Bretaña) (Figura III.11).

	Volumen (µl)
ADN purificado (100 ng)	x^[1]
Primer Sentido (10 µM)	1
Primer Antisentido (10 µM)	1
Tampón PCR 10x (Roche)	2,5
MgCl₂	1,5
dNTPs (1.25 mM)	4
ADN Taq Polimerasa (Roche)	1
Agua destilada	y^[2]
Volumen final de reacción	25

Tabla III.10. Mezcla de PCR utilizada para la amplificación de exones y regiones intrónicas adyacentes al gen *MSH6*. ^[1]Volumen necesario para conseguir 100 ng de ADN. ^[2]Cantidad de agua necesaria para completar el volumen final de reacción (depende del valor de X).

Únicamente fueron secuenciados aquellos fragmentos con cromatogramas anómalos sugestivos de heterodúplex “alelo normal-alelo mutado” u homodúplex “alelo mutado-alelo mutado”. Previamente a su secuenciación, los fragmentos fueron purificados con el kit *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se tomó 1 µl del producto de PCR purificado y se le añadieron 12 µl de formamida desionizada y 0,1 µl de estándar interno TAMRA-500. Los fragmentos fueron sometidos a electroforesis de alta resolución en un secuenciador *ABI PRISM® 3700* (PE Applied Biosystems), y analizados con el software *GeneScan 3.5* (PE Applied Biosystems).

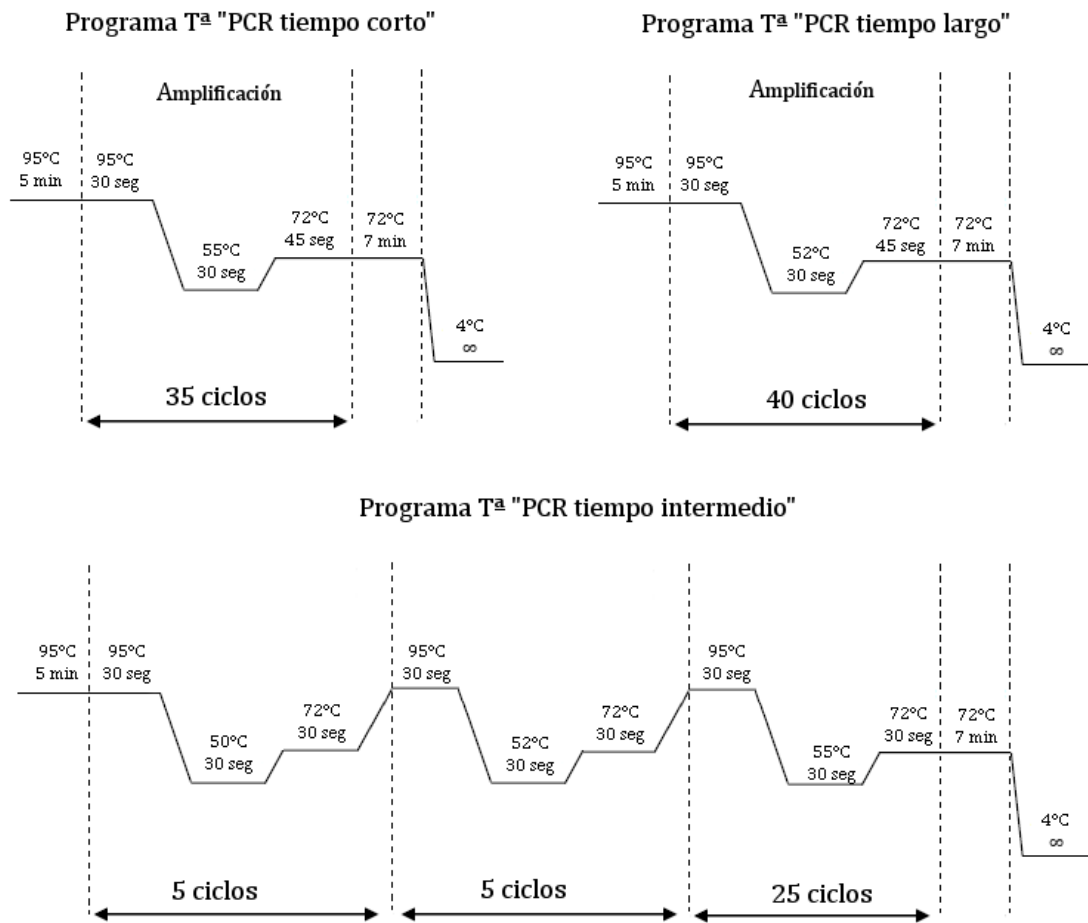


Figura III.10. Esquema de los tres programas de temperatura diseñados para la amplificación de los distintos fragmentos de *MSH6*.

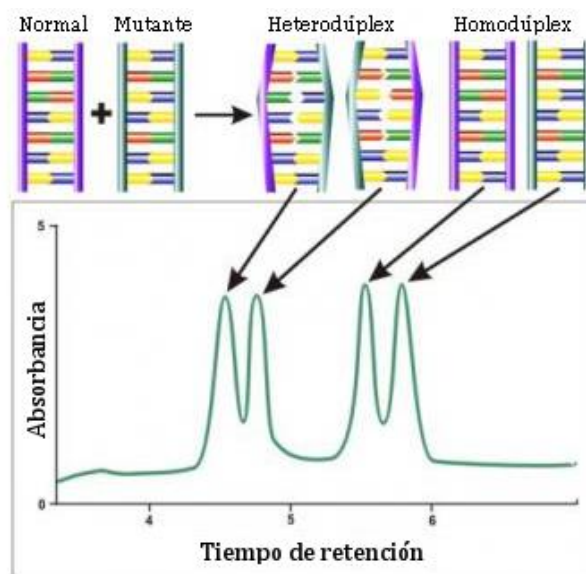


Figura III.11. Ejemplo de la visualización del estado mutacional del gen *MSH6* mediante dHPLC. Los tiempos de retención varían en función de la naturaleza de heterodúplex u homodúplex de los fragmentos de PCR que pasan por el detector UV. Imagen modificada de www.transgenomics.com.

6. ESTUDIO MOLECULAR DE *BRAF*

El estado mutacional del exón 15 de *BRAF* (incluyendo el *hotspot* o punto caliente que acumula más del 90% de las mutaciones del gen [p.V600E]) fue evaluado mediante análisis HRM (*High Resolution Melting*) en el sistema *LightCycler*® 480 de Roche (Roche Diagnostics). Se utilizó el reactivo comercial *LightCycler*® LC480 *High Resolution Melting Master* (Roche Diagnostics) y unas secuencias de *primers* diseñadas con el sistema *NCBI Primer-BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) y detalladas a continuación:

Primer sentido: 5'-AATGCTTGCTCTGATAGGAAAATGA-3'

Primer antisentido: 5'-GCAGCATCTCAGGGCCAAAA-3'

La mezcla de PCR contuvo 3 ng de DNA, 0,3 μ M de cada *primer*, 3 mM de MgCl₂, disolución *LightCycler*® LC480 *High Resolution Melting Master Mix* (Roche Diagnostics) y agua destilada hasta un volumen final de 10 μ l, siendo amplificada de acuerdo al programa de temperaturas detallado en la Figura III.12. La curva de *melting* abarcó desde los 40 hasta 93°C con una pendiente de 0,02°C/segundo. Los productos de PCR de las muestras con diferentes patrones de *melting* fueron purificados con *ExoSAP-IT*® (Affymetrix, Santa Clara, CA) y secuenciados utilizando el kit *BigDye*® Terminator v3.1 *Cycle Sequencing Kit* (PE Applied Biosystems) en un secuenciador automático *ABI PRISM*® 3130 (Applied Biosystems).

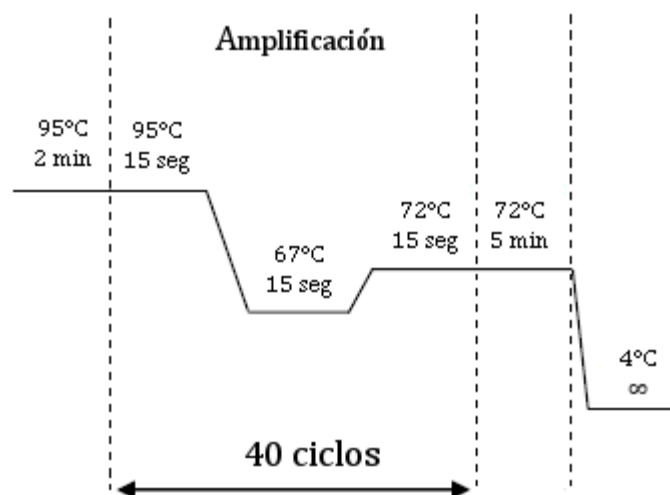


Figura III.12. Esquema de las condiciones de tiempo y temperatura empleadas en el análisis HRM para el estudio molecular del gen *BRAF*.

7. TRATAMIENTO DE LOS DATOS

7.1. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versión 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Las variables continuas de distribución normal fueron comparadas mediante la prueba t de Student de dos colas, mientras que se empleó la prueba U de Mann-Whitney para las variables continuas de distribución no normal. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA, *Analysis of variance*) de un factor para la comparación de variables continuas en más de dos grupos y la prueba de Chi-cuadrado (χ^2) para la comparación de variables discretas. En todos los casos se consideró significación estadística cuando los p-valores fueron inferiores a 0,05.

Los estadísticos empleados para la descripción de las variables continuas cuyos valores se ajustaron a un modelo de distribución normal fueron la media y la desviación estándar. Por el contrario, el estadístico empleado para la descripción de variables cuantitativas no ajustadas a un modelo normal fue la mediana.

Los análisis de supervivencia fueron desarrollados mediante el estimador de Kaplan-Meier, un método no paramétrico que evalúa el tiempo que tarda en ocurrir un suceso. Los casos observados durante un tiempo inferior al necesario para la aparición del suceso, fueron considerados observaciones incompletas o censuradas.

7.2. Aspectos éticos y legales

El presente trabajo se ha llevado a cabo cumpliendo con los criterios establecidos en la Declaración de Helsinki promulgada por la Asamblea Médica Mundial (Edimburgo, 2000) y en el Convenio sobre Derechos Humanos y Biomedicina (Oviedo, 1997). Igualmente se ha trabajado de acuerdo a lo recogido en la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica, Ley 15/1999 sobre protección de datos de carácter personal y Ley 41/2002 que regula la autonomía del paciente y las obligaciones en materia de información y documentación clínica. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid).

IV. RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO

Se incluyeron un total de 185 pacientes procedentes del Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid), todos ellos diagnosticados y tratados de CCR primario entre enero de 2002 y diciembre de 2009. Los pacientes fueron seleccionados consecutivamente en orden de aparición y clasificados en dos grupos atendiendo a su edad en el momento de diagnóstico:

- a) **Adultos jóvenes:** diagnóstico a una edad inferior o igual a 45 años (88 individuos).
- b) **Adultos ancianos:** diagnóstico a una edad superior o igual a 70 años (97 individuos).

1.1. Características clínicas

1.1.1. Edad de diagnóstico y sexo

La Figura IV.1 recoge gráficamente la distribución por edades de los sujetos incluidos en el estudio. En el caso de tumores metacrónicos, se consideró como edad de diagnóstico la correspondiente a la detección del primero de ellos. Para el grupo de adultos jóvenes la edad media de diagnóstico se situó en los $39,14 \pm 5,58$ años (rango: 16-45), con un pico de incidencia a los 45 años. En el caso de los adultos ancianos la edad media de diagnóstico se situó en los $77,82 \pm 5,71$ años (rango: 70-92), con un pico de incidencia a los 70 años (Figura IV.1).

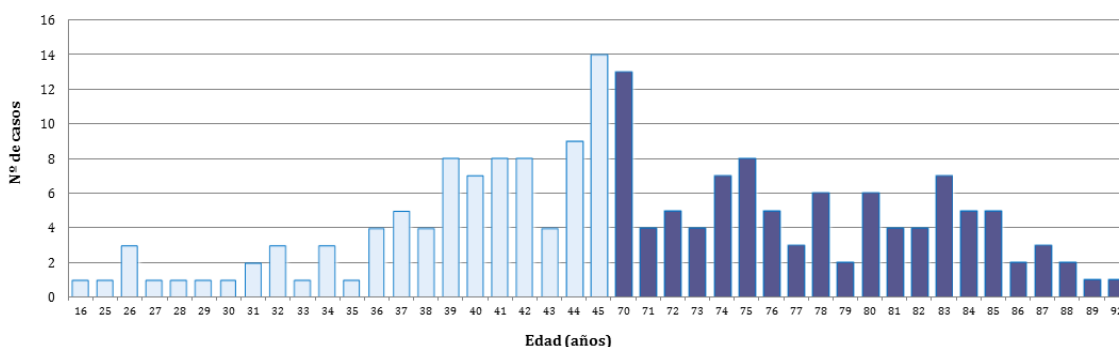


Figura IV.1. Distribución de los casos de CCR en función de la edad de diagnóstico. En color claro se representa el grupo de pacientes jóvenes (≤ 45 años) y en oscuro, el de pacientes ancianos (≥ 70 años).

No se encontraron diferencias significativas respecto a la distribución de la enfermedad por sexos, sin embargo, las dos poblaciones incluyeron una mayor proporción de varones, con un contraste más acentuado entre las personas de

menor edad (59,1% vs. 40,9% en pacientes jóvenes y 50,5% vs. 49,5% en pacientes ancianos (Tabla IV.1).

	JÓVENES (≤45 años)	ANCIANOS (≥70 años)	p-valor ^[1]
Número de pacientes	88	97	-
Hombres	52 (59,1%)	49 (50,5%)	NS
Mujeres	36 (40,9%)	48 (49,5%)	

Tabla IV.1. Distribución por sexos de los tumores analizados. ^[1]Análisis estadístico efectuado mediante la prueba de Chi-cuadrado (χ^2). NS: No Significativo.

1.2. Características clínico-patológicas

1.2.1. Localización tumoral

En ambos grupos hubo más casos de cáncer de colon que de recto/unión rectosigmoidea (70,5% vs. 29,5% en jóvenes y 62,9% vs. 37,1% en ancianos), aunque sin alcanzar la significación estadística ($p=0,350$). Se observó predominio de la localización izquierda en jóvenes ($p=0,006$) y de la derecha en ancianos (Tabla IV.2).

	JÓVENES (≤45 años)	ANCIANOS (≥70 años)	p-valor ^[1]
Número de pacientes	88	97	-
Localización derecha	21 (23,9%)	35 (36,1%)	NS
Ciego	3	8	
Colon ascendente	8	19	
Ángulo hepático	6	5	
Colon transversal proximal	4	3	
Localización izquierda	41 (46,6%)	26 (26,8%)	0,006
Colon transversal distal	2	1	
Ángulo esplénico	2	4	
Colon descendente	17	2	
Sigma	20	19	
Recto y Unión Rectosigmoidea	26 (29,5%)	36 (37,1%)	NS

Tabla IV.2. Localización de las neoplasias estudiadas. ^[1]Análisis estadístico efectuado mediante la prueba de Chi-cuadrado (χ^2). NS: No Significativo.

1.2.2. Histología, grado de diferenciación y producción de moco

Un 79,5% de los tumores de inicio temprano presentó histología de adenocarcinoma, mientras que sólo un 20,5% correspondió a pólipos

malignizados. La disparidad entre ambos porcentajes fue muy superior en el caso de los adultos ancianos, con un 94,8% de adenocarcinomas y únicamente un 5,2% de pólipos malignizados.

No hubo diferencias en el grado de diferenciación tumoral, ni en la frecuencia de neoplasias mucosecretoras o con células en “anillo de sello” (Tabla IV.3).

	JÓVENES (≤45 años)	ANCIANOS (≥70 años)	p-valor ^[2]
Número de pacientes	88	97	-
Adenocarcinoma	70 (79,5%)	92 (94,8%)	0,002
Pólipos malignizados	18 (20,5%)	5 (5,2%)	
Adenoma tubular	13	1	
Adenoma tubulovelloso	5	3	
Adenoma velloso	0	1	
Grado de diferenciación^[1]			
Bajo	9 (14,1%)	5 (6,2%)	NS
Moderado	32	49	
Alto	23	26	
Neoplasia mucosecretora^[1]	17 (24,3%)	18 (19,6%)	NS
Células en “anillo de sello”^[1]	4 (5,7%)	2 (2,2%)	

Tabla IV.3. Características anatomopatológicas de las neoplasias estudiadas. ^[1]Los porcentajes mostrados se basan en el número de datos disponible, puesto que para algunos pacientes en estadio IV únicamente se dispuso de biopsia, imposibilitando el estudio de otras variables. ^[2]Análisis estadístico efectuado mediante la prueba de Chi-cuadrado (χ^2). NS: No Significativo.

1.2.3. Estadificación tumoral

Los tumores se estadificaron según el sistema de clasificación TNM en función de su extensión, invasión linfática y presencia/ausencia de metástasis ganglionares o a distancia en el momento de su diagnóstico.

La distribución de los estadios tumorales fue más homogénea entre los individuos jóvenes, con un discreto predominio de las etapas iniciales (el 60,2% presentó estadio I o II al diagnóstico) (Tabla IV.4). Por el contrario, la detección de la enfermedad en fases precoces fue menos habitual entre los adultos ancianos, si bien el estadio II constituyó el más común en el momento de diagnóstico (39,2%) (Tabla IV.4). No se objetivaron diferencias respecto al porcentaje de metástasis, y como era de esperar, el hígado fue el órgano más frecuentemente afectado por la

diseminación a distancia (61,9% de los jóvenes y 86,4% de los ancianos) (Tabla IV.4).

	JÓVENES (≤45 años)	ANCIANOS (≥70 años)	p-valor ^[1]
Número de pacientes	88	97	-
Clasificación TNM			
I	28 (31,8%)	18 (18,5%)	NS
II	25 (28,4%)	38 (39,2%)	
III	14 (15,9%)	19 (19,6%)	
IV	21 (23,9%)	22 (22,7%)	
Tipo de metástasis			
Hepática	13 (61,9%)	19 (86,4%)	NS
Pulmonar	4	7	
Peritoneal	8	6	
Otras	2	5	

Tabla IV.4. Estadificación tumoral y tipo de metástasis de las neoplasias estudiadas. ^[1]Análisis estadístico efectuado mediante la prueba de Chi-cuadrado (χ^2). NS: No Significativo.

1.3. Características evolutivas

1.3.1. Supervivencia total

La ST media en el grupo de pacientes jóvenes fue de 76,18±48,63 meses. Este valor mejoró considerablemente cuando se excluyeron del cálculo los pacientes con metástasis al diagnóstico, aumentando hasta los 94,58±39,11 meses (incremento de 18,40 meses).

La ST media en el grupo de pacientes ancianos fue de 43,63±34,83 meses. A diferencia de lo observado en población joven, la exclusión de los casos con metástasis al diagnóstico apenas modificó este valor, aumentando únicamente hasta los 49,88±36,05 meses (incremento de 6,25 meses).

1.3.2. Recidiva

La SLE media en el grupo de pacientes jóvenes fue de 65,86±51,18 meses. Este valor mejoró considerablemente cuando se excluyeron del cálculo los pacientes con metástasis al diagnóstico, aumentando hasta los 84,96±41,79 meses (incremento de 19,10 meses). De los 67 pacientes jóvenes sin metástasis, 10 (14,9%) sufrieron recidiva tumoral: 3 (30%) a nivel locorregional y 7 (70%) a distancia.

La SLE media en el grupo de pacientes ancianos fue de $34,44 \pm 33,66$ meses. A diferencia de lo observado en población joven, la exclusión de los casos con metástasis al diagnóstico apenas modificó este valor, aumentando únicamente hasta los $43,97 \pm 32,48$ meses (incremento de 9,53 meses). De los 75 pacientes ancianos sin metástasis, 11 (14,7%) sufrieron recidiva tumoral: 7 (63,6%) a nivel locorreional, 3 (27,3%) a distancia y 1 (9,1 %) de ambos tipos.

1.3.3. Mortalidad

Para evitar el sesgo ocasionado por la diferencia de edad existente entre las dos poblaciones, no se efectuaron cálculos estadísticos respecto a esta variable.

La mortalidad global alcanzó valores más bajos entre los pacientes jóvenes, con un porcentaje de éxitus del 29,5% (26 pacientes) y una edad media de fallecimiento de $41,58 \pm 4,59$ años. En todos los casos la muerte estuvo directamente relacionada con la neoplasia colorrectal, y como era de esperar, las etapas más avanzadas predominaron entre los sujetos fallecidos (el 76,9% de ellos se encontraba en estadio IV). Las restantes características anatomoclínicas no difirieron con respecto a las descritas de forma general para la totalidad del grupo.

La mortalidad global entre los pacientes ancianos fue superior, con un porcentaje de éxitus del 45,4% (44 pacientes) y una edad media de fallecimiento de $80,36 \pm 5,46$ años. Como cabía esperar dada la avanzada edad de algunos sujetos, el CCR únicamente fue responsable de la muerte en el 63,6% de los casos (28 pacientes). Al igual que se observó en población joven, las etapas más avanzadas predominaron entre los sujetos fallecidos (el 75% de ellos se encontraba en estadio IV). Las restantes características anatomoclínicas fueron similares a las descritas de forma general para la totalidad del grupo.

1.3.4. Historia de pólipos u otras neoplasias

No se observaron diferencias significativas respecto a la historia de pólipos ($p=0,260$), si bien su frecuencia fue superior entre los pacientes ancianos (74,2% vs. 65,9%). Por el contrario, se alcanzó la significación estadística al comparar la proporción de tumores sincrónicos y/o metacrónicos, resultando ambos más comunes en el grupo de mayor edad (25,8% vs. 13,6%; $p=0,034$) (Tabla IV.5).

	JÓVENES (≤45 años)	ANCIANOS (≥70 años)	p-valor ^[1]
Número de pacientes	88	97	-
Historia de pólipos	58 (65,9%)	72 (74,2%)	
Adenomatosos	30	45	
Hiperplásicos	5	4	NS
Mixtos	23	23	
Tumores sincrónicos	9 (10,2%)	19 (19,6%)	
Tumores metacrónicos	3 (3,4%)	6 (6,2%)	0,034

Tabla IV.5. Identificación de pólipos y otras neoplasias sincrónicas/metacrónicas de los pacientes estudiados.

^[1]Análisis estadístico efectuado mediante la prueba de Chi-cuadrado (χ^2). NS: No Significativo.

1.4. Historia familiar

Siempre que fue posible la anamnesis incluyó un mínimo de tres generaciones (antepasados o descendientes) para la realización del árbol familiar. Los pacientes fueron clasificados siguiendo los criterios especificados en el apartado Material y Métodos.

Hubo 6 individuos jóvenes con mutación germinal en *APC* que fueron excluidos del estudio. De los 82 restantes, 35 (42,7%) se consideraron casos esporádicos, 29 (35,4%) mostraron agregación familiar de CCR, y 18 (21,9%) cumplieron criterios clínicos de Ámsterdam II (Tabla IV.6). Únicamente en 7 de estos 18 pacientes con sospecha de SL (55,6%), el diagnóstico fue confirmado molecularmente: en 2 de ellos el gen afectado fue *MLH1*, en 4 fue *MSH2* y en 1 fue *MSH6* (ver Apartado 2.3 de los Resultados).

En el grupo de población anciana, 77 pacientes (79,4%) se consideraron casos esporádicos, 19 (19,6%) mostraron agregación familiar de CCR, y únicamente 1 caso (1%) cumplió criterios clínicos de Ámsterdam II (Tabla IV.6). Curiosamente, este último caso resultó negativo tanto para el estudio molecular de los genes MMR, como para el estudio de IMS. Además, mostró ausencia de mutación en *BRAF*.

A continuación se resumen las características clínicas, patológicas y familiares más importantes de los pacientes incluidos en el estudio.

	JÓVENES (≤45 años)	ANCIANOS (≥70 años)
Número total de pacientes	88	97
Edad media [SD] (Rango de edades)	39,14 [5,58] (16-45)	77,82 [5,71] (70-92)
Hombre/Mujer	52 (59,1%)/36 (40,9%)	49 (50,5%)/48 (49,5%)
Localización:		
Colon derecho	21 (23,9%)	35 (36,1%)
Colon izquierdo	41 (46,6%)	26 (26,8%)
Recto y Unión Rectosigmoidea	26 (29,5%)	36 (37,1%)
Histología:		
Adenocarcinoma	70 (79,5%)	92 (94,8%)
Pólipos malignizados	18 (20,5%)	5 (5,2%)
Grado de diferenciación^[1]:		
Alto	23 (35,9%)	26 (32,5%)
Medio	32 (50,0%)	49 (61,3%)
Bajo	9 (14,1%)	5 (6,2%)
Producción de moco^[1]:		
Mucosecretor	17 (24,3%)	18 (19,6%)
Células en “anillo de sello”	4 (5,7%)	2 (2,2%)
Clasificación TNM:		
I	28 (31,8%)	18 (18,6%)
II	25 (28,4%)	38 (39,2%)
III	14 (15,9%)	19 (19,6%)
IV	21 (23,9%)	22 (22,6%)
Tumores sincrónicos:	9 (10,2%)	19 (19,6%)
Tumores metacrónicos:	3 (3,4%)	6 (6,2%)
ST	76,18±48,63	43,63±34,83
SLE	65,86±51,18	34,44±33,66
Recidiva tumoral^[2]	10/67 (14,9%)	11/75 (14,7%)
Mortalidad	26 (29,5%)	44 (45,4%)
Clasificación familiar^[3]:		
Casos esporádicos	35 (42,7%)	77 (79,4%)
Agregación familiar	29 (35,4%)	19 (19,6%)
Ámsterdam II positivo	18 (21,9%)	1 (1%)

Tabla IV.6. Resumen de las características clínicas, anatomopatológicas y familiares más importantes de los pacientes incluidos en el estudio. ^[1]Los porcentajes mostrados se basan en el número de datos disponible, puesto que para algunos pacientes en estadio IV únicamente se dispuso de biopsia, imposibilitando el estudio de otras variables. ^[2]Pacientes sin enfermedad a distancia en el momento de diagnóstico. ^[3]Los porcentajes mostrados en la población joven corresponden a los 82 individuos evaluados tras la exclusión de las 6 personas con diagnóstico de PAF. SD: desviación estándar. SLE: Supervivencia libre de enfermedad. ST: Supervivencia total.

2. ESTUDIO DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

2.1. Análisis de IMS

Se excluyeron de este estudio un total de 12 individuos (7 jóvenes y 5 ancianos). En el grupo de menor edad, 6 casos fueron excluidos por diagnóstico de PAF y 1 por no obtenerse tejido tumoral suficiente para su análisis. En el grupo de ancianos todas las exclusiones fueron debidas a la cantidad de muestra insuficiente. Finalmente, el estudio de IMS fue llevado a cabo sobre un total de 173 tumores (81 de población joven y 92 de población anciana). Se consideraron tumores IMS+ aquellos con dos o más marcadores del panel Bethesda alterados, y tumores IMS-/EMS el resto.

La mayor parte de las muestras analizadas mostró EMS, siendo el porcentaje de neoplasias IMS+ superior entre las personas de menor edad (Tabla IV.7). De los 13 pacientes jóvenes con resultado positivo en el estudio de IMS, 10 (76,9%) cumplían criterios Ámsterdam II y habían sido clasificados como individuos con sospecha de SL. Por el contrario, dicho porcentaje fue nulo en el caso de los pacientes ancianos (Tabla IV.7).

	JÓVENES (≤45 años)	ANCIANOS (≥70 años)
Número de pacientes	81	92
EMS	68 (83,9%)	80 (87%)
IMS	13 (16,1%)	12 (13%)
Esporádicos	1 (7,7%)	10 (83,3%)
Agregación familiar	2 (15,4%)	2 (16,7%)
Ámsterdam II positivo	10 (76,9%)	-

Tabla IV.7. Distribución de los pacientes con IMS en las dos poblaciones estudiadas. EMS: Estabilidad de microsatélites. IMS: Inestabilidad de microsatélites.

2.2. Inmunohistoquímica del sistema MMR

El análisis IHQ reveló la existencia de 13 pacientes jóvenes (16,1%) con ausencia de expresión en alguna de las proteínas del sistema MMR, existiendo una correlación total con los resultados obtenidos en la IMS (Tabla IV.8).

En el grupo de población anciana hubo 12 pacientes (13%) con ausencia de expresión de alguna de proteínas del sistema MMR, observándose también una

correlación total con los resultados obtenidos para la IMS. MLH1 fue la proteína más frecuentemente perdida (Tabla IV.8).

	JÓVENES (≤45 años)	ANCIANOS (≥70 años)
Número de pacientes	81	92
Expresión normal MMR	68	80
Ausencia de expresión MMR	13	12
Afectación global de las proteínas	13	12
MLH1	6 (46,2%)	10 (83,4%)
MSH2	6 (46,2%)	1 (8,3%)
MSH6	6 (46,2%)	4 (33,3%)
Afectación detallada por paciente	13	12
MLH1	6	8
MLH1 y MSH6	0	2
MSH2	1	0
MSH2 y MSH6	5	1
MSH6	1	1

Tabla IV.8. Resultados del análisis inmunohistoquímico de las proteínas del sistema de reparación de los errores de emparejamiento. MMR: *Mismatch repair genes*.

2.3. Estudio de los genes MMR

De los 13 pacientes jóvenes con resultado positivo de IMS, 7 presentaron una mutación patogénica en alguno de los genes del sistema MMR (3 en *MLH1* y 4 en *MSH2*), y otros 4 variantes de significado desconocido (2 en *MLH1*, 1 en *MSH2*, 1 en *MSH6*) (Tabla IV.9). Además 1 caso presentó hipermetilación del promotor de *MLH1*.

En población anciana únicamente dos pacientes mostraron afectación del sistema MMR, ambos por silenciamiento epigenético de *MLH1* (Tabla IV.9). En uno de estos pacientes, además, se detectaron cuatro cambios puntuales que afectaron a dos genes (mutación *missense* c.655A>G y variante intrónica c.1668-19A>G en *MLH1*, y variantes intrónicas c.3646+35_3646+38dup y c.3646+91T>C en *MSH6*). No obstante, los cuatro cambios correspondieron a variantes no patogénicas previamente descritas en la bibliografía (Cederquist *et al.* 2004, Drost *et al.* 2010, Plaschke *et al.* 2000, Tannergard *et al.* 1995), por lo que el SL fue razonadamente descartado.

Gen	Mutación	Tipo de mutación	Significado	Consecuencia en la proteína
<i>MLH1</i>	c.102_103delGA p.Glu34Aspfs	Delección	Patogénica	Introduce un codón de parada prematuro
<i>MLH1</i>	c.875T>C p.Leu292Pro	<i>Missense</i>	Desconocido	Evidencia insuficiente
<i>MLH1</i>	c.1459C>T p.Arg487Ter	Sin sentido	Patogénica	Introduce un codón de parada prematuro
<i>MLH1</i>	c.1459C>T p.Arg487Ter	Sin sentido	Patogénica	Introduce un codón de parada prematuro
<i>MLH1</i>	c.2103G>A p.Gln701His	<i>Missense</i>	Desconocido	G>delG en la última base del exón y en las 6 primeras bases del intrón
<i>MSH2</i>	Gran delección exones 1-3	Delección	Patogénica	Proteína no funcional
<i>MSH2</i>	c.929T>G p.Leu310Arg	<i>Missense</i>	Desconocido	Evidencia insuficiente
<i>MSH2</i>	Gran delección exón 8	Delección	Patogénica	Proteína no funcional
<i>MSH2</i>	c.1399G>T p.Glu467Ter	Sin sentido	Patogénica	Introduce un codón de parada prematuro
<i>MSH2</i>	c.547C>T p.Gln183Ter	Sin sentido	Patogénica	Introduce un codón de parada prematuro
<i>MSH6</i>	c.3557-2dup	Duplicación	Desconocido	Evidencia insuficiente

Tabla IV.9. Listado de las mutaciones y variantes de significado desconocido halladas en los pacientes jóvenes con resultado positivo de IMS.

3. GRADO DE INESTABILIDAD CROMOSÓMICA

3.1. Índice de inestabilidad genómica (GII)

Como primera aproximación a la evaluación cuantitativa del grado de INC, se procedió a calcular el GII para cada una de las poblaciones. Los 6 individuos jóvenes con diagnóstico de PAF fueron excluidos del estudio, junto a otros 33 en los que la cantidad de muestra resultó insuficiente (22 jóvenes y 11 ancianos), por lo que la determinación del GII fue llevada a cabo finalmente sobre un total de 146 muestras (60 jóvenes y 86 ancianos).

El GII normal mostró valores ligeramente superiores entre los pacientes jóvenes, aunque la diferencia con respecto a los ancianos no resultó significativa (Tabla IV.10). Tampoco se observaron diferencias en las ganancias de material genético, si bien éstas predominaron discretamente entre los jóvenes (Tabla IV.10). Por el contrario, las pérdidas mostraron frecuencias significativamente más altas entre los pacientes ancianos ($p=0,004$) (Tabla IV.10).

	JÓVENES (≤ 45 años)	ANCIANOS (≥ 70 años)	p-valor ^[1]
Número de pacientes	60	86	-
GII ganancias	0,15106 [0,14927]	0,14706 [0,16462]	NS
GII pérdidas	0,16546 [0,18246]	0,20019 [0,21119]	0,004
GII normal	0,68347 [0,28335]	0,65274 [0,32588]	NS

Tabla IV.10. Índices de inestabilidad genómica obtenidos en el estudio de ambas poblaciones. Los números mostrados corresponden al valor medio obtenido a partir de los individuos incluidos dentro de cada grupo. Los datos entre corchetes corresponden a la desviación estándar. ^[1]Análisis estadístico efectuado mediante la prueba t de Student de dos colas. GII: Índice de inestabilidad genómica. NS: No Significativo.

La representación gráfica del GII exhibió perfiles muy similares en ambos grupos, sin embargo, la diferenciación entre ganancias y pérdidas evidenció un claro predominio de las últimas en la población de más edad (Figuras IV.2 y IV.3).

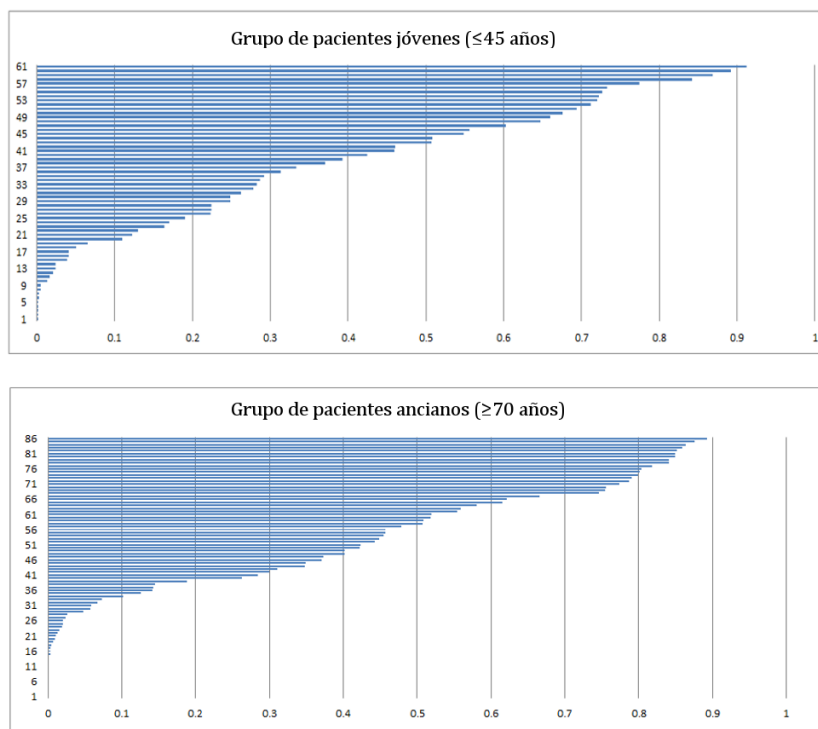


Figura IV.2. Representación gráfica del índice de inestabilidad genómica (GII) total en ambas poblaciones.

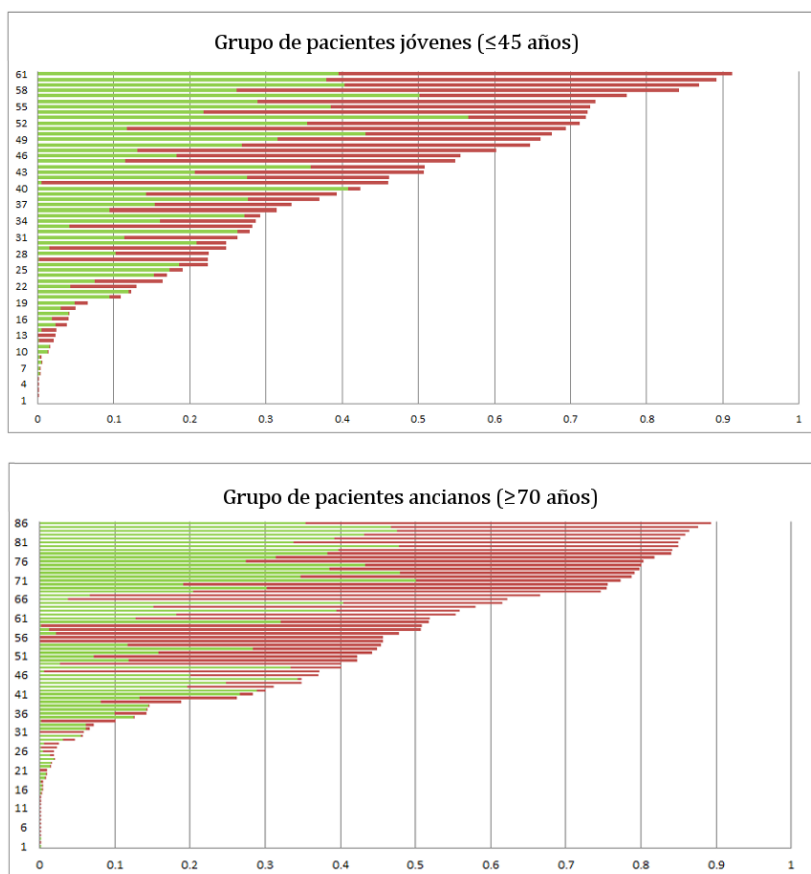


Figura IV.3. Representación gráfica del índice de inestabilidad genómica (GII) diferenciando el tipo de alteración. Las ganancias aparecen representadas en color verde, mientras que las pérdidas se muestran en color rojo.

3.2. Patrón global de inestabilidad cromosómica

En las dos poblaciones se identificó un elevado grado de inestabilidad, y de los 146 tumores estudiados, únicamente hubo 4 casos (1 joven y 3 ancianos) en los que no fueron detectados cambios genómicos mediante a-CGH. Los 4 mostraron histología de adenocarcinoma (estadios II, III, IV y IV), 2 se asentaron en el colon derecho y 2 en el izquierdo, y sólo en 1 caso (paciente anciano) se observó agregación familiar. La IMS también estuvo presente en 1 único caso (paciente anciano), que casualmente no coincidió con el que presentaba antecedentes familiares de la enfermedad.

Los 142 tumores restantes (97,3%) estuvieron caracterizados por una elevada INC, con una cifra media de 123,21 alteraciones por muestra. Globalmente, se observó un porcentaje superior de alteraciones en el grupo de mayor edad, en los que además, la proporción de pérdidas fue superior a la de ganancias (Figura IV.4).

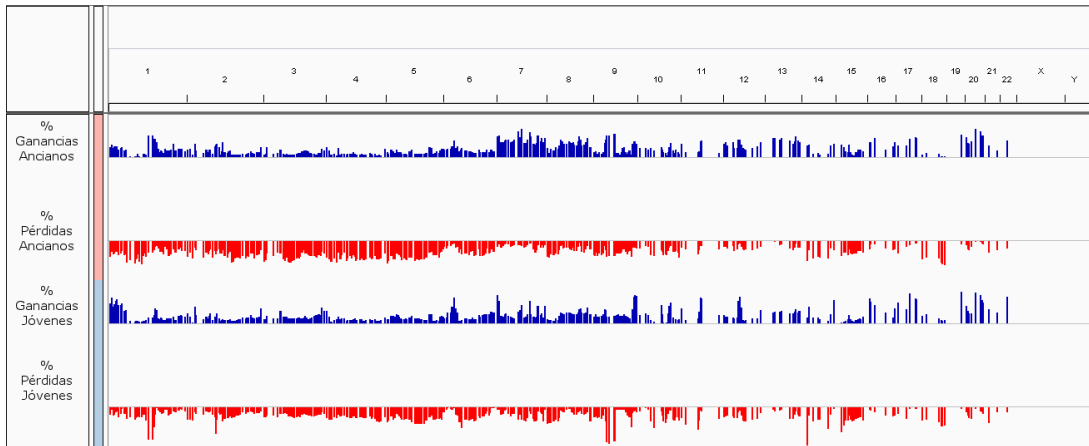


Figura IV.4. Frecuencia de ganancias (azul) y pérdidas (rojo) obtenidas para cada grupo de edad. El número de cromosoma se representa en el eje X, y la frecuencia de alteración en el eje Y.

Seguidamente se generaron gráficos más pormenorizados que además del porcentaje de alteración, señalaban las localizaciones donde se confinaban los cambios. Mediante estas representaciones se identificaron algunas regiones similarmente alteradas en ambos grupos, así como otras más específicas de cada uno de ellos (Figura IV.5).

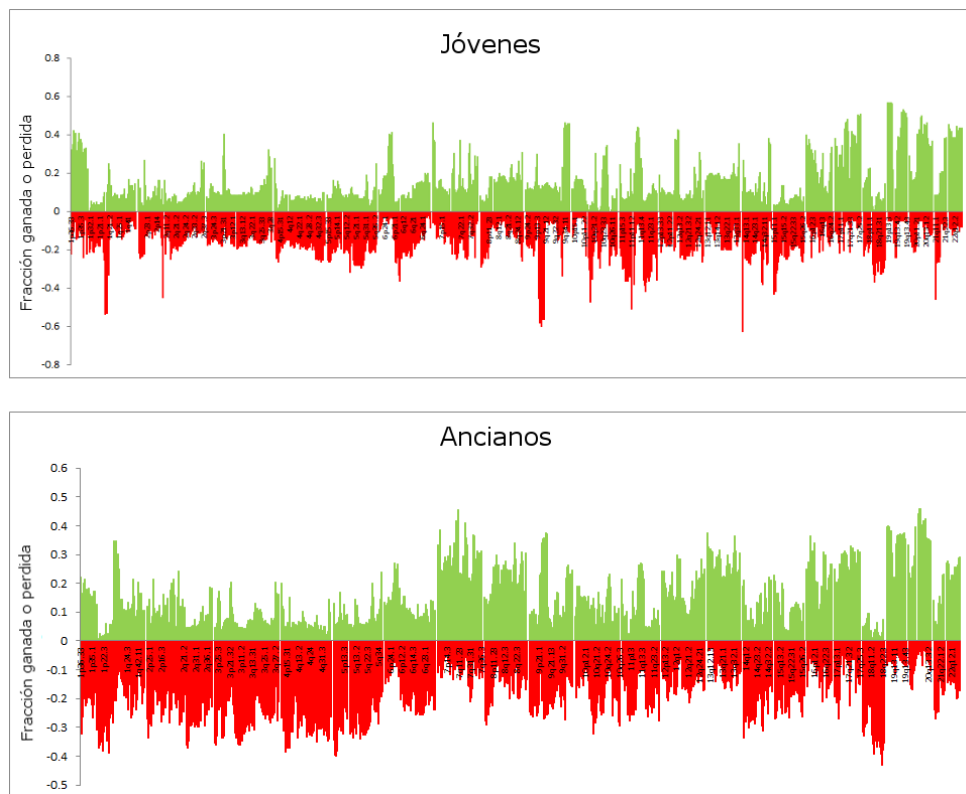


Figura IV.5. Gráfico de frecuencia que recoge los perfiles de inestabilidad observados para cada población y las bandas cromosómicas donde se localizan las alteraciones. En color verde se representan las ganancias y en color rojo las pérdidas.

3.3. Número y tipo de CNV por tumor

No se obtuvieron diferencias respecto al número medio de alteraciones por tumor, aunque la cifra resultó ser más alta entre los pacientes ancianos (Tabla IV.11). Tampoco se alcanzó la significación estadística respecto al tipo de alteración (ganancias o pérdidas), pese a que cada grupo mostró predominio de uno de ellos (pérdidas en el caso de los jóvenes y ganancias en el de los ancianos) (Tabla IV.11). Sin embargo, cuando las alteraciones fueron clasificadas en función de su tamaño con respecto a una longitud de referencia fijada en 1Mb, se observó que las ganancias inferiores a dicha longitud eran significativamente más comunes dentro de la población anciana ($p=0,007$) (Tabla IV.11) (Figuras IV.6A y IV.6B).

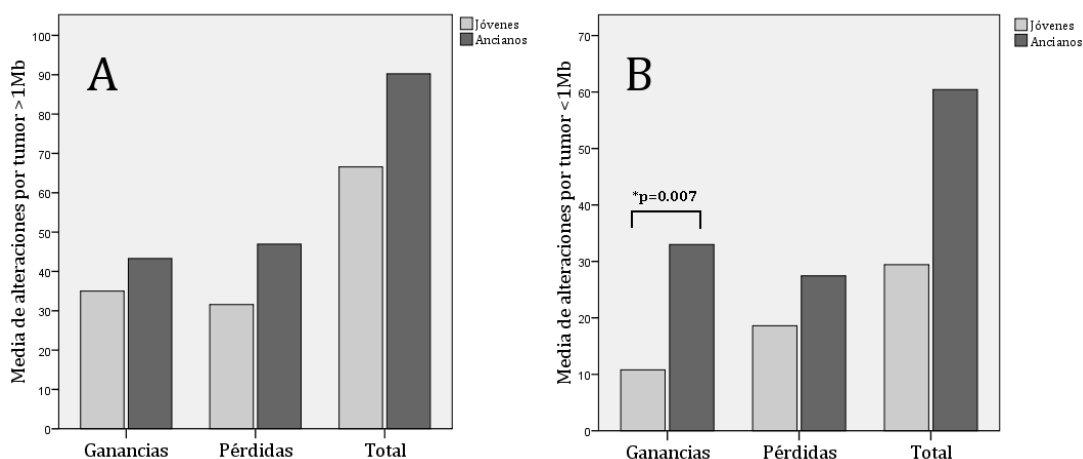


Figura IV.6. Número medio de segmentos alterados por tumor clasificados en función de su tamaño superior o inferior a 1Mb. A la izquierda (A) se representan las alteraciones mayores que 1Mb y a la derecha (B) las inferiores. Las barras claras corresponden al grupo de población joven, mientras que las barras oscuras corresponden al grupo de población anciana. Mb: Megabase.

3.4. Frecuencia de las alteraciones: MCR

En ambos grupos se identificaron regiones recurrentemente alteradas. Estas regiones, habitualmente conocidas como MCR, fueron definidas mediante el cálculo de un umbral de referencia establecido a partir de los resultados del análisis. En este trabajo dicho umbral quedó fijado en un 30%, considerándose recurrentes todas aquellas alteraciones con frecuencias superiores o iguales a dicho porcentaje. La distribución de MCR a lo largo del genoma siguió un patrón heterogéneo a lo largo de los diferentes autosomas, evidenciando la falta de aleatoriedad en la generación de las mismas (Figura IV.7).

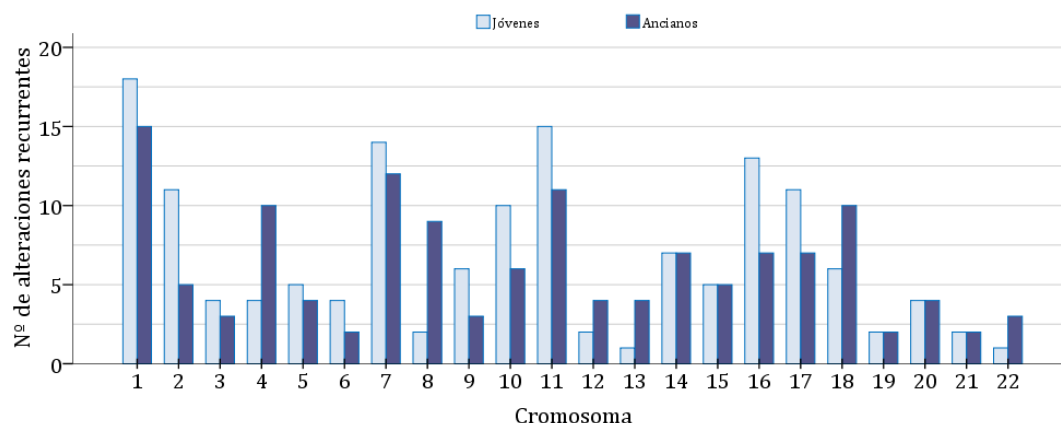


Figura IV.7. Distribución de las regiones recurrentemente alteradas a lo largo de los autosomas. En azul claro se representa la población joven y en azul oscuro la anciana.

Para la población joven fueron contabilizadas un total de 147 MCR (77 pérdidas y 70 ganancias) que abarcaron una longitud genómica de 636,92 Mb (Tabla IV.11, Anexo 3). En el caso de la población anciana, la cifra de MCR disminuyó hasta un total de 135 (78 pérdidas y 57 ganancias), que comprendieron 590,87 Mb del genoma (Tabla IV.11, Anexo 4).

	JÓVENES (≤ 45 años)	ANCIANOS (≥ 70 años)	p-valor ^[1]
Número de pacientes	60	86	-
Media de alteraciones/tumor	95,80 (72,50)	150,62 (52,50)	NS
Ganancias totales	45,60 (26,00)	75,87 (16,00)	NS
>1Mb	35,00 (20,00)	43,29 (11,00)	NS
<1Mb	10,80 (7,50)	32,99 (9,00)	0,007
Pérdidas totales	50,20 (44,00)	74,41 (23,00)	NS
>1Mb	31,58 (18,00)	46,95 (15,00)	NS
<1Mb	18,62 (13,00)	27,45 (6,00)	NS
Número de recurrentes^[2]	147	135	NS
Ganancias	70	57	NS
Pérdidas	77	78	NS
Longitud de recurrentes^[2][SD]	636,92 [6,64]	590,87 [6,42]	NS
Ganancias [SD]	379,26 [6,70]	293,09 [5,99]	NS
Pérdidas [SD]	257,66 [6,48]	297,78 [6,71]	NS

Tabla IV.11. Descripción global de la inestabilidad genómica observada en la totalidad de los tumores analizados. Los datos mostrados entre paréntesis representan los valores de la mediana. Los datos representados entre corchetes representan la desviación estándar. ^[1]Análisis estadístico efectuado mediante la prueba t de Student de dos colas. ^[2]Regiones que mostraron frecuencias de alteración iguales o superiores al 30%. GII: Índice de inestabilidad genómica. Mb: Megabase. NS: No Significativo. SD: Desviación Estándar.

Las alteraciones recurrentes fueron más frecuentes en los jóvenes, llegando a alcanzar frecuencias del 61% en algunos casos. Entre ellas, destacaron las pérdidas en 1p36 (61%), 14q11 (61%), 5q13 (57%), 9p13-q21 (57%), 1p12-q21 (53%) y 11p11-q12 (50%), y las ganancias en 19p13-p12 (57%), 19q13 (52%) y 17q24-q25 (50%) (Anexo 3). Por el contrario, ninguna alteración mostró frecuencia superior al 47% entre la población anciana (Anexo 4), constituyendo las pérdidas en 14q11 (45%) y 5q13 (44%), y las ganancias en 19p13-p12 (47%), 20p11-q11 (47%), 19q13 (42%), 7q21-q22 (42%), y 7q11 (40%), los cambios más comunes.

3.5. CNV comunes y/o potencialmente grupo-específicas

Una vez analizados los perfiles generales de INC asociados a cada población, se procedió a identificar las CNV específicamente relacionadas con la edad de inicio de la enfermedad. Se consideraron CNV grupo-específicas aquellas con $p < 0,05$ y $FDR < 0,09$.

Un total de 24 segmentos cumplieron los criterios de grupo-especificidad establecidos previamente, todos ellos confinados en 6 únicos cromosomas (Tabla IV.12). La mayor parte fue predominante en la población joven, pudiendo establecer tres categorías en función del grado de disparidad observado entre los porcentajes de frecuencia vinculados a cada población (Tabla IV.12):

- a) Alteraciones muy frecuentes en jóvenes y muy infrecuentes en ancianos: grado de disparidad muy alto. Incluyeron ganancias en 1p35.2-p35.1 y 3p21.31-p21.1, y pérdidas en 1p35.2-p35.1, 7q11.21, 9p13.1-q21.1, 16p13.11 y 16p12.3 (Tabla IV.12).
- b) Alteraciones más frecuentes en jóvenes que en ancianos: grado de disparidad alto. Esta categoría únicamente incluyó pérdidas que se localizaron en 1p36.33, 1p12-p11.2, 1q21.1, 1q21.1-q21.2, 3p21.31-p21.1, 7q22.1, 7q35 y 14q11.1-q11.2 (Tabla IV.12).
- c) Alteraciones más frecuentes en ancianos que en jóvenes: grado de disparidad alto. Sólo hubo tres segmentos que demostrasen mayoría significativa entre la población anciana. Todos correspondieron a ganancias y se encontraron localizados en el cromosoma 7 (7q11.23, 7q22.1 y 7q11.22) (Tabla IV.12).

Citobanda	Región	Frecuencia Jóvenes ^[1]	Frecuencia ancianos ^[1]	p-valor ^[2]	FDR ^[3]
Ganancias					
1p35.2-p35.1	31075659-3366490	0,333	0,058	0,0001	0,052
1p35.2-p35.1	31181778-33667564	0,283	0,035	0,0003	0,062
3p21.31-p21.1	46988350-53030975	0,350	0,093	0,0003	0,062
7q11.23	76461459-76503690	0,133	0,430	0,0003	0,062
7q22.1	102049904-102064180	0,150	0,442	0,0004	0,072
7q11.22	72110621-72172516	0,217	0,512	0,0005	0,086
Pérdidas					
1p36.33	37196-782679	0,450	0,163	0,0002	0,062
1p12-p11.2	120374173-143895512	0,517	0,198	0,0001	0,052
1p35.2-p35.1	31073820-33664190	0,317	0,058	0,0002	0,057
1q21.1	142613630-143895512	0,517	0,198	0,0001	0,052
1q21.1	144500777-144849414	0,450	0,151	0,0001	0,054
1q21.1-q21.2	146107562-147962872	0,433	0,163	0,0005	0,086
3p21.31-p21.21	47076908-53030975	0,383	0,105	0,0002	0,055
7q22.1	101904918-102096491	0,367	0,105	0,0003	0,062
7q11.21	64221857-64990939	0,350	0,093	0,0003	0,062
7q11.21	73803410-73855403	0,383	0,116	0,0003	0,062
7q35	143528314-143704617	0,450	0,174	0,0004	0,083
9p13.1-p11.2	38987240-45095186	0,433	0,151	0,0003	0,062
9p13.1-q21.12	39054171-70202700	0,350	0,093	0,0003	0,062
14q11.1-q11.2	18407780-19124606	0,617	0,302	0,0002	0,062
16p13.11	14778511-15336921	0,367	0,093	0,0002	0,055
16p13.11	16245207-16276991	0,350	0,093	0,0003	0,062
16p13.11	16427307-16435895	0,367	0,093	0,0002	0,055
16p12.3	18038778-18594513	0,317	0,047	0,0001	0,052

Tabla IV.12. Listado de las CNV que cumplieron el criterio de grupo-especificidad establecido ($p < 0,05$ y $FDR < 0,09$). En color verde se representan las ganancias y en color rojo las pérdidas. ^[1]Análisis estadístico efectuado mediante la prueba t de Student de dos colas. ^[2]Análisis estadístico efectuado mediante el Test exacto de Fisher. ^[3]FDR calculado para cada p-valor según describieron Benjamini y Hochberg (Benjamini y Hochberg, 1995). FDR: *False discovery rate*.

3.6. Aneuploidía

Se conoce con el nombre de aneuploidía al término que hace referencia a las alteraciones que añaden o eliminan cromosomas enteros. Puesto que estos cambios pueden afectar a cromosomas que alberguen genes relacionados con los procesos oncogénicos, la aneuploidía constituye un fenómeno estrechamente relacionado con el cáncer. Es sabido que las muestras tumorales suelen presentar dotaciones cromosómicas alteradas sujetas a un patrón de cambios determinado. Por este motivo, se procedió a caracterizar el perfil de aneuploidía manifestado por las dos poblaciones incluidas en este estudio, como siguiente paso en la evaluación de su INC.

Considerando todo el conjunto de muestras analizadas (146 tumores), un total de 98 casos (67,1%) mostró ganancias o pérdidas de cromosomas enteros. Se alcanzó una cifra global de 467 alteraciones, de las que 233 (49,9%) correspondieron a pérdidas y 234 (50,1%) a ganancias. Entre las alteraciones más frecuentes se encontraron las pérdidas de los cromosomas 4, 5, 14, 15 y 18, y las ganancias de los cromosomas 7, 13, 17, 19, 20 y 22 (Figura IV.8A).

Cuando se hizo la diferenciación de los grupos en función de la edad de diagnóstico, se observó que 57 de los 98 casos que habían mostrado aneuploidía (58,2%) correspondían a la población joven y 41 (41,8%) a la anciana. La proporción de pacientes con aneuploidía fue similar en ambos grupos (68,3% en jóvenes y 66,3% en ancianos), con mayor número de cromosomas ganados (132 vs. 102) y perdidos (157 vs. 76) entre las personas de mayor edad. Las aneuploidías más frecuentes entre la población joven correspondieron a las ganancias de los cromosomas 13 (18%), 17 (20%), 19 (35%) y 22 (33%), y a las pérdidas de los cromosomas 4 (15%), 15 (15%) y 18 (17%) (Figura IV.8B). Por su parte, las alteraciones más frecuentes en el grupo de ancianos correspondieron a las ganancias de los cromosomas 7 (18%), 13 (19%), 19 (31%), 20 (20%) y 22 (18%), y a las pérdidas de los cromosomas 18 (24%) y 4 (16%) (Figura IV.8C).

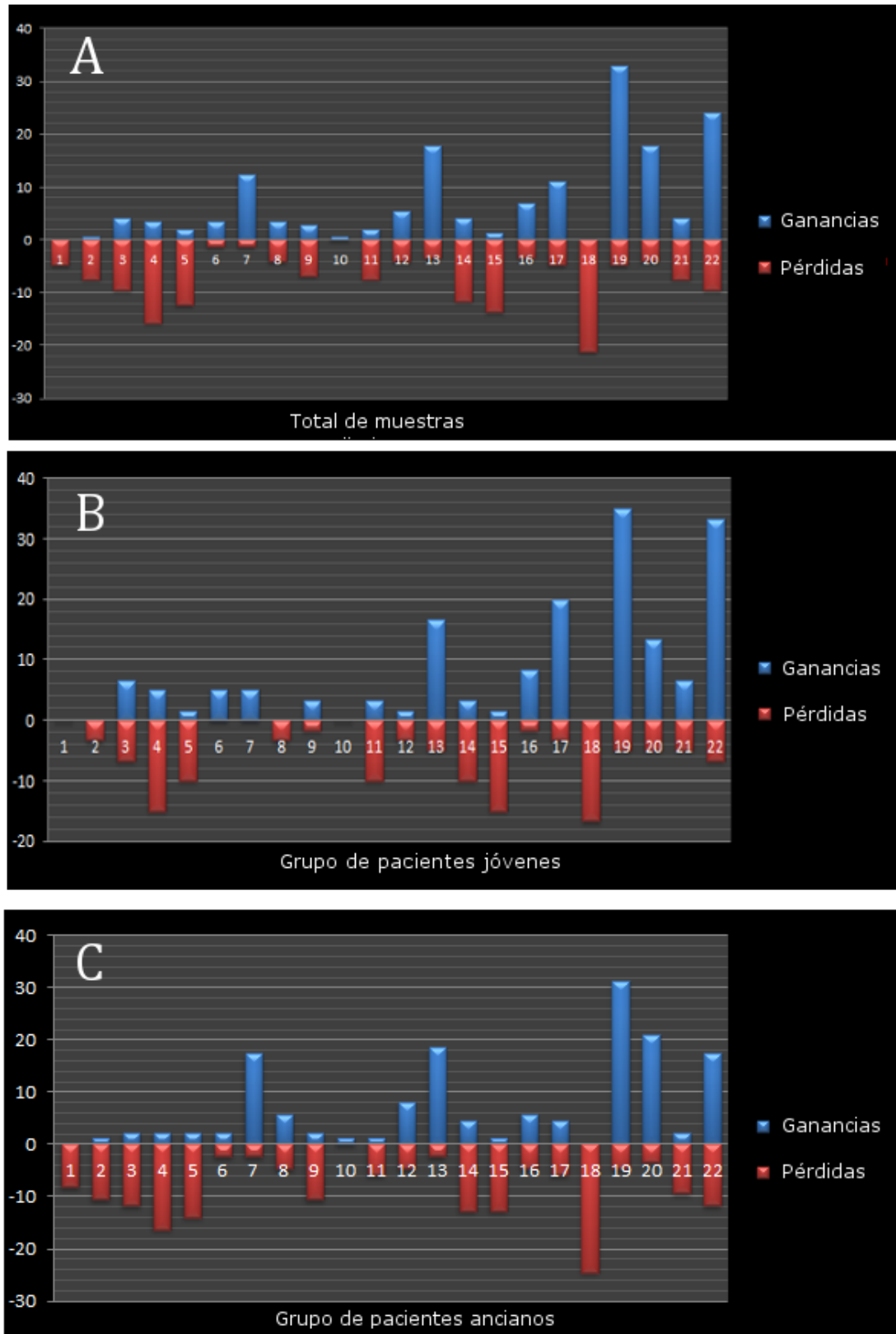


Figura IV.8. Perfil de aneuploidía observado globalmente en la totalidad de muestras estudiadas (A) y de manera independiente en población joven (B) y anciana (C). En color azul se representan las ganancias y en color rojo las pérdidas.

4. ANÁLISIS NO SUPERVISADO

4.1. Agrupación jerárquica no supervisada global

Las técnicas de *clustering* constituyen herramientas de agrupamiento no supervisado que permiten la agregación de elementos con características comunes desconocidas dentro en un mismo conjunto. En este estudio se llevó a cabo una agrupación jerárquica no supervisada de los resultados obtenidos mediante a-CGH, con el propósito de estudiar posibles asociaciones entre los patrones de inestabilidad genómica y la edad de inicio de la enfermedad. La agrupación fue realizada en base al estado GNL de cada tumor mediante la aplicación de algoritmos SOTA (Figura IV.9).

El análisis no supervisado de las 146 muestras diferenció claramente dos grupos (*cluster 1* y *cluster 2*) (Figura IV.9), cada uno de los cuales mostró predominio de tumores procedentes de una de las dos poblaciones. El primer grupo (*cluster 1*) estuvo compuesto por un menor número de muestras e incluyó un mayor porcentaje de tumores de inicio temprano (Tabla IV.13, Figura IV.9). Por el contrario, el segundo grupo (*cluster 2*) estuvo compuesto por un mayor número de muestras, en su mayoría procedentes de la población anciana (Tabla IV.13, Figura IV.9).

	TOTAL	JÓVENES (≤ 45 años)	ANCIANOS (≥ 70 años)
Número de pacientes	146	60	86
<i>Cluster 1</i>	55 (37,7%)	41 (74,5%)	14 (25,5%)
<i>Cluster 2</i>	91 (62,3%)	19 (20,9%)	72 (79,1%)

Tabla IV.13. Composición de los grupos diferenciados mediante agrupamiento jerárquico no supervisado de los 146 tumores analizados.

El *cluster 1* se caracterizó por un GII^{total} superior que también incluyó un mayor GII^{ganancias} y un mayor GII^{pérdidas} (Tabla IV.14). Sin embargo, la cifra media de alteraciones por muestra fue significativamente más alta en el caso del *cluster 2* (133,36 vs. 118,84; $p=0,005$). No se observaron diferencias en relación a la IMS (52,9% en el *cluster 1* y 47,1% en el *cluster 2*), pero sí en cuanto a la tasa de mutación en *BRAF* (Tabla IV.14).

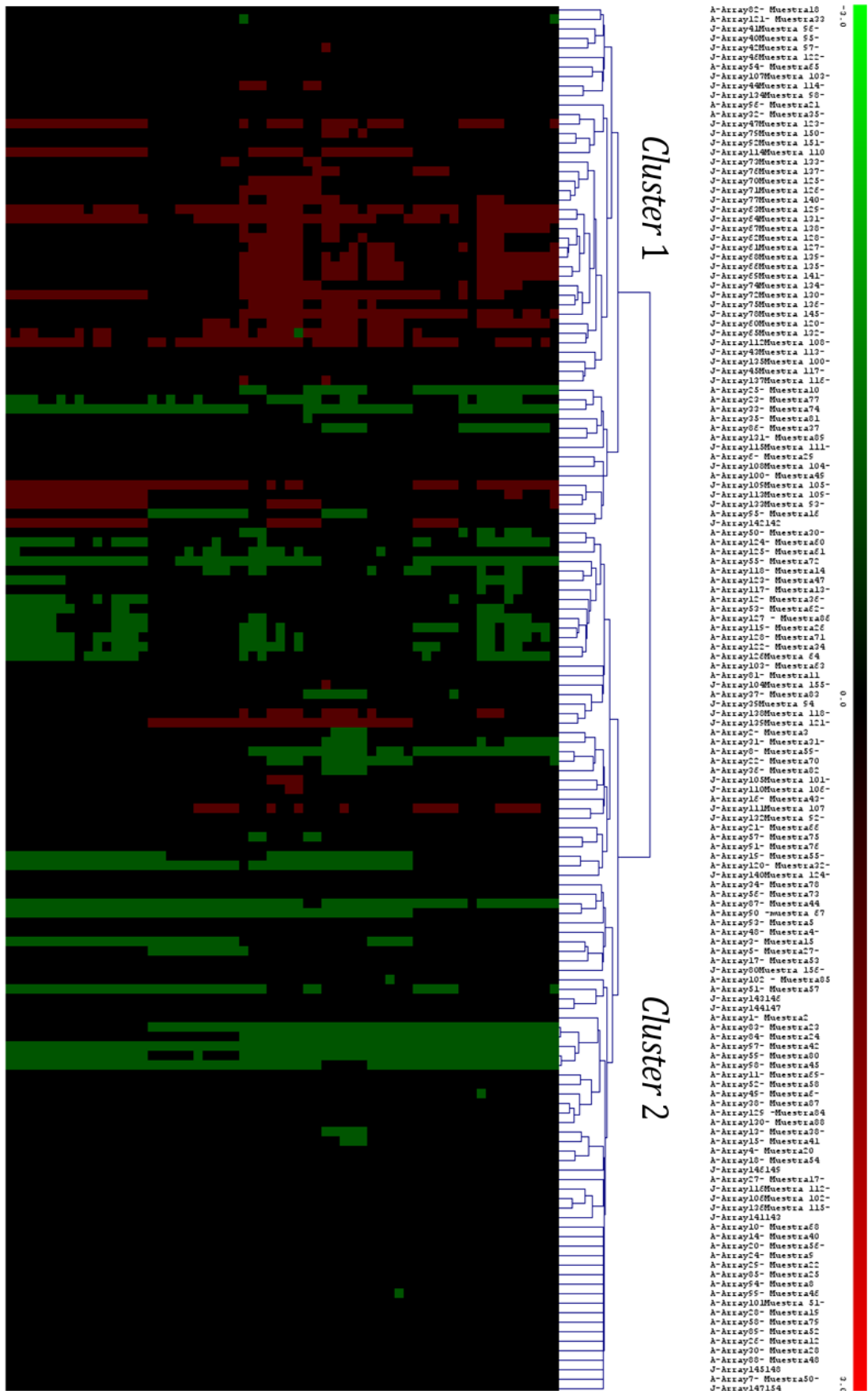


Figura IV.9. Agrupación jerárquica no supervisada obtenida a partir de los datos a-CGH de los 146 tumores analizados.

IV. RESULTADOS

	<i>Cluster 1</i>	<i>Cluster 2</i>	p-valor ^[1]
Nº de tumores	55	91	-
GII total			
Máximo	0,91256	0,89306	-
Mínimo	0,00012	0,00001	-
Media [SD]	0,35260 [0,28103]	0,32378 [0,32495]	NS
Promedio CNV/tumor	118,84 (91,00)	133,36 (33,00)	0,005
Promedio aneuploidía	2,96 (3,00)	3,48 (2,00)	NS
GII ganancias			
Máximo	0,56532	0,50094	-
Mínimo	0,00005	0,00001	-
Media [SD]	0,16348 [0,15421]	0,13976 [0,16039]	NS
Promedio CNV gan./tumor	59,42 (40,00)	65,86 (13,00)	0,015
>1Mb	41,35 (27,00)	38,55 (7,00)	0,020
<1Mb	17,89 (9,00)	27,31 (6,00)	NS
GII pérdidas			
Máximo	0,58434	0,59903	-
Mínimo	0,00002	0,00001	-
Media [SD]	0,18911 [0,19423]	0,18398 [0,20439]	NS
Promedio CNV pérd./tumor	59,42 (49,00)	67,51 (20,00)	0,011
>1Mb	37,42 (20,00)	42,58 (12,00)	0,026
<1Mb	22,00 (16,00)	24,92 (6,00)	NS
IMS	9	8	
Jóvenes	7	3	NS ^[2]
Ancianos	2	5	
Mutación en <i>BRAF</i>	5	0	0,003

Tabla IV.14. Datos de inestabilidad genómica para los *clusters* 1 y 2 diferenciados dentro de la agrupación jerárquica no supervisada de los 146 tumores. Los datos mostrados entre paréntesis corresponden al valor de la mediana. ^[1]Análisis estadístico efectuado mediante la prueba U de Mann-Whitney. ^[2]Análisis estadístico efectuado mediante la prueba de Chi-cuadrado (χ^2). CNV: *Copy number variations*. Gan.: Ganancias. GII: Índice de inestabilidad genómica. IMS: Inestabilidad de microsatélites. Mb: Megabase. NS: No Significativo. Pérd.: Pérdidas. SD: Desviación Estándar.

Hubo un total de 154 alteraciones recurrentes (119 ganancias y 35 pérdidas) con una distribución diferente entre los *clusters* (Anexo 5). Resultó muy homogénea en el caso de las ganancias (60 en el *cluster* 1 vs. 59 en el *cluster* 2) pero no en el de las pérdidas, claramente mayoritarias dentro del *cluster* más inestable (31 en el *cluster* 1 vs. 4 en el *cluster* 2). Las frecuencias más altas se relacionaron con las ganancias en 19p13.3 (60%), y las pérdidas en 1p36.33 (57%)

y 14q11.1-q11.2 (60%) en el caso del *cluster* 1, y con las ganancias en 19p13.3 (58%) y 19q13.33-q13.41 (55%) en el caso del *cluster* 2.

4.1.1. Correlación anatomoclínica y molecular en el *cluster* global

Para evitar el sesgo ocasionado por la diferencia de edad existente entre los dos *clusters*, no se efectuó la comparación de variables como la ST, SLE o la tasa de mortalidad. En el resto de variables, el *cluster* 1 presentó una mayor proporción de tumores localizados en el lado izquierdo (43,6% vs. 34,1%), pobremente diferenciados (10,4% vs. 5,6%) y con presencia de mucina (30% vs. 15,9%). Como era de esperar, dicho *cluster* también incluyó una menor proporción de tumores de naturaleza esporádica (49,1% vs. 75,8%), un mayor porcentaje de pacientes con SL (85,7% vs. 14,3%) y un mayor promedio de pólipos (mediana de 2,74 vs. 4,33). No se observaron diferencias significativas en las variables restantes.

La comparación de los tumores discordantes de cada *cluster* con sus homólogos mayoritarios en el *cluster* opuesto apenas reveló diferencias. Para los pacientes jóvenes sólo se alcanzó la significación estadística al evaluar el porcentaje de células en “anillo de sello”, más frecuentes en el *cluster* 2 ($p=0,016$). En general, los tumores del *cluster* 1 mostraron mayor tendencia a la localización derecha (26,8% vs. 5,3%), la recidiva tumoral (17,1% vs. 0%) y los bajos grados de diferenciación (11,1% vs. 0%). Tampoco se observaron diferencias en el caso de los ancianos estratificados dentro de los *clusters* 1 y 2, alcanzando la significación estadística únicamente al evaluar la tasa de mutación en *BRAF* (21,4% en el *cluster* 1 vs. 1,4% en el *cluster* 2; $p=0,001$). No obstante, merece la pena subrayar el mayor porcentaje de fallecimientos (64,3% vs. 45,8%) y la menor tasa de recidivas (7,1% vs. 16,7%) entre los ancianos del *cluster* 1.

En vista de estos resultados, las dos poblaciones fueron sometidas de forma independiente a métodos de análisis no supervisados.

4.2. Agrupación jerárquica no supervisada de los adultos jóvenes

La primera rama del análisis no supervisado estratificó los tumores en dos grupos principales: *cluster* A ($n=38$) y *cluster* B ($n=22$) (Figura IV.10). A continuación, ambos *clusters* fueron comparados con el objeto de identificar diferencias significativas entre ellos.

En términos estadísticos, los dos *clusters* no difirieron con respecto al grado de inestabilidad o el número de segmentos alterados, aunque cabe destacar que el *cluster* B presentó un GII^{total} ligeramente superior (0,34249 vs. 0,30149) que asoció un menor número de CNV por muestra (80,68 vs. 104,55) (Tabla IV.15). No ocurrió lo mismo con respecto al promedio de afectación de cromosomas enteros, significativamente superior dentro del *cluster* B (4,24 vs. 2,35; $p=0,026$) (Tabla IV.15).

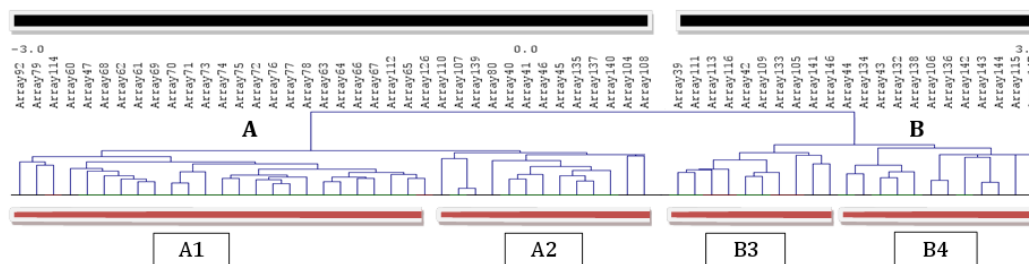


Figura IV.10. Agrupación jerárquica no supervisada de los 60 adultos jóvenes.

En el caso del *cluster* A destacaron las ganancias en 19p13 (72%) y las pérdidas en 5q13 (67%), mientras que las ganancias en 8q22-q24 y 13q13-q14 (41%), y las pérdidas en 12q24 (50%) lo hicieron en el *cluster* B. Además, hubo un total de 63 alteraciones recurrentes (51 ganancias y 12 pérdidas) con afectación significativamente diferencial entre los dos *clusters* (Anexo 6). Su distribución resultó marcadamente heterogénea, con predominio de ganancias en el *cluster* A (36 vs. 15) y todas las pérdidas confinadas en el *cluster* B.

El *cluster* A se dividió a su vez en dos subgrupos muy dispares en cuanto a su grado de INC: el *cluster* A1 ($n=25$) y el *cluster* A2 ($n=13$) (Figura IV.10), cuyas características de inestabilidad se encuentran recogidas en la Tabla IV.16. El subgrupo A1 mostró valores superiores para todos los marcadores de INC, acumulando la práctica totalidad de la inestabilidad asociada al *cluster* A. Así, tanto el GII^{total} (0,40010 vs. 0,11184; $p=0,001$), como el GII^{ganancias} (0,18963 vs. 0,03881; $p=0,0001$), el GII^{pérdidas} (0,21047 vs. 0,07303; $p=0,030$) y el promedio de CNV por muestra (135,16 vs. 45,69; $p=0,002$) fueron significativamente superiores en A1. Por el contrario, dicho *cluster* incluyó una menor proporción de tumores con IMS, hecho en parte esperable dado su mayor grado de INC (Tabla IV.16). En el *cluster* A1 destacaron las ganancias en 19p13-p12 y 19q13 (96%), y las pérdidas en

11q14-q23 (64%). En cambio, en el *cluster* A2 únicamente las pérdidas en 2q12-q13 (64%) mostraron recurrencias superiores al 15%.

	<i>Cluster A</i>	<i>Cluster B</i>	p-valor ^[1]
Nº de tumores	38	22	-
GII total			
Máximo	0,89196	0,91256	-
Mínimo	0,00001	0,00012	-
Media [SD]	0,30149 [0,28065]	0,34249 [0,29271]	NS
Promedio CNV/tumor	104,55 (87,50)	80,68 (52,50)	NS
Promedio aneuploidía	2,35 (2,00)	4,24 (4,00)	0,026
GII ganancias			
Máximo	0,40747	0,56532	-
Mínimo	0,00001	0,00010	-
Media [SD]	0,13803 [0,12411]	0,17357 [0,18608]	NS
Promedio CNV gan./tumor	51,47 (32,00)	35,45 (18,00)	NS ^[2]
>1Mb	40,42 (25,00)	25,36 (11,00)	NS ^[2]
<1Mb	11,05 (8,00)	9,64 (5,50)	NS ^[2]
GII pérdidas			
Máximo	0,58159	0,51717	-
Mínimo	0,00001	0,00002	-
Media [SD]	0,16345 [0,20196]	0,16893 [0,14713]	NS ^[2]
Promedio CNV pérd./tumor	53,08 (47,50)	45,23 (29,00)	NS
>1Mb	31,63 (17,50)	31,50 (23,00)	NS ^[2]
<1Mb	21,45 (15,50)	13,73 (7,50)	NS
IMS	5	5	NS ^[3]
Mutación en <i>BRAF</i>	0	1	NS ^[3]

Tabla IV.15. Datos de inestabilidad genómica para los *clusters* A y B diferenciados dentro de la agrupación jerárquica no supervisada de los tumores de inicio temprano. Los datos mostrados entre paréntesis corresponden al valor de la mediana. ^[1]Análisis estadístico efectuado mediante la prueba t de Student de dos colas. ^[2]Análisis estadístico efectuado mediante la prueba U de Mann-Whitney. ^[3]Análisis estadístico efectuado mediante la prueba de Chi-cuadrado (χ^2). CNV: *Copy number variations*. Gan.: Ganancias. GII: Índice de inestabilidad genómica. IMS: Inestabilidad de microsatélites. Mb: Megabase. NS: No Significativo. Pérd.: Pérdidas. SD: Desviación Estándar.

El *cluster* B también se dividió en dos subgrupos: el *cluster* B3 (n=10) y el *cluster* B4 (n=12) (Figura IV.10), aunque en este caso los perfiles de inestabilidad no difirieron de forma tan acusada. No se observaron diferencias significativas desde el punto de vista estadístico, si bien el *cluster* B3 manifestó valores superiores para todos los marcadores de INC. Así, tanto el GII total (0,39149 vs. 0,30166), como el

IV. RESULTADOS

GII ganancias (0,19251 vs. 0,15778), GII pérdidas (0,19898 vs. 0,14388) y promedio de alteraciones por tumor (95,30 vs. 68,50) fueron superiores en B3. En contra de lo que cabía esperar, todos los tumores IMS del *cluster* B también se encontraron incluidos en dicho subgrupo, alcanzando la significación estadística (p=0,010) (Tabla IV.17).

	<i>Cluster</i> A1	<i>Cluster</i> A2	p-valor ^[1]
Nº de tumores	25	13	-
GII total			
Máximo	0,89196	0,71146	-
Mínimo	0,00001	0,00052	-
Media [SD]	0,40010 [0,26115]	0,11184 [0,21733]	0,001
Promedio CNV/tumor	135,16 (118,00)	45,69 (42,00)	0,002
Promedio aneuploidía	2,83 (3,00)	1,46 (0,00)	NS
GII ganancias			
Máximo	0,40747	0,35419	-
Mínimo	0,00001	0,00025	-
Media [SD]	0,18963 [0,10511]	0,03881 [0,09584]	0,0001
Promedio CNV gan./tumor	72,32 (58,00)	11,38 (7,00)	0,002
>1Mb	58,28 (48,00)	6,08 (4,00)	0,001
<1Mb	14,04 (11,00)	5,31 (5,00)	0,014^[2]
GII pérdidas			
Máximo	0,58159	0,45432	-
Mínimo	0,00001	0,00013	-
Media [SD]	0,21047 [0,21216]	0,07303 [0,14926]	0,030^[2]
Promedio CNV pérd./tumor	62,84 (58,00)	34,31 (42,00)	NS
>1Mb	42,12 (20,00)	11,46 (14,00)	0,023^[2]
<1Mb	20,72 (15,00)	22,85 (24,00)	NS
IMS	2	3	NS ^[3]

Tabla IV.16. Datos de inestabilidad genómica para los subgrupos A1 y A2 del análisis no supervisado de los tumores de inicio temprano. Los datos mostrados entre paréntesis corresponden al valor de la mediana.

^[1]Análisis estadístico efectuado mediante la prueba t de Student de dos colas. ^[2]Análisis estadístico efectuado mediante la prueba U de Mann-Whitney. ^[3]Análisis estadístico efectuado mediante la prueba de Chi-cuadrado (χ^2). CNV: *Copy number variations*. Gan.: Ganancias. GII: Índice de inestabilidad genómica. IMS: Inestabilidad de microsatélites. Mb: Megabase. NS: No Significativo. Pérd.: Pérdidas. SD: Desviación Estándar.

Entre las alteraciones más recurrentes del *cluster* B3 se encontraron las ganancias en 4q31-q32, 5q14, 12p13-q13 y 13q12 (100%), y las pérdidas en 17q11 (80%). Por el contrario, en el *cluster* B4 predominaron las ganancias en 1p36-p34, 2p25-p24, 2q11-q14, 2q37, 3p25, 3q21-q23, 7p14, 7q32 y 16p13-p11

(92%), y las pérdidas en 18q11-q12 (58%), 18p11 (50%) y 4q31-q32 (42%). Las restantes características de inestabilidad se encuentran recogidas en la Tabla IV.17.

	<i>Cluster B3</i>	<i>Cluster B4</i>	p-valor ^[1]
Nº de tumores	10	12	-
GII total			
Máximo	0,77414	0,91256	-
Mínimo	0,00237	0,00012	-
Media [SD]	0,39149 [0,27826]	0,30166 [0,31020]	NS
Promedio CNV/tumor	95,30 (104,00)	68,50 (32,50)	NS
Promedio aneuploidía	4,44 (4,00)	4,08 (3,00)	NS
GII ganancias			
Máximo	0,56532	0,39539	-
Mínimo	0,00162	0,00010	-
Media [SD]	0,19251 [0,22203]	0,15778 [0,15866]	NS
Promedio CNV gan./tumor	39,10 (29,50)	32,42 (14,50)	NS
>1Mb	26,50 (18,00)	24,42 (7,50)	NS
<1Mb	11,60 (11,50)	8,00 (4,50)	NS
GII pérdidas			
Máximo	0,37258	0,51717	-
Mínimo	0,00002	0,00002	-
Media [SD]	0,19898 [0,11768]	0,14388 [0,16880]	NS
Promedio CNV pérd./tumor	56,20 (72,00)	36,08 (16,50)	NS
>1Mb	40,80 (51,00)	23,75 (12,00)	NS
<1Mb	15,40 (15,00)	12,33 (3,00)	NS
IMS	5	0	0,010^[2]
Mutación en <i>BRAF</i>	0	1	NS ^[2]

Tabla IV.17. Datos de inestabilidad genómica para los subgrupos B3 y B4 del análisis no supervisado de los tumores de inicio temprano. Entre paréntesis se representa la mediana. ^[1]Análisis estadístico efectuado mediante la prueba t de Student de dos colas. ^[2]Análisis estadístico efectuado mediante la prueba de Chi-cuadrado (χ^2). CNV: *Copy number variations*. Gan.: Ganancias. GII: Índice de inestabilidad genómica. IMS: Inestabilidad de microsatélites. Mb: Megabase. NS: No Significativo. Pérd.: Pérdidas. SD: Desviación Estándar.

4.2.1. Correlación anatomoclínica y molecular en adultos jóvenes

El *cluster A* incluyó un mayor porcentaje de pacientes muy jóvenes (<36 años en el momento de diagnóstico) y todas las recidivas tumorales ($p=0,038$), por lo que inevitablemente se encontró asociado a un peor pronóstico (Figura IV.11). En la comparación de los subgrupos derivados de ellos (A1, A2, B3 y B4) los cuatro presentaron rasgos diferenciadores, aunque únicamente se alcanzó la significación

estadística al evaluar la histología tumoral (Tabla IV.18). Las mayores tasas de recidiva se encontraron ligadas al subgrupo cromosómicamente más inestable (A1), mientras que la mayores tasas de mortalidad lo hicieron al subgrupo con mayor porcentaje de neoplasias diseminadas (B4), que además incluyó la mayor proporción de tumores localizados en el recto/unión rectosigmoidea (41,7%). En consecuencia, los individuos estratificados dentro de este último subgrupo presentaron el pronóstico más desfavorable (Figura IV.11). Como era de esperar, el *cluster* con más neoplasias relacionadas con el SL (A2) manifestó predominio de la localización derecha (38,4%), aunque asoció un mayor promedio de pólipos. Por último, cabe destacar que el *cluster* A1 albergó la totalidad de carcinomas pobremente diferenciados, mientras que el *cluster* B3 incluyó el mayor porcentaje de tumores mucosecretorios o con células en “anillo de sello” (Tabla IV.18).

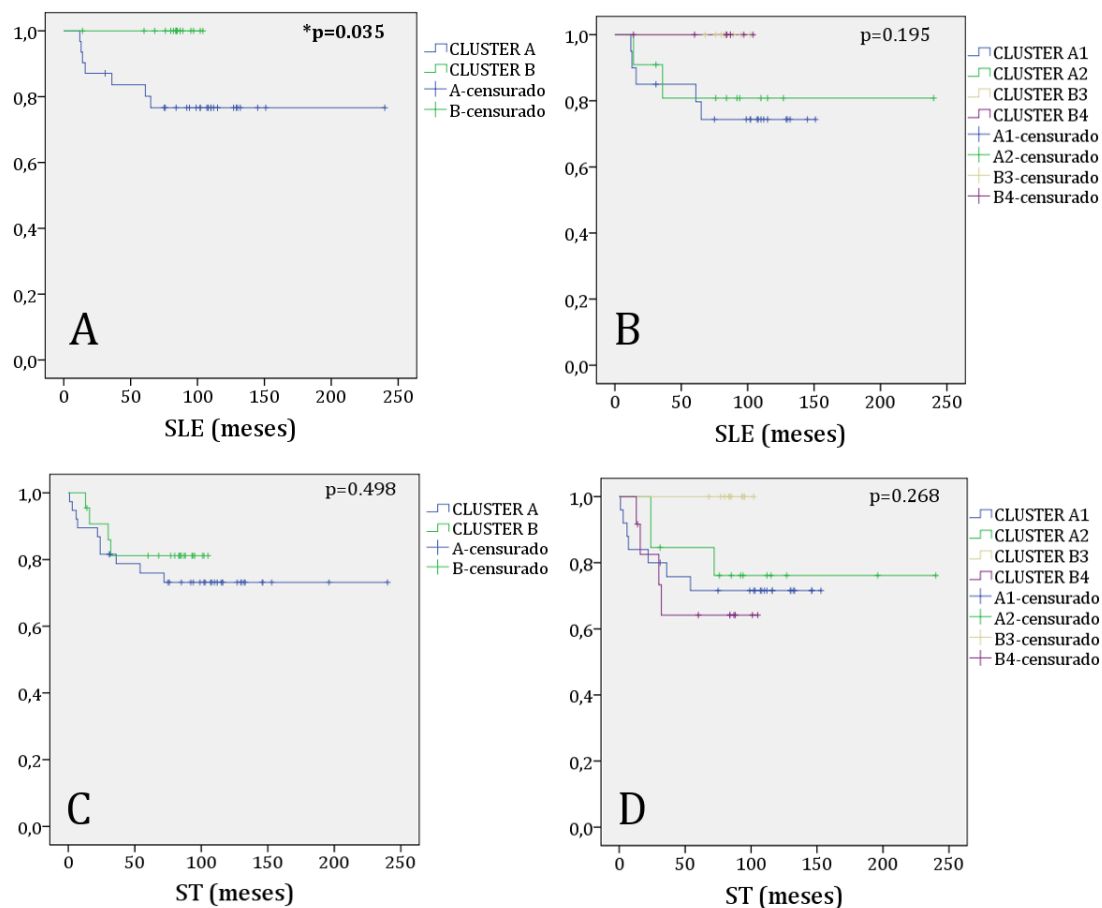


Figura IV.11. Curvas de supervivencia para los *clusters* principales y secundarios obtenidos tras el análisis no supervisado de los tumores de inicio temprano. En la parte superior se encuentra la SLE en los dos *clusters* principales (A) y en los cuatro secundarios (B). En la parte inferior se encuentra la ST en los dos *clusters* principales (C) y en los cuatro secundarios (D). En todos los casos el eje de ordenadas representa la supervivencia acumulada. SLE: Supervivencia libre de enfermedad. ST: Supervivencia total.

	<i>Cluster A1</i>	<i>Cluster A2</i>	<i>Cluster B3</i>	<i>Cluster B4</i>	P-valor^[1]
Nº de pacientes	25	13	10	12	
36-45 años	19	10	9	11	NS
<36 años	6 (54,5%)	3 (27,3%)	1 (9,1%)	1 (9,1%)	
Localización					
Colon derecho	5 (20%)	5 (38,4%)	1 (10%)	1 (8,3%)	
Colon izquierdo	15 (60%)	4 (30,8%)	7 (70%)	6 (50%)	NS
Recto/Unión RS	5 (20%)	4 (30,8%)	2 (20%)	5 (41,7%)	
Histología					
Adenocarcinoma	22 (88%)	7 (53,8%)	9 (90%)	11 (91,7%)	0,034
ADA malignizado	3 (12%)	6 (46,2%)	1 (10%)	1 (8,3%)	
G. diferenciación:					
Alto	10 (45,5%)	3 (42,9%)	4 (44,4%)	2 (18,2%)	
Medio	8 (36,4%)	4 (57,1%)	5 (55,6%)	9 (81,8%)	NS
Bajo	4 (18,1%)	-	-	-	
Mucosecretor	7 (31,8%)	1 (14,3%)	3 (33,3%)	2 (18,2%)	NS
C. en "Anillo de sello"	1 (4,5%)	-	1 (11,1%)	-	NS
Estadio TNM					
I	6 (24%)	6 (46,2%)	2 (20%)	3 (25%)	
II	9 (36%)	4 (30,8%)	7 (70%)	1 (8,3%)	NS
III	5 (20%)	1 (7,6%)	1 (10%)	3 (25%)	
IV	5 (20%)	2 (15,4%)	-	5 (41,7%)	
Promedio pólipos	3,76 [1,00]	6,00 [4,00]	2,40 [2,00]	1,33 [0,00]	NS ^[2]
T. sincrónicos	2 (8%)	1 (7,7%)	-	-	NS
T. metacrónicos	-	2 (15,4%)	-	-	NS
ST	87,12±50,85	99,08±63,18	86,10±10,03	59,50±36,07	NS ^[3]
SLE	72,60±53,90	78,38±65,68	84,50±9,48	51,42±44,26	NS ^[3]
Recidiva tumoral	5 (20%)	2 (15,4%)	-	-	NS
Mortalidad	7 (28%)	3 (23,1%)	-	4 (33,3%)	NS
Sospecha					
Esporádico	13 (52%)	3 (23,1%)	5 (50%)	6 (50%)	
Agregación	9 (36%)	6 (46,2%)	1 (10%)	4 (33,3%)	NS
Ámsterdam II positivo	3 (12%)	4 (30,7%)	4 (40%)	2 (16,7%)	
Casos Lynch	2/7 (28,6%)	3/7 (42,8%)	2/7 (28,6%)	-	NS

Tabla IV.18. Correlación anatomoclínica y molecular para los 4 subgrupos obtenidos tras el análisis no supervisado de los 60 tumores de inicio temprano. Los datos mostrados entre corchetes corresponden al valor de la mediana. ^[1]Análisis estadístico efectuado mediante la prueba de Chi-cuadrado (χ^2). ^[2]Análisis estadístico efectuado mediante la prueba de Kruskal-Wallis. ^[3]Análisis estadístico efectuado mediante análisis de varianza (ANOVA) de un factor. ADA: adenoma. C: Células. G.: grado. NS: No Significativo. RS: rectosigmoidea SLE: Supervivencia Libre de Enfermedad. ST: Supervivencia total. T.: tumores.

4.3. Agrupación jerárquica no supervisada de los adultos ancianos

La primera rama del análisis no supervisado estratificó los tumores en dos grupos marcadamente diferentes respecto a su grado de inestabilidad: el *cluster* C (n=56) y el *cluster* D (n=30) (Figura IV.12; Tabla IV.19). El *cluster* C manifestó valores superiores para todos los parámetros indicadores de INC, resultando considerablemente más inestable. Así, tanto el GII total (0,44443 vs. 0,16592; p=0,001), como el GII ganancias (0,18342 vs. 0,07916; p=0,001), el GII pérdidas (0,26096 vs. 0,08672; p=0,001), el promedio de CNV por muestra (194,02 vs. 68,63; p=0,021) y el promedio de aneuploidía (4,09 vs. 2,24; p=0,006) fueron significativamente superiores en él (Tabla IV.19).

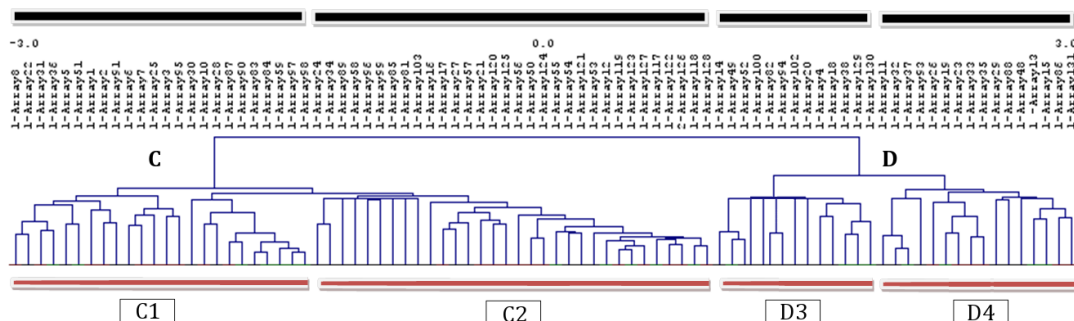


Figura IV.12. Agrupación jerárquica no supervisada de los 86 adultos ancianos.

Cuando ambos *clusters* fueron comparados con el objeto de identificar diferencias significativas entre ellos, se observó la existencia de una serie de regiones comúnmente alteradas en todos los tumores. Entre dichas regiones se encontraron las ganancias en 7q11 (54%), 20q11 (40%) y 7q22 (37%), y las pérdidas de 18q22 (46%), 1p31 (42%), 4p15 (42%), 5p15 (42%) y 18q12 (42%). Los posteriores análisis estadísticos identificaron un total de 168 alteraciones recurrentes (52 ganancias y 116 pérdidas) con afectación significativamente diferencial en los dos *clusters* (Anexo 7). Como era de esperar, la distribución de estas alteraciones resultó marcadamente heterogénea, con claro predominio de las ganancias (51 vs. 1) y las pérdidas (115 vs. 1) en el *cluster* más inestable, el *cluster* C. Dentro de él, destacaron las pérdidas en 22q11-p22 (56%), 8q24 (50%) y 10q26 (50%), mientras que dentro del *cluster* D lo hicieron las ganancias en 19q13 (31%) y las pérdidas en 9q21 (54%).

	<i>Cluster C</i>	<i>Cluster D</i>	p-valor ^[1]
Nº de tumores	56	30	-
GII total			
Máximo	0,89306	0,86388	-
Mínimo	0,00006	0,00007	-
Media [SD]	0,44443 [0,32242]	0,16592 [0,24871]	0,001
Promedio CNV/tumor	194,02 (60,00)	68,63 (19,00)	0,021
Promedio aneuploidía	4,09 (3,00)	2,24 (0,00)	0,006
GII ganancias			
Máximo	0,50094	0,47989	-
Mínimo	0,00002	0,00002	-
Media [SD]	0,18342 [0,16429]	0,07916 [0,14461]	0,001
Promedio CNV gan./tumor	100,14 (27,00)	30,57 (8,00)	0,001
>1Mb	58,38 (16,50)	13,97 (2,50)	0,001
<1Mb	41,77 (10,00)	16,60 (4,00)	0,018
GII pérdidas			
Máximo	0,59903	0,58434	-
Mínimo	0,00002	0,00002	-
Media [SD]	0,26096 [0,20845]	0,08672 [0,16693]	0,001
Promedio CNV pérd./tumor	93,88 (30,00)	38,07 (16,50)	NS
>1Mb	61,75 (20,00)	19,33 (5,00)	0,014
<1Mb	32,13 (6,00)	18,73 (6,50)	NS
IMS	3	4	NS ^[2]
Mutación en <i>BRAF</i>	1	3	NS ^[2]

Tabla IV.19. Datos de inestabilidad genómica para los *clusters* C y D diferenciados dentro de la agrupación jerárquica no supervisada de los tumores de inicio tardío. Los datos mostrados entre paréntesis corresponden al valor de la mediana. ^[1]Análisis estadístico efectuado mediante la prueba U de Mann-Whitney. ^[2]Análisis estadístico efectuado mediante la prueba de Chi-cuadrado (χ^2). CNV: *Copy number variations*. Gan.: Ganancias. GII: Índice de inestabilidad genómica. IMS: Inestabilidad de microsatélites. Mb: Megabase. NS: No Significativo. Pérd.: Pérdidas. SD: Desviación Estándar.

De forma análoga a lo sucedido en el análisis no supervisado de los jóvenes, los grupos principales se dividieron en subgrupos secundarios. Así, del *cluster C* se derivaron el *cluster C1* (n=24) y el *cluster C2* (n=32) (Figura IV.12), cuyas características de inestabilidad se encuentran recogidas en la Tabla IV.20. El primero de ellos acumuló un menor grado de inestabilidad, patentizado por cifras inferiores de GII *total* (0,41987 vs. 0,46285), GII *ganancias* (0,13043 vs. 0,22316; p=0,035) y promedio de CNV por muestra (44,63 vs. 306,06; p=0,011), sin embargo, presentó un valor superior de GII *pérdidas* (0,28939 vs. 0,23964) y un

IV. RESULTADOS

mayor promedio de aneuploidías (6,21 vs. 2,50; $p=0,0001$) (Tabla IV.20). Todos los tumores IMS del *cluster* C se encontraron incluidos dentro del subgrupo cromosómicamente más inestable (C2), aunque no se llegó a alcanzar la significación estadística (Tabla IV.20). Finalmente, en el *cluster* C1 destacaron las pérdidas en 4p15 (59%), 5p15 (58%) y 18q23 (58%), mientras que las alteraciones predominantes en el *cluster* C2 fueron las pérdidas en 6p12 (50%) y 7q31 (47%).

	<i>Cluster</i> C1	<i>Cluster</i> C2	p-valor ^[1]
Nº de tumores	24	32	-
GII total			
Máximo	0,85220	0,89306	-
Mínimo	0,00412	0,00006	-
Media [SD]	0,41987 [0,24537]	0,46285 [0,37276]	NS ^[2]
Promedio CNV/tumor	44,63 (34,00)	306,06 (140,00)	0,011
Promedio aneuploidía	6,21 (6,50)	2,50 (2,00)	0,0001^[2]
GII ganancias			
Máximo	0,40361	0,50094	-
Mínimo	0,00076	0,00002	-
Media [SD]	0,13043 [0,12815]	0,22316 [0,17859]	0,035^[2]
Promedio CNV gan./tumor	20,50 (16,00)	159,88 (81,50)	0,002
>1Mb	11,42 (9,50)	93,59 (57,50)	0,002
<1Mb	9,08 (6,50)	66,28 (29,00)	0,009
GII pérdidas			
Máximo	0,59903	0,53916	-
Mínimo	0,00024	0,00002	-
Media [SD]	0,28939 [0,20505]	0,23964 [0,21166]	NS ^[2]
Promedio CNV pérd./tumor	24,13 (18,50)	146,19 (49,50)	NS
>1Mb	17,50 (14,00)	94,94 (34,50)	NS
<1Mb	6,63 (5,00)	51,25 (22,00)	0,011
IMS	-	3	
Mutación en <i>BRAF</i>	1	-	NS ^[3]

Tabla IV.20. Datos de inestabilidad genómica para los subgrupos C1 y C2 del análisis no supervisado de los tumores de inicio tardío. Los datos mostrados entre paréntesis corresponden al valor de la mediana. ^[1]Análisis estadístico efectuado mediante la prueba U de Mann-Whitney. ^[2]Análisis estadístico efectuado mediante la prueba t de Student de dos colas. ^[3]Análisis estadístico efectuado mediante la prueba de Chi-cuadrado (χ^2). CNV: *Copy number variations*. Gan.: Ganancias. GII: Índice de inestabilidad genómica. IMS: Inestabilidad de microsatélites. Mb: Megabase. NS: No Significativo. Pérd.: Pérdidas. SD: Desviación Estándar.

Del *cluster* D también se derivaron dos subgrupos: el *cluster* D3 (n=14) y el *cluster* D4 (n=16) (Figura IV.12), que únicamente difirieron de forma significativa al evaluar el GII^{total} (0,02089 en D3 vs. 0,29283 en D4; p=0,007) y el promedio de aneuploidías (0,46 en D3 vs. 3,69 en D4; p=0,050). No obstante, el *cluster* D3 también manifestó menor GII^{ganancias} (0,01430 vs. 0,13591), GII^{pérdidas} (0,00655 vs. 0,15688) y promedio de CNV por muestra (27,79 vs. 104,38). Los tumores IMS se encontraron repartidos de forma homogénea, aunque la afectación de *BRAF* fue más frecuente en el subgrupo D4. Como alteraciones recurrentes sólo se observaron las mencionadas de forma general para el *cluster* D: ganancias en 19q13 (31%) y pérdidas en 9q21 (54%) (Tabla IV.21).

	<i>Cluster</i> D3	<i>Cluster</i> D4	p-valor ^[1]
Nº de tumores	14	16	-
GII^{total}			
Máximo	0,07240	0,86388	-
Mínimo	0,00007	0,00009	-
Media [SD]	0,02089 [0,02461]	0,29283 [0,28679]	0,007
Promedio CNV/tumor	27,79 (13,00)	104,38 (52,00)	NS
Promedio aneuploidía	0,46 (0,00)	3,69 (3,00)	0,050
GII^{ganancias}			
Máximo	0,06161	0,47989	-
Mínimo	0,00002	0,00003	-
Media [SD]	0,01430 [0,02192]	0,13591 [0,18070]	NS
Promedio CNV gan./tumor	7,64 (4,50)	50,63 (11,00)	NS
>1Mb	2,86 (1,00)	23,69 (4,50)	NS
<1Mb	4,79 (3,50)	26,94 (7,00)	NS
GII^{pérdidas}			
Máximo	0,02119	0,58434	-
Mínimo	0,00005	0,00002	-
Media [SD]	0,00655 [0,00780]	0,15688 [0,20632]	NS
Promedio CNV pérd./tumor	20,14 (7,00)	53,75 (28,00)	NS
>1Mb	5,64 (2,00)	31,31 (13,00)	NS
<1Mb	14,50 (6,50)	22,44 (11,50)	NS
IMS	2	2	
Mutación en <i>BRAF</i>	-	3	NS ^[2]

Tabla IV.21. Datos de inestabilidad genómica para los subgrupos D3 y D4 del análisis no supervisado de los tumores de inicio tardío. Los datos mostrados entre paréntesis corresponden al valor de la mediana. ^[1]Análisis estadístico efectuado mediante la prueba U de Mann-Whitney. ^[2]Análisis estadístico efectuado mediante la prueba de Chi-cuadrado (χ^2). CNV: *Copy number variations*. Gan.: Ganancias. GII: Índice de inestabilidad genómica. IMS: Inestabilidad de microsatélites. Mb: Megabase. NS: No Significativo. Pérd.: Pérdidas. SD: Desviación Estándar.

4.3.1. Correlación anatomoclínica y molecular en adultos ancianos

Apenas se observó correlación entre el grado de INC y las características clínicas y anatomopatológicas de los adultos ancianos, resultando un grupo de población mucho más homogéneo que el de los adultos jóvenes. En la comparación de los *clusters* principales (C y D) únicamente se alcanzó la significación estadística al evaluar la frecuencia de tumores metacrónicos (1,8% en C vs. 13,3% en D; $p=0,022$). Las restantes variables no evidenciaron diferencias destacables, pudiendo únicamente subrayar la mayor frecuencia de neoplasias pobremente diferenciadas dentro del *cluster* D (43,5% vs. 8,5%) y el mayor porcentaje de tumores diseminados dentro del *cluster* C (23,2% vs. 16,7%), que como era de esperar, se asoció con valores menos favorables de ST ($37,56\pm 23,06$ vs. $44,57\pm 37,67$) y SLE ($30,50\pm 25,80$ vs. $32,00\pm 36,36$). Por el contrario, el *cluster* D incluyó un porcentaje ligeramente superior de recidivas (16,7% vs. 14,3%) y de fallecimientos (56,7% vs. 44,6%).

Tampoco se observaron diferencias importantes al comparar los cuatro subgrupos derivados de los *clusters* principales (C1, C2, D3 y D4), si bien la presencia tumores metacrónicos (28,6%) y el promedio de pólipos (8,57) fueron significativamente superiores en el subgrupo D3 ($p=0,002$ y $p=0,037$, respectivamente) (Tabla IV.22). A diferencia de lo sucedido en el análisis no supervisado de los adultos jóvenes, los cuatro subgrupos de ancianos apenas mostraron rasgos diferenciadores. En líneas generales, el subgrupo cromosómicamente más estable (D3) incluyó un mayor número de tumores localizados en el colon izquierdo (42,9%) y un menor porcentaje de neoplasias diseminadas al diagnóstico, por lo que fue el subgrupo que presentó los valores más elevados de ST ($54,36\pm 46,88$) y SLE ($42,86\pm 42,60$), y por tanto, el que mostró un pronóstico más favorable. En el extremo opuesto se situó el subgrupo D4, que siendo uno de los más estables cromosómicamente, incluyó un alto porcentaje de tumores metastásicos (25%) y se relacionó con las mayores tasas de mortalidad (68,8%) (Tabla IV.22).

	<i>Cluster C1</i>	<i>Cluster C2</i>	<i>Cluster D3</i>	<i>Cluster D4</i>	P-valor^[1]
Nº de pacientes	24	32	14	16	-
Localización					
Colon derecho	9 (37,5%)	13 (40,6%)	2 (14,2%)	6 (37,5%)	
Colon izquierdo	4 (16,7%)	9 (28,1%)	6 (42,9%)	4 (25%)	NS
Recto/Unión RS	11 (45,8%)	10 (31,3%)	6 (42,9%)	6 (37,5%)	
Histología					
Adenocarcinoma	23 (95,8%)	31 (96,9%)	14 (100%)	15 (93,8%)	NS
ADA malignizado	1 (4,2%)	1 (3,1%)	-	1 (6,2%)	
G. diferenciación^[4]:					
Alto	5 (26,3%)	9 (32,1%)	5 (38,5%)	5 (50%)	
Medio	12 (63,2%)	17 (60,7%)	7 (53,8%)	5 (50%)	NS
Bajo	2 (10,5%)	2 (7,2%)	1 (7,7%)	-	
Mucosecretor^[4]					
C. en "Anillo de sello"^[4]	4 (21,1%)	7 (25%)	2 (15,4%)	2 (20%)	NS
	1 (5,3%)	-	-	1 (10%)	NS
Estadio TNM					
I	5 (20,8%)	4 (12,5%)	4 (28,6%)	3 (18,8%)	
II	6 (25%)	16 (50%)	8 (57,2%)	4 (25%)	NS
III	5 (20,8%)	7 (21,9%)	1 (7,1%)	5 (31,2%)	
IV	8 (33,4%)	5 (15,6%)	1 (7,1%)	4 (25%)	
Promedio pólipos	3,25 [2,00]	4,22 [1,00]	8,57 [2,00]	1,69 [1,00]	0,037^[2]
T. sincrónicos	5 (20,8%)	7 (21,9%)	1 (7,1%)	4 (25%)	NS
T. metacrónicos	1 (4,2%)	-	4 (28,6%)	-	0,002
ST	39,30±24,45	36,31±22,31	54,36±46,88	34,79±23,32	NS ^[3]
SLE	30,35±27,08	30,61±25,26	42,86±42,60	21,14±26,03	NS ^[2]
Recidiva tumoral	4 (16,7%)	4 (12,5%)	2 (14,3%)	3 (18,8%)	NS
Mortalidad	10 (41,7%)	15 (46,9%)	6 (42,9%)	11 (68,8%)	NS
Sospecha					
Esporádico	22 (91,7%)	25 (78,1%)	11 (78,6%)	12 (75%)	
Agregación	2 (8,3%)	7 (21,9%)	2 (14,3%)	4 (25%)	NS
Ámsterdam II positivo	-	-	1 (7,1%)	-	
Casos Lynch	-	-	-	-	-

Tabla IV.22. Correlación anatomoclínica y molecular para los 4 subgrupos obtenidos tras el análisis no supervisado de los 86 tumores de inicio tardío. Los datos mostrados entre corchetes corresponden al valor de la mediana. ^[1]Análisis estadístico efectuado mediante la prueba de Chi-cuadrado (χ^2). ^[2]Análisis estadístico efectuado mediante la prueba de Kruskal-Wallis. ^[3]Análisis estadístico efectuado mediante análisis de varianza (ANOVA) de un factor. ^[4]Los valores mostrados se basan en el número de datos disponible, puesto que para algunos pacientes en estadio IV únicamente se dispuso de biopsia. ADA: adenoma. C: Células. G.: grado. NS: No Significativo. RS: rectosigmoidea SLE: Supervivencia Libre de Enfermedad. ST: Supervivencia total. T.: tumores.

5. INESTABILIDAD CROMOSÓMICA Y SÍNDROME DE LYNCH

Entre los 7 pacientes jóvenes con diagnóstico de SL, hubo 4 casos que destacaron por presentar parámetros de inestabilidad genómica propios de los tumores esporádicos sin IMS, y por tanto, muy diferentes de los que habitualmente muestran los CCR asociados al SL (Tabla IV.23).

	Tumores Lynch INC+	Tumores Lynch INC-	p-valor ^[1]
Número de casos	4	3	-
GII total			
Máximo	0,84255	0,06557	-
Mínimo	0,24801	0,02387	-
Media [SD]	0,52567 [0,30007]	0,03789 [0,02398]	0,047
Promedio CNV/tumor	176,25 (158,50)	71,00 (67,00)	NS
Promedio aneuploidía	4,75 (4,50)	0,00 (0,00)	0,005
GII ganancias			
Máximo	0,56532	0,04832	-
Mínimo	0,01547	0,00086	-
Media [SD]	0,27848 [0,22494]	0,01821 [0,02618]	NS
Promedio CNV gan./tumor	91,50 (96,00)	15,00 (12,00)	0,047
>1Mb	70,25 (74,50)	8,00 (4,00)	NS
<1Mb	21,25 (21,50)	7,00 (8,00)	0,019
GII pérdidas			
Máximo	0,58159	0,02301	-
Mínimo	0,01961	0,01725	-
Media [SD]	0,24720 [0,23967]	0,01968 [0,00298]	NS
Promedio CNV pérd./tumor	84,75 (80,50)	56,00 (55,00)	NS
>1Mb	65,50 (63,00)	18,33 (18,00)	NS
<1Mb	19,25 (20,00)	37,67 (37,00)	NS

Tabla IV.23. Comparación de la inestabilidad genómica asociada a los 7 tumores Lynch incluidos en la serie. Los datos mostrados entre paréntesis corresponden al valor de la mediana. ^[1]Análisis estadístico efectuado mediante la prueba t de Student de dos colas. CNV: Copy number variations. INC: Inestabilidad cromosómica. Gan.: Ganancias. GII: Índice de inestabilidad genómica. Mb: Megabase. NS: No Significativo. Pérd.: Pérdidas. SD: Desviación Estándar.

Las características detalladas para cada uno de estos 4 tumores se encuentran recogidas en la Tabla IV.24. Aunque ninguna alteración manifestó clara prevalencia, las ganancias en el cromosoma 22 fueron discretamente más frecuentes.

	Muestra 93	Muestra 112	Muestra 129	Muestra 131
Número de <i>array</i>	133	116	63	64
Gen MMR mutado	<i>MSH2</i>	<i>MSH6</i>	<i>MLH1</i>	<i>MSH6</i> ^[1]
GII total	0,72037	0,24801	0,29177	0,84255
Promedio CNV	171	107	146	281
Aneuploidías	4	7	3	5
Descripción	+4, +6, +13, +21	-4, -8, +9, -15, +17, +20, +22	+17, +19, +22	-3, -4, -5, +19, +22
GII ganancias	0,56532	0,01547	0,27216	0,26096
Promedio CNV gan.	87	30	105	144
>1Mb	63	14	86	118
<1Mb	24	16	19	26
GII pérdidas	0,15505	0,23255	0,01961	0,58159
Promedio CNV pérd.	84	77	41	137
>1Mb	61	65	16	120
<1Mb	23	12	25	17

Tabla IV.24. Descripción detallada de la inestabilidad genómica asociada a los 4 casos Lynch con características diferenciales. ^[1]Se detecta la variante de significado incierto c.431G>T, además de los polimorfismos c.3438+14A>T y c.3646+31_3646+34dupATCT. La variante mencionada pudiera ser patogénica según predictores bioinformáticos (PolyPhen), si bien la bibliografía existente no es concluyente al respecto. CNV: *Copy number variations*. Gan.: Ganancias. GII: Índice de inestabilidad genómica. Mb: Megabase. MMR: *Mismatch repair*. Pérd.: Pérdidas.

Desde el punto de vista anatomopatológico, los 4 tumores presentaron histología de adenocarcinoma y mostraron predilección por el colon izquierdo ($p=0,047$). En general fueron tumores bien diferenciados que se asociaron a valores de ST y SLE más desfavorables que sus análogos estables, aunque sin alcanzar la significación estadística.

V. DISCUSIÓN

1. EL CÁNCER COLORRECTAL

1.1. Consideraciones generales

El CCR en adultos jóvenes (≤ 45 años en el momento de diagnóstico) representa una situación poco frecuente que abarca menos del 10% de las neoplasias colorrectales (Stigliano *et al.* 2014). A pesar de su rareza, los últimos estudios apuntan hacia un aumento de su incidencia, hecho fácilmente explicable teniendo en cuenta la implementación cada vez más extendida de los programas de cribado poblacional (Young *et al.* 2015).

Desde el punto de vista anatomoclínico, el CCR en el adulto joven parece presentar características diferenciadoras con respecto a su análogo en el anciano (Osorio *et al.* 2014, Kirzin *et al.* 2014). En general, son tumores frecuentemente asociados a etapas avanzadas que muestran predisposición a la localización derecha, los bajos grados de diferenciación y la producción de mucina. Además, suelen presentar fenotipo invasivo, por lo que resulta común la detección de metástasis en el momento de su diagnóstico (Wang *et al.* 2015, Goel *et al.* 2010). La gran discordancia existente entre las implicaciones clínicas y pronósticas asociadas al CCR en función de su edad de aparición, tal vez pueda encontrar su justificación en diferentes mecanismos moleculares vinculados a sus respectivos procesos de formación. Tales diferencias podrían abarcar desde pequeñas desviaciones en la secuencia adenoma-carcinoma, hasta la existencia de nuevas vías de carcinogénesis todavía desconocidas (Perea *et al.* 2010). Para dar respuesta a este planteamiento resulta imprescindible mejorar la caracterización molecular del CCR, y dado que la inestabilidad genómica es un sello característico de la enfermedad que frecuentemente se relaciona ganancias y pérdidas de material genético, herramientas como los a-CGH podrían servir de gran ayuda a la hora de llevar a cabo esta tarea (Labots *et al.* 2014).

Estos antecedentes unidos a la importancia que ejercen los cambios en el número de copias sobre el proceso de oncogénesis, han hecho que el objetivo del presente trabajo fuese tratar de mejorar la comprensión de las bases moleculares del CCR en el adulto joven. Hasta nuestro conocimiento, hemos analizado mediante a-CGH el mayor grupo de CCR de inicio precoz publicado hasta la fecha, y

posteriormente hecho un análisis comparativo con un grupo de CCR de inicio tardío. Nuestro propósito ha sido identificar potenciales *loci* de susceptibilidad para tratar de aportar un poco de luz a esta entidad todavía tan desconocida. Los resultados presentados en este trabajo podrían servir para establecer una clasificación basada en el perfil de INC de cada paciente, y en un futuro, orientar hacia diferentes estrategias de abordaje terapéutico basadas en las características individuales de cada tumor.

2. DESCRIPCIÓN DE LAS POBLACIONES ESTUDIADAS

2.1. Características anatomoclínicas

2.1.1. Características clínicas

Las dos poblaciones mostraron edades medias de diagnóstico similares a las descritas por otros autores, que se situaron en los $39,14 \pm 5,58$ años en el caso de los jóvenes y en los $77,82 \pm 5,71$ en el de los ancianos (Berg *et al.* 2010, Kirzin *et al.* 2014). No se observaron diferencias en cuanto a la distribución por sexos, si bien el porcentaje de varones fue discretamente superior en los dos grupos. Este dato coincide con algunos trabajos ya publicados (Murphy *et al.* 2011, Zahir *et al.* 2014), aunque difiere de otros que destacan la mayor proporción de casos en el sexo femenino, especialmente dentro de la población joven (Kirzin *et al.* 2014).

La localización tumoral ha sido sugerida como uno de los factores más influyentes en la morfología del CCR, pues se han observado diferencias epidemiológicas, clínico-patológicas y familiares dependiendo de la ubicación del tumor en el colon (Benedix *et al.* 2010, Snaebjornsson *et al.* 2010, Yamauchi *et al.* 2012). A nivel mundial, el cáncer localizado en el lado derecho se observa con mayor frecuencia en mujeres y ancianos, mientras que la localización izquierda predomina en varones jóvenes (Bae *et al.* 2013, Snaebjornsson *et al.* 2010). No obstante, no todos los autores confirman esta tendencia (Lin *et al.* 2005, Liang *et al.* 2006, Savas *et al.* 2007). En nuestra serie, los tumores en el colon fueron más frecuentes que los de recto o unión rectosigmoidea, predominando la localización izquierda en jóvenes (46,6%) y la derecha en ancianos (36,1%). Algunas publicaciones subrayan la mayor frecuencia de tumores distales en series de individuos jóvenes sin antecedentes familiares de CCR (Chang *et al.* 2012, Myers *et*

al. 2013, Stigliano *et al.* 2014), por lo que la localización proximal ha sido sugerida como un indicador de la presencia de un componente hereditario (Kirzin *et al.* 2014). En este sentido, es interesante señalar que únicamente el 35,4% de los jóvenes analizados en nuestra serie mostró agregación familiar de neoplasias relacionadas con el SL o con características propias de éste (como la IMS), dato que podría justificar la mayor frecuencia de casos con localización distal en dicha población.

2.1.2. Características anatomopatológicas

Como era de esperar, el adenocarcinoma constituyó la histología mayoritaria en los dos grupos (Schneider *et al.* 2014), si bien la mayor proporción de adenomas malignizados entre los jóvenes suavizó la diferencia. Del mismo modo, el adenoma tubular constituyó el tipo evolutivo más frecuente entre los jóvenes (72,2%), mientras que el adenoma tubulovelloso lo hizo entre los ancianos (60%) (Bas *et al.* 2015).

Algunos artículos describen el bajo grado de diferenciación como una característica típicamente asociada al CCR de aparición precoz (Wang *et al.* 2015), sin embargo, la diferenciación moderada fue más habitual en nuestra serie. Aun así, cabe destacar que los tumores pobremente diferenciados fueron mayoritarios en la población joven (14,1% vs. 6,2%). En consonancia con otras publicaciones, y como era de esperar dado que el 13,6% de los jóvenes fue confirmado molecularmente como SL, los tumores mucinosos, las neoplasias mucosecretoras y las células en “anillo de sello” predominaron en dicho grupo (Valle, 2014).

La histología mucinosa tiene un valor pronóstico controvertido. Algunos trabajos la han relacionado de forma significativa con un mal pronóstico (Gao *et al.* 2013, Hyngstrom *et al.* 2012, Mekenkamp *et al.* 2012), mientras que otros no comparten estos hallazgos (Langner *et al.* 2012). En nuestra serie, la presencia de mucina se asoció con valores de ST y SLE más desfavorables en las dos poblaciones, por lo que nuestros resultados se encuentran alineados con la primera afirmación. Además, la diferenciación mucinosa parece ejercer diferentes efectos dependiendo de la localización tumoral, de modo que en el recto se presenta como un marcador de mal pronóstico, y en el lado derecho parece ejercer un efecto favorable (Schneider *et al.* 2014). Posiblemente, esta discrepancia sea

debida a que los adenocarcinomas mucinosos en la parte proximal del colon suelen estar relacionados con un componente familiar, típicamente vinculado al SL (Banerjea *et al.* 2009).

2.1.3. Pronóstico y supervivencia

Al igual que ocurre en otras neoplasias, el pronóstico del CCR varía en función de la etapa de diagnóstico. El sistema de estadificación propuesto por la AJCC proporciona información pronóstica muy útil en pacientes con fases iniciales o avanzadas de la enfermedad. Sin embargo, es menos capaz de predecir el resultado en los niveles intermedios, en los que pacientes con tumores en el mismo estadio pueden experimentar pronósticos muy diferentes (Schneider *et al.* 2014). En estos niveles, la evaluación de variables como la invasión linfática, la necrosis tumoral o la respuesta inflamatoria resultan de gran utilidad (Schneider *et al.* 2014). En general, los CCR sintomáticos suelen encontrarse en etapas avanzadas en las que las alternativas terapéuticas curativas son escasas. Por ello, resulta primordial la eliminación de lesiones precancerosas que pueden anteceder en varios años al cáncer invasivo. Es sabido que la incidencia de pólipos adenomatosos aumenta en proporción directa con la edad, estimándose en torno al 63,6% su frecuencia entre los 45 y los 60 años (Bas *et al.* 2015, Wang *et al.* 2014). En sintonía con esto, el 70,3% de nuestra serie mostró pólipos en algún momento de su vida, siendo éstos más frecuentes entre los ancianos (65,9% vs. 74,2%). Aunque no son muchas las series que comparan la aparición de pólipos en pacientes de diferente edad, nuestros hallazgos son acordes a lo descrito en la literatura (Chang *et al.* 2012). Excluyendo los 6 individuos jóvenes con mutación germinal en *APC*, el número medio de pólipos fue de 3 para los jóvenes y de 4 para los ancianos, con predominio del tipo adenomatoso en los dos casos.

El pronóstico del CCR de inicio precoz es controvertido. Frente a algunas publicaciones que le confieren un peor pronóstico (da Fonseca 2012, Osorio *et al.* 2014), otras reportan tasas de mortalidad independientes de la edad de diagnóstico (O'Connell *et al.* 2004). Tales discrepancias posiblemente encuentren su fundamento en los criterios de inclusión, puesto que los tumores hereditarios (más concretamente los asociados al SL) presentan un mejor pronóstico que sus análogos esporádicos (Banerjea *et al.* 2009). En nuestra serie, las variables ST, SLE

y mortalidad global presentaron valores más favorables en el grupo de población joven, observándose equivalencia en la frecuencia de recidiva tumoral. Todos los pacientes jóvenes fallecieron como consecuencia de su neoplasia colorrectal, sin embargo, dicho porcentaje disminuyó hasta el 63,6% en el caso de los ancianos, hallazgo por otra parte esperable dada la avanzada edad de algunos sujetos.

La detección de metástasis al diagnóstico fue muy similar en los dos grupos, con predominio de la afectación hepática en ambos. Nuestros resultados coinciden con otros previamente publicados, aunque difieren en su magnitud. Mientras que algunos trabajos recogen porcentajes de diseminación al diagnóstico del 69% para jóvenes y del 49% para ancianos (Boardman *et al.* 2007), en nuestra serie tales porcentajes no superaron el 25% en ningún caso. Aunque nuestros resultados son alentadores, la tasa de tumores diagnosticados con diseminación a distancia sigue siendo muy alta. Por una parte, ello podría ser debido a los pacientes jóvenes asintomáticos que no cumplen criterios para beneficiarse de los programas de cribado del CCR (Segura *et al.* 2014, Young *et al.* 2015). Por otra, cabría considerar una carcinogénesis acelerada de las neoplasias IMS+ (de Jong *et al.* 2004), hipótesis no avalada por todos los autores (Liang *et al.* 2003, Lin *et al.* 2005). Más significativa fue la diferencia observada en cuanto al diagnóstico en fases iniciales de la enfermedad (estadio I), donde los pacientes jóvenes despuntaron frente a los ancianos (31,8% vs. 18,5%), posiblemente como consecuencia de la eficacia del programa de cribado instaurado en nuestra área sanitaria hace tiempo.

Los pacientes ancianos se caracterizaron por una mayor frecuencia de tumores sincrónicos y/o metacrónicos, aunque en este caso, nuestros resultados no coincidieron con la literatura. Globalmente, la prevalencia del CCR sincrónico varía entre el 1,1% y el 8,1%, siendo más frecuente en los hombres (relación 1,8:1) (Lam *et al.* 2014). Cuando se compara con el CCR solitario, el carcinoma sincrónico parece implicar más a menudo la parte proximal del colon y presentar histología mucinosa asociada a IMS. Algunos autores han reportado frecuencias de tumores sincrónicos y/o metacrónicos del 9,8% en jóvenes y del 1,8% en ancianos (Liang *et al.* 2003), sin embargo, dichos porcentajes se elevaron hasta el 13,6% y el 25,8% en nuestro estudio.

2.2. Características familiares

El 77,9% de nuestra serie presentó historia familiar de CCR o cumplió los criterios de Ámsterdam II para el SL, siendo la población joven quien más contribuyó a este porcentaje (57,3% vs. 20,6%). Otros trabajos publicados también recogen una mayor agregación familiar en población joven, con porcentajes que oscilan entre el 10% y el 46% y que son tanto mayores cuanto menor es la edad de corte empleada en el estudio (Jasperson *et al.* 2010, Steinhagen *et al.* 2012). De hecho, algunos autores han sugerido la combinación de la edad precoz con otras características clinicopatológicas y/o familiares, como una herramienta efectiva en la identificación de pacientes con SL (Perea *et al.* 2011).

Es bien sabido que los factores genéticos juegan un papel importante en la susceptibilidad del CCR, habiendo sido estimado que cerca del 30% de los diagnósticos son atribuibles a causas heredadas (Binefa *et al.* 2014). De ellos, únicamente el 5-6% son debidos a mutaciones germinales en genes de alta penetrancia tales como *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *APC* y *MUTYH*, por lo que una parte importante se diagnostica en pacientes con agregación familiar en los que no existe una base genética conocida (Shiovitz *et al.* 2014). Como se verá más adelante, no en todos los pacientes jóvenes Ámsterdam II positivos de nuestra serie se identificó una causa genética responsable de la enfermedad (ver Apartados 1.4 y 2.3 de los Resultados), hecho que sugiere la existencia de un posible componente genético que podría estar en relación con nuevos síndromes hereditarios. Estos casos son habitualmente designados como CCR familiar tipo X (Goel *et al.* 2010, Stigliano *et al.* 2014) y se cree que podrían constituir el resultado del efecto sinérgico de varios genes de baja susceptibilidad que considerados de forma conjunta son capaces de conferir un riesgo aumentado de padecer esta neoplasia.

3. ANÁLISIS DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

La IMS constituye un evento frecuente en la progresión del CCR producido por la inactivación del sistema de reparación del ADN. Aparece en el 15% de los tumores (Kocarnik *et al.* 2015) y puede tener origen de dos formas bien diferenciadas. En primer lugar, la vinculada al SL y relacionada con mutaciones

heredadas en los genes del sistema MMR. En segundo lugar, la vinculada a los casos esporádicos y relacionada con alteraciones en *BRAF* que conllevan la hipermetilación de los promotores de los genes del sistema MMR (con mayor frecuencia *MLH1*) (Mundade *et al.* 2014). Partiendo de esta base, un resultado positivo en el estudio mutacional de *BRAF* permite descartar con una elevada probabilidad el origen hereditario del tumor.

En los tumores de origen esporádico, la IMS suele estar vinculada a edades avanzadas (Carethers *et al.* 2015). Inicialmente, todos los CCR diagnosticados en jóvenes eran considerados de origen hereditario, y dada su frecuente asociación con el SL, la IMS era entendida como un rasgo característico de los inicios tempranos de la enfermedad. Posteriores investigaciones demostraron que más del 60% de estos tumores presentaba EMS, aportando a la idea inicial que entendía el CCR como una enfermedad única, un nuevo enfoque en el que cada tumor era concebido como una entidad diferenciada del resto (Osorio *et al.* 2014). Diferentes publicaciones han sugerido que sólo 1 de cada 20 tumores de inicio temprano es consecuencia de mutaciones germinales, presentando el resto naturaleza esporádica y etiología genética poco conocida (Antelo *et al.* 2012, Chang *et al.* 2012, Stigliano *et al.* 2014). Los resultados obtenidos en nuestra serie corroboran esta afirmación, ya que por cada 20 adultos jóvenes, sólo hubo 1,6 en los que se detectase mutación a nivel germinal.

Como era de esperar, la IMS fue más común entre los tumores de inicio temprano (16% vs. 13%), aunque sin llegar a alcanzar los valores publicados por otros autores. La literatura recoge frecuencias de IMS que oscilan entre el 19,7% y el 41% para este grupo de edad (Osorio *et al.* 2014), sin embargo, en nuestra población apenas se alcanzó el límite inferior de dicho intervalo. Seguramente, esta discrepancia sea derivada de la menor proporción de pacientes Amsterdam II positivos en nuestro estudio. Cuando se compara la frecuencia de la IMS en función de la edad de diagnóstico, los porcentajes varían dependiendo de la publicación consultada. Así, mientras que unos señalan diferencias del 23,1% (Liang *et al.* 2003) otros reportan porcentajes similares (Chang *et al.* 2012), probablemente por el mayor número de tumores silenciados epigenéticamente en la población anciana. En nuestro estudio, las dos poblaciones difirieron sólo en un 3% (16% en

jóvenes vs. 13% en ancianos), por lo que nuestros hallazgos se encuentran más próximos a la afirmación realizada por el segundo grupo de autores.

De los 173 pacientes sometidos inicialmente al análisis, solamente 11 (11 jóvenes) presentaron mutación en alguno de los genes del sistema MMR (7 de ellas patogénicas y 4 de significado desconocido) (Tabla IV.9). En todos los tumores IMS se identificó ausencia de expresión de alguna proteína del sistema de reparación, con una tasa de alteraciones IHQ similar a la descrita por otros autores (12-21%), incluso sin tener en cuenta la edad de inicio de la enfermedad (Giráldez *et al.* 2012, Goel *et al.* 2010, Steinhagen *et al.* 2012).

El porcentaje de mutaciones detectado en nuestra serie también coincidió con lo previamente reportado. Considerando las dos poblaciones de forma conjunta, el 44% de los tumores que presentó alteraciones en el estudio IHQ asoció mutación en el gen correspondiente, valor que superó el 80% cuando se consideró la población joven de forma aislada. Las tasas de mutación varían entre el 8,9% y el 92,6% dependiendo del criterio de edad empleado en la selección de los pacientes (Antelo *et al.* 2012, Liang *et al.* 2003). En nuestra serie, el 84,6% de los jóvenes (11 pacientes) presentó mutación en el gen asociado a la proteína no expresada, mientras que sólo hubo 3 casos (1 joven y 2 ancianos) en los que la IMS fuese justificada por hipermetilación del promotor de *MLH1*. Curiosamente, uno de los pacientes ancianos con silenciamiento epigenético también presentó cuatro alteraciones no patogénicas que afectaron a *MLH1* y *MSH6*. Nuestras coincidencias con la literatura también incluyeron la distribución de los cambios en los distintos genes. Se han descrito tasas de mutación en *MLH1*, *MSH2* y *MSH6* que oscilan en torno al 60%, 30% y 10%, respectivamente (Pinheiro *et al.* 2015, Wielandt *et al.* 2012). En nuestra serie, estas alteraciones se identificaron con frecuencias del 45,5%, 45,5% y 9%.

4. INESTABILIDAD CROMOSÓMICA EN JÓVENES Y ANCIANOS

La INC es un proceso progresivo que puede derivar en la adquisición de mutaciones en genes responsables del mantenimiento de la integridad del genoma y/o en genes que controlan la proliferación celular. A menudo se manifiesta con ganancias o pérdidas de cromosomas enteros, o con deleciones/amplificaciones

que distribuyen numerosas CNV a lo largo de todo el genoma. Actualmente, los tumores EMS de inicio temprano son considerados un subtipo de CCR esporádico de etiología genética desconocida (Antelo *et al.* 2012, Stigliano *et al.* 2014). Su gran heterogeneidad clínica y sus desfavorables características pronósticas han posicionado a este tipo de tumores como un grupo de alto riesgo dentro del CCR (Perea *et al.* 2014), por lo que no es de extrañar que diferentes grupos de investigadores hayan focalizado su atención sobre la historia natural de los mismos.

La evidencia acumulada sugiere la existencia de regiones diferencialmente afectadas en el CCR de inicio precoz y tardío (Berg *et al.* 2010, Giráldez *et al.* 2012). Sin embargo, la relativa baja incidencia de la enfermedad a edades inferiores o iguales a los 45 años representa un escollo difícilmente superable que repercute directamente sobre la falta de unanimidad en los resultados publicados.

4.1. Grado de inestabilidad genómica

El 97,3% de nuestra serie (142 casos) mostró alteraciones detectables mediante a-CGH, con una cifra media de 123,21 cambios por muestra. Únicamente hubo 4 casos en los que no se observó ningún tipo de alteración, si bien su evaluación de forma aislada no arrojó resultados concluyentes que demostrasen la existencia de rasgos característicos distintivos con respecto al resto de tumores. La IMS sólo estuvo presente en 1 de estos 4 casos, por lo que los otros 3 pudieron ser entendidos como MACS. A menudo, los MACS son considerados un tercer grupo de tumores que asocian características clínico-patológicas más desfavorables (Fadhil *et al.* 2014, Osorio *et al.* 2014). Aunque se ha descrito su mayor frecuencia entre las personas jóvenes, en nuestra serie fueron más comunes entre los ancianos (2 vs. 1). No obstante, el reducido número de casos, unido a la falta de un criterio universal que permita clasificar los tumores como estables o inestables en términos de INC, podrían justificar fácilmente esta discrepancia.

Según se ha visto, los perfiles de inestabilidad asociados a los CCR de inicio temprano y tardío difieren más notoriamente respecto a sus CNV que respecto a su fracción media de genoma alterado (Berg *et al.* 2010). En sintonía con esto, nuestras poblaciones mostraron valores de GII^{total} que dieron lugar a

representaciones gráficas casi superponibles (Figura IV.2). En líneas generales los pacientes jóvenes mostraron un menor GII, aunque las diferencias significativas no fueron alcanzadas hasta que los tipos de alteración (ganancias o pérdidas) fueron considerados de forma independiente. En ese momento, se observó un GII ^{pérdidas} claramente superior en los pacientes ancianos ($p=0,004$) (Tabla IV.10).

De acuerdo a lo anterior, tampoco se observaron diferencias significativas respecto a la cifra media de segmentos alterados por tumor, aunque como era de esperar, los ancianos mostraron una mayor proporción de los mismos (150,62 vs. 95,80). Es sabido que el GII aumenta conforme avanza la secuencia adenoma-carcinoma, siendo los adenomas menos propensos a la acumulación de cambios que los carcinomas, y éstos a su vez más propensos conforme aumenta su estadio tumoral (Orsetti *et al.* 2014). En nuestro estudio, el grupo de población joven incluyó una mayor proporción de adenomas malignizados ($p=0,003$), pero un porcentaje muy similar de tumores en estadio IV (23,9% en jóvenes vs. 22,6% en ancianos). Aplicando el razonamiento previamente expuesto, en nuestra serie cabría esperar un menor grado de inestabilidad entre los jóvenes, tal y como se ha observado (Tabla IV.10). Por consiguiente, nuestros resultados avalan la afirmación realizada por Orsetti y colaboradores, y posicionan a la desestabilización genómica como un factor inherente al desarrollo de los tumores esporádicos, que debe ser entendida como una causa de malignidad más que como un efecto de la misma.

Cuando los segmentos alterados fueron diferenciados en base a su mayor o menor tamaño con respecto a una longitud de referencia fijada en 1Mb, se observó que las ganancias inferiores a dicha longitud eran significativamente más frecuentes en los pacientes ancianos ($p=0,007$) (Tabla IV.11). Este hallazgo debe ser tomado con cautela, dado que la resolución media de los *arrays* empleados en este estudio también se situó en 1Mb. Ello significa que las alteraciones con tamaños inferiores a este umbral podrían ser reales, o por el contrario, deberse a errores de muestreo. Para poder garantizar la existencia de las mismas, los resultados deberían ser confirmados mediante otros procedimientos genómicos.

4.2. Perfil de inestabilidad: tipo y frecuencia de las alteraciones

4.2.1. Comparación desde el punto de vista cuantitativo

Las dos poblaciones exhibieron regiones con mayor susceptibilidad a la acumulación de cambios, sugiriendo la implicación de genes esenciales para el mantenimiento del equilibrio celular normal. Estas alteraciones recurrentes (frecuencia $\geq 30\%$) fueron más comunes en el grupo de población joven (147 vs. 135), aunque abarcaron una longitud de genoma similar en los dos casos (636,92 Mb en jóvenes y 590,87 Mb en ancianos). En los jóvenes, algunas llegaron a alcanzar porcentajes de frecuencia del 61%, mientras que en los ancianos ninguna superó el 47%. Puede parecer que este dato contradice al mencionado en el apartado anterior con respecto a la proporción de segmentos alterados en cada población. Sin embargo, una posible explicación para el hecho de que los adultos jóvenes muestren un menor número de segmentos alterados (150,62 vs. 95,80) pero una mayor cifra de cambios recurrentes (incluyendo frecuencias más extremas), podría ser que el proceso de carcinogénesis en jóvenes tal vez requiera la contribución de cambios cromosómicos más específicos, que lo hagan más susceptible de adaptarse a un patrón determinado de cambios.

Entre las alteraciones recurrentes observadas hubo una primera fracción que resultó común a los dos grupos, lo que podría significar la existencia de genes que proporcionan cierta ventaja adaptativa a las células tumorales con independencia de la edad de inicio de la enfermedad. De ellas destacó la región 19q13.1, por haber sido descrita como un locus de susceptibilidad para el CCR en un estudio reciente de asociación en todo el genoma (GWAS, *Genome-wide association study*) (Wang *et al.* 2013) al comprender más de cien genes codificantes que incluyen algunos miembros de la familia del antígeno carcinoembrionario (CEA, *Carcinoembryonic antigen*) (Houlston *et al.* 2008).

Más llamativa resultó la segunda fracción de alteraciones, al encontrarse presente en los dos grupos pero demostrar recurrencias estadísticamente diferentes, y por tanto, sugestivas de una posible especificidad de grupo (ver Apartado 4.2.2 de la Discusión). Entre ellas, destacaron las pérdidas en 1p36 (61%) y en 14q11 (61%), ambas significativamente más frecuentes en la población joven y previamente descritas por otros autores. Las pérdidas en 1p36 han sido

relacionadas con la diseminación tumoral en tumores EMS en estadios II-IV, y sugeridas como un marcador pronóstico útil validado a partir de datos independientes del TCGA (Mayrhofer *et al.* 2014). Por su parte, la región 14q11 es conocida por encontrarse delecionada en aproximadamente el 30% de todos los CCR, y más frecuentemente en los tumores de inicio temprano (Mourra *et al.* 2007). En el grupo de población anciana, el 36% mostró pérdidas en 18q21.2 (donde se localizan *DCC* y *SMAD4*) y el 30% lo hizo en 5q22.2 (donde se localiza *APC*). Estos porcentajes fueron muy inferiores en el caso de la población joven, lo que podría significar que los tumores de inicio tardío se encuentran más predispuestos a seguir el modelo tradicional de carcinogénesis colorrectal propuesto a principios de la década de los noventa (Fearon y Vogelstein, 1990). Se han descrito múltiples marcadores pronósticos asociados al CCR, entre los que se incluyen la pérdida de 18q o reducción de la expresión *SMAD4* (Mayrhofer *et al.* 2014). También se han relacionado con la supervivencia y la diseminación tumoral las pérdidas en 1p, 4p, 8p, 9q, 15q, 10p, 19p y 20p y las ganancias en 8q y 20q (Cancer Genome Atlas Network 2012, Nakao *et al.* 2011, Poulogiannis *et al.* 2010). Existen otros trabajos publicados en los que las pérdidas a lo largo del cromosoma 18 se han señalado como frecuentes dentro de la enfermedad sin tener en cuenta la edad de diagnóstico (Orsetti *et al.* 2014). Estas afirmaciones, establecidas para el CCR de forma global, coinciden con los hallazgos observados en nuestra población anciana, haciendo ganar fuerza la hipótesis de que tras el CCR de los adultos jóvenes y ancianos subyacen mecanismos moleculares diferentes.

Tanto las CNV como los porcentajes de frecuencia observados en este estudio difirieron con respecto a los recogidos en la literatura. Algunos autores han señalado que las ganancias en 20q11-q13 (68%), 13q11 (57%), 7p22 (36%), 8q23-q24 (36%) y las pérdidas en 18q11-q23 (60%), 17p13-q11 (39%), 10q23 (38%) y 4q32 (37%) son habituales en el CCR independientemente de su edad de inicio (Chen *et al.* 2011, Giráldez *et al.* 2012, Hoskins *et al.* 2012, Wang *et al.* 2013). Sin embargo, no todas ellas estuvieron presentes en nuestra serie, y las que sí lo hicieron, manifestaron frecuencias globalmente más bajas que las previamente reportadas. En varias de estas alteraciones la suma de los porcentajes asociados a las dos poblaciones se asemejó al porcentaje publicado de forma global sin distinción de la edad, mientras que en otras, los porcentajes vinculados a cada

población de forma aislada coincidieron con los descritos por otros autores de manera global y sin distinción de la edad. Así, las ganancias en 20q11-q13 (presentes en el 38% de nuestros jóvenes y en el 36% de los ancianos), 7p22 (38% de los jóvenes y 38% de los ancianos) y 8q23-q24 (34% de los ancianos) también fueron recurrentes en nuestra serie, sin embargo, la región 13q11 no mostró un porcentaje de alteración superior o igual al 30% en ninguna de las poblaciones. En el caso de las pérdidas sucedió algo muy similar, de modo que las alteraciones en 18q11-q23 (33% en jóvenes y 36% en ancianos), 17p13-q11 (37% en jóvenes y 33% en ancianos) y 10q23 (30% en jóvenes) fueron recurrentes en nuestra serie, aunque la región 4q32 no mostró un porcentaje de alteración superior o igual al 30% en ninguno de los grupos.

La falta de concordancia entre nuestros resultados y otros previamente publicados podría deberse a varios factores. En primer lugar, podría ser consecuencia de los diferentes criterios de inclusión empleados. Nuestro estudio ha sido elaborado a partir de tumores procedentes de pacientes sin síndromes hereditarios conocidos, que fueron clasificados en dos grupos en función de su edad de diagnóstico (≤ 45 años y ≥ 70 años), mientras que en otras publicaciones el criterio para distinguir el inicio precoz y tardío del CCR viene determinado únicamente por el hecho de que el diagnóstico supere o no la quinta década de vida (Mourra *et al.* 2007). En segundo lugar, nuestra serie incluyó un mayor número de pacientes con estadios avanzados de la enfermedad y una mayor cohorte de tumores localizados en el recto. En este sentido, es importante subrayar que algunos estudios han especificado que las diferentes localizaciones tumorales pueden influir sobre el perfil molecular de la neoplasia, sugiriendo la localización anatómica de origen como un buen discriminador a la hora de clasificar los diferentes tipos de CCR (Ayiomamitis *et al.* 2014, Ding *et al.* 2014, Slebos *et al.* 2015, Zhang *et al.* 2014). Este hecho podría explicar algunas diferencias en el perfil de CNV observado en el presente trabajo, dado que la localización rectal representó el 34% de nuestra serie. Por último, la falta de concordancia entre nuestros resultados y otros previamente publicados podría ser explicada por el método utilizado para la evaluación de las CNV. Así, mientras que muchos estudios proporcionan resultados de baja o media resolución (Boardman *et al.* 2013, Bruin *et al.* 2010, Molinari *et al.* 2011), nosotros hemos utilizado una plataforma de a-

CGH con 135.000 sondas isotérmicas que abarcaron el genoma completo con una separación media de 12.524 pares de bases.

4.2.2. Comparación desde el punto de vista cualitativo

Aunque todavía son escasos los estudios que diferencian el CCR en función de la edad de inicio, algunos autores han cuantificado en torno al 3,2% la porción de genoma diferente entre los dos grupos (Berg *et al.* 2010). En nuestra serie, un total de 24 segmentos cumplieron los criterios de grupo-especificidad establecidos ($p < 0,05$ y $FDR < 0,09$), demostrando estar estrechamente relacionados con la edad (Tabla IV.12). Los 24 segmentos fueron categorizados en base a su nivel de frecuencia dentro de cada población, de manera que pudieron ser distinguidos tres tipos diferentes: aquellos con elevada frecuencia en jóvenes y gran infrecuencia en ancianos (10 segmentos), aquellos con predominio en jóvenes pero la suficiente presencia en ancianos como para no ser considerados muy infrecuentes (11 segmentos), y aquellos con mayor frecuencia en ancianos (3 segmentos).

Los 10 segmentos incluidos dentro de la primera categoría (alteraciones muy frecuentes en jóvenes y muy infrecuentes en ancianos) afectaron a 6 regiones cromosómicas distribuidas a lo largo de 5 autosomas. La evaluación detallada de los genes albergados dentro de dichas regiones reveló como más importantes a dos de ellas. Estas dos regiones, localizadas en 1p35.2-p35.1 y 3p21.31-p21.1, manifestaron tanto ganancias como pérdidas y destacaron por contener genes previamente relacionados con el desarrollo de malignidad (*PTP4A2*, *IMPDH2*, *HYAL2*, *HYAL3* y *RPL29*), así como con el crecimiento y progresión de ciertos tipos de tumores (*KHDRBS1*, *SMARCC1*, *CDC25A* y *BAP1*).

Dentro de la segunda categoría (alteraciones más frecuentes en jóvenes, sin llegar ser infrecuentes en ancianos) se incluyeron un total de 11 segmentos que afectaron a 10 regiones cromosómicas distribuidas a lo largo de 5 autosomas. Entre ellas, destacó la región 1q21.1-q21.2, que únicamente manifestó pérdidas de material y que también ha sido descrita por otros autores como más frecuentemente delecionada en población joven (46% vs. 6%; $p = 0,01$) (Berg *et al.* 2010). En línea con esto, el 48% de nuestros jóvenes y el 32% de los ancianos mostró pérdidas en este locus ($p = 0,0005$) (Tabla IV.12). Entre los genes contenidos dentro de esta región destacan *CHD1L*, un oncogén relacionado con el

carcinoma hepático (Cheng *et al.* 2013) y *BCL9*, cuyo vínculo con el cáncer es sobradamente conocido. Esta posición además incluye el gen *PRKAB2*, que codifica para una subunidad reguladora de la AMPK (*AMP-activated protein kinase*, proteína quinasa activada por AMP) cuyo papel es clave en la regulación del metabolismo energético celular.

Por último, fuimos capaces de identificar una tercera categoría que incluyó 3 segmentos más frecuentemente alterados dentro de la población anciana. Estos 3 segmentos, localizados en 3 regiones diferentes del cromosoma 7 (7q11.22, 7q11.23 y 7q22.1), destacaron por albergar genes previamente relacionados con el cáncer de mama (*UPK3B*, en la región 7q11.23) y la progresión tumoral (*CUX1*, en la región 7q22.1). Las ganancias en 7q también han sido descritas por otros autores como frecuentemente alteradas dentro del CCR sin distinción de la edad (Burghel *et al.* 2013, Orsetti *et al.* 2014). En la serie publicada por Berg, que como se ha mencionado compara el perfil de CNV en jóvenes y ancianos (Berg *et al.* 2010), también se identifica una región más frecuentemente alterada en población anciana; sin embargo, nuevamente nuestros resultados no son coincidentes con los suyos. En su caso, las ganancias en 5q13.2 se observan en el 29,4% de los ancianos y en ningún joven. En nuestra serie, por el contrario, esta región aparece más frecuentemente alterada en jóvenes (57% vs. 44%) y se asocia con pérdidas, aunque sin llegar a alcanzar la significación estadística (Anexos 3 y 4). También a diferencia de Berg y colaboradores, nuestras poblaciones no mostraron diferencias significativas en los cromosomas 2, 4, 10 y 19, si bien las ganancias en 19q13 (52% en jóvenes y 42% en ancianos) y las pérdidas en 10p11 (47% en jóvenes y 34% en ancianos) se encontraron presentes en nuestra serie. A mayores, nosotros encontramos una gran parte del cromosoma 9 (9p13.1-q21.12) y tres regiones localizadas en el cromosoma 14 (14q11.1-q11.2) y 16 (16p13.11, 16p12.3) más frecuentemente perdidas en jóvenes. La región localizada en el cromosoma 9 codifica varios miembros de la familia de los factores de transcripción FOX que juegan un papel crítico en la regulación de la proliferación celular (DeGraff *et al.* 2012), además del gen *TJP2*, cuyo transcrito ha sido sugerido como marcador para el CCR (Kim *et al.* 2013). Más interesante resultó la región 16p13, un locus relacionado con el CCR (Krijgsman *et al.* 2012, Mampaey *et al.* 2015, Xie *et al.*

2012), que no había sido descrito como alteración recurrente en otros artículos previos (Brosens *et al.* 2011, Loo *et al.* 2013, Sawada *et al.* 2013).

La falta de concordancia entre nuestros resultados y los publicados por Berg (Berg *et al.* 2010), posiblemente sea consecuencia de la baja incidencia que supone el CCR a edades inferiores o iguales a los 45 años, pues es sabido que con pequeños tamaños muestrales los análisis estadísticos no son capaces de discernir entre una consecuencia real y un efecto aleatorio. Por tanto, teniendo en cuenta que la serie de Berg únicamente incluye 40 tumores (23 de inicio temprano y 17 de inicio tardío), la falta de significación en sus resultados no necesariamente implicaría la ausencia de una consecuencia real, y viceversa. Aunque nuestro estudio incluye un mayor número de muestras (60 tumores de inicio temprano y 86 de inicio tardío), el tamaño muestral continúa sin ser lo suficientemente grande como para poder aportar resultados más concluyentes que los publicados por Berg (Berg *et al.* 2010). Por tanto, deberían ser entendidos como un complemento de los mismos y ser confirmados en futuros trabajos que incluyan un mayor número de pacientes.

4.3. Aneuploidía

El último aspecto que debe ser considerado al hablar de INC es el perfil de ganancias o pérdidas de cromosomas enteros, dado que en parte, y al igual que el resto de cambios identificados, podría no ser aleatorio. A menudo, la aneuploidía es utilizada como una métrica para evaluar la INC, pues su presencia ha sido relacionada con pronósticos adversos (Mouradov *et al.* 2013). Se han descrito algunas alteraciones específicas durante la etapa de adenoma, mientras que otros cambios parecen más evidentes en las lesiones avanzadas (Habermann *et al.* 2007). Hasta el momento, se sabe que las trisomías 7 y 20 son anomalías cromosómicas comunes y recurrentes durante las diversas etapas de CRC (Lassmann *et al.* 2007). En concreto, la trisomía del cromosoma 7 parece constituir una de las primeras alteraciones en los adenomas, con una frecuencia aproximada del 40% (Habermann *et al.* 2007). Según se ha visto, esta alteración confiere una ventaja en el crecimiento celular, pudiendo afectar a la fisiología normal del colon y promover la tumorigénesis (Ly *et al.* 2011). Además, la pérdida parcial del cromosoma 18 se observa en carcinomas de colon (73%) y en adenomas avanzados (47%), pero sólo ocasionalmente en adenomas tempranos (11-13%)

(Boticario *et al.* 2012). Nuestros resultados muestran que las ganancias de los cromosomas 7 y 20, y las pérdidas del cromosoma 18 fueron más frecuentes en el grupo de población anciana, lo que apoyaría la hipótesis de que la edad de aparición influye en los desequilibrios genómicos (Beroukhim *et al.* 2010). También las pérdidas del cromosoma 5 (que contiene *APC*) fueron mayoritarias entre los individuos de mayor edad, lo que estaría de acuerdo con el planteamiento de que tal vez los tumores de inicio tardío se encuentran más predispuestos a seguir el modelo tradicional de carcinogénesis propuesto por Fearon y Vogelstein, como ya se ha indicado previamente.

Aunque el porcentaje de pacientes con afectación de cromosomas enteros fue similar en las dos poblaciones (68,3% en jóvenes y 66,3% en ancianos), la cifra total de cromosomas alterados fue más alta en la población anciana (289 vs. 178). Curiosamente, la ganancia del cromosoma 19 constituyó el evento más frecuente en ambos grupos, dato que resulta interesante puesto que el cromosoma 19 contiene, entre otros, el gen *STK11* (región 19p13.3), un supresor tumoral cuyas mutaciones han sido relacionadas con el síndrome de Peutz-Jeghers (trastorno caracterizado por el crecimiento de pólipos a lo largo del tracto gastrointestinal, que confiere un riesgo aumentado de padecer CCR).

5. AGRUPACIÓN JERÁRQUICA NO SUPERVISADA

El análisis de agrupación jerárquica sin supervisión es un método que reúne elementos con características comunes desconocidas. Su aplicación a la investigación del cáncer permite organizar los tumores en base a la semejanza/desigualdad de su perfil molecular, por lo que algunos autores ya han realizado los primeros intentos de estratificación en base a los marcadores inmunohistoquímicos (Alkushi *et al.* 2007) o a las características genéticas y epigenéticas (Shen *et al.* 2007). Más recientemente, la técnica ha sido utilizada para tratar de establecer una correlación entre el perfil genético y las características clinicopatológicas de los tumores, demostrando ser una herramienta útil, prometedora y potente para tal fin (Furlan *et al.* 2011).

5.1. Agrupación jerárquica no supervisada global

El análisis no supervisado de los 146 tumores diferenció claramente dos grupos en base al perfil de INC (*cluster 1* y *cluster 2*). Cada uno de los grupos estuvo mayoritariamente compuesto por muestras procedentes de una de las dos poblaciones, de modo que los tumores de inicio temprano predominaron en el *cluster 1* y los de inicio tardío lo hicieron en el *cluster 2*. En términos generales, el *cluster 1* se caracterizó por un mayor GII^{total} que también incluyó un mayor GII para las ganancias y las pérdidas. Sin embargo, la cifra media de segmentos alterados por tumor reveló resultados opuestos, manifestando un valor más elevado en el caso del *cluster 2* ($p=0,005$) (Tabla IV.14). Una posible explicación para este hecho podría derivarse del grado de especificidad conseguido en la hibridación, pues las hibridaciones inespecíficas (más probables conforme disminuye el tamaño de la sonda) reducen la calidad del ensayo. En consecuencia, los hallazgos patológicos (principalmente aquellos de tamaño inferior a 1Mb por ser más proclives a sufrir errores de muestreo) deberían ser confirmados mediante otros procedimientos genómicos (FISH [*fluorescent in situ hybridization*], MLPA, qPCR, etc.). En nuestra serie, el 39% de los segmentos alterados del *cluster 2* midió menos de 1Mb, mientras que dicho porcentaje disminuyó hasta el 33% en el *cluster 1*. De acuerdo al razonamiento anterior, el *cluster 2* sería más susceptible de acumular errores de hibridación, y por tanto, se encontraría más expuesto a la incorrecta interpretación de las señales derivadas de las hibridaciones inespecíficas (resultados falsamente positivos).

Se observaron un total de 154 alteraciones recurrentes con afectación significativamente diferencial entre los dos *clusters*. Los porcentajes de frecuencia más extremos estuvieron asociados al *cluster 1* e incluyeron ganancias en 19p13 y pérdidas en 14q11, ambas con un 60% de frecuencia (Anexo 5). La LOH en 19p13.3 ha sido relacionada con fases avanzadas en la enfermedad y con una mayor predilección por la localización izquierda (Trojan *et al.* 2000). Además, esta región contiene varios genes relacionados con el desarrollo de malignidad y la progresión de ciertos tipos de tumores, entre los que se encuentran *FGF22*, *RNF126* y *KISS1R* (Jarosz *et al.* 2012, Papaoiconomou *et al.* 2014, Zhi *et al.* 2013), o el gen *MADCAM1*, cuya relación con la enfermedad inflamatoria intestinal ha sido

reportada (Biancheri *et al.* 2013). Respecto al segmento alterado en la región 14q11, sus pérdidas también han sido descritas como mayoritarias entre los pacientes menores de 50 años (Mourra *et al.* 2007), aunque no todos los autores confirman este hecho (Berg *et al.* 2010). En nuestra serie, la región 14q11 mostró diferencias significativas entre los dos *clusters* ($p < 0,05$ y $FDR > 0,09$), con una recurrencia del 60% en el *cluster* 1 (mayoritariamente compuesto por jóvenes), y menos del 40% en el *cluster* 2 (mayoritariamente compuesto por ancianos). Por consiguiente, nuestros resultados se encuentran alineados con los descritos por Mourra y colaboradores (Mourra *et al.* 2007).

5.1.1. Correlación anatomoclínica y molecular para el *cluster* global

Una vez conocida la estratificación de los tumores en grupos molecularmente homogéneos, se procedió a evaluar la existencia de paralelismo entre las características anatomoclínicas y el patrón de INC definido por el análisis jerárquico no supervisado. Para evitar el sesgo ocasionado por la diferencia de edad, no se efectuó la comparación de parámetros como la ST, SLE o la tasa de mortalidad. A excepción de la variable relacionada con los antecedentes familiares, ninguno de los parámetros que sí pudieron ser comparados mostró diferencias estadísticamente significativas.

Como era de esperar, los pacientes con agregación familiar predominaron en el *cluster* con mayor proporción de adultos jóvenes (*cluster* 1), mientras que los casos esporádicos lo hicieron en el contrario ($p = 0,011$). Las restantes características clínicas fueron las esperadas teniendo en cuenta la edad de los pacientes incluidos en cada *cluster*. Coincidiendo con la literatura, la localización izquierda, los bajos grados de diferenciación y los tumores con diferenciación mucinosa predominaron en el *cluster* con mayor número de adultos jóvenes (*cluster* 1) (Chang *et al.* 2012, Myers *et al.* 2013, Stigliano *et al.* 2014), mientras que el promedio de pólipos lo hizo en el *cluster* 2, donde los adultos ancianos fueron más numerosos (Chang *et al.* 2012).

La comparación de los pacientes discordantes minoritarios de cada *cluster* (ancianos del *cluster* 1 y jóvenes del *cluster* 2) con sus análogos mayoritarios en el *cluster* opuesto, no reveló diferencias importantes que contribuyesen a establecer una correlación entre el perfil de INC y el fenotipo tumoral. En el caso de los

tumores de inicio temprano sólo se alcanzó la significación estadística al evaluar la presencia de células en “anillo de sello”, más frecuentes en el *cluster* 2 ($p=0,016$). Se sabe que esta variedad histológica constituye un factor pronóstico negativo para el CCR (Inamura *et al.* 2015), por lo que no resulta extraño que los jóvenes estratificados dentro de dicho *cluster* se asociasen con valores más desfavorables de ST y SLE.

En el caso de los tumores de inicio tardío sucedió algo similar, y únicamente se alcanzó la significación al comparar la tasa de mutación *BRAF* ($p=0,001$). Las mutaciones en *BRAF* también han sido señaladas como elementos negativos sobre el pronóstico de los pacientes (Foltran *et al.* 2015), por lo que en este caso tampoco es de extrañar que los ancianos estratificados dentro del *cluster* con mayor tasa de mutación en el gen (*cluster* 1) se asociasen con valores más desfavorables de ST y SLE.

5.2. Agrupación jerárquica no supervisada de los adultos jóvenes

Del mismo modo que sucedió en el análisis no supervisado de todas las muestras, los adultos jóvenes fueron estratificados en dos grupos principales: el *cluster* A y el *cluster* B, cada uno de los cuales se encontró a su vez dividido en dos grupos secundarios. Casi todas las variables relacionadas con el grado de INC fueron superiores en el *cluster* B, aunque sólo se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas al evaluar el promedio de aneuploidía ($p=0,026$) (Tabla IV.15). Este hallazgo concuerda con lo que cabría esperar teniendo en cuenta los antecedentes familiares de los individuos estratificados dentro de cada *cluster*. Como ya se ha comentado, el 80-85% de los tumores esporádicos se origina siguiendo la vía de carcinogénesis propuesta por Fearon y Vogelstein (Osorio *et al.* 2014). En nuestra serie, el *cluster* B incluyó un mayor porcentaje de tumores de naturaleza esporádica (50% vs. 39,5%), por lo que de acuerdo a lo anterior, sería esperable que la inestabilidad de dicho *cluster* fuese superior, tal y como se ha observado. En contra de lo que cabría esperar, el promedio de alteraciones por muestra fue superior en el *cluster* A. Sin embargo, es importante señalar que la mayor contribución a tal cifra se debió a segmentos con tamaños inferiores a 1Mb, y como ya se adelantó en el Apartado 4.1 de la Discusión, dichas alteraciones tienen una mayor probabilidad de ser debidas a errores de muestreo. Cuando se

compararon los subgrupos derivados de los *clusters* principales, llamó la atención que el subgrupo A1 acumuló la práctica totalidad de la inestabilidad asociada al *cluster* A (Tabla IV.16). Es sabido que cuando una variable sigue una distribución normal, el promedio de las medias muestrales es igual a la media poblacional. Partiendo de esta premisa, resulta sencillo comprender que la discrepancia entre los subgrupos A1 y A2 quedase enmascarada al evaluar el *cluster* A como una sola entidad, y que por tanto, no se observasen diferencias al comparar su inestabilidad con la del *cluster* B (Tabla IV.15).

La región 19p13 (examinada con detalle en los Apartados 4.3 y 5.1 de la Discusión) se encontró ganada en el 72% de los tumores del *cluster* A, mientras que la región 12q24 se encontró perdida en el 50% de los del *cluster* B. Esta última, contiene cuatro genes altamente conservados en algunos animales (*TMEM132C*, *SLC15A4*, *GLT1D1* y *TMEM132D*), aunque su patología en humanos todavía no es del todo conocida. Algunos estudios han encontrado una relación prometedora, aunque no significativa, entre las alteraciones en 12q24 y el CCR esporádico (Peters *et al.* 2013), sin embargo, no todos los autores han podido confirmarla (Whiffin *et al.* 2014). Pese a ello, la región ha sido sugerida como un *loci* de susceptibilidad para el CCR (Cicek *et al.* 2012). Dentro del *cluster* A2, sólo hubo un cambio que cumpliera los criterios de recurrencia fijados en este trabajo (frecuencia $\geq 30\%$). Se localizó en la región 2q12-q13 (64%) y se asoció con pérdidas de la misma. Esta región alberga genes relacionados con el desarrollo y progresión de algunos tumores entre los que se encuentran *MALL* (vinculado a melanomas) y *BCL2L11* (regulador de la muerte celular vinculado a neoplasias hematológicas), además del protooncogén *MERTK* y la subunidad mayor del complejo promotor de la anafase (*ANAPC1*, *Anaphase promoting complex subunit 1*). La región también alberga a *BUB1*, un gen que codifica para una serina/treonina quinasa de punto de control mitótico cuyas alteraciones han sido relacionadas con diversas neoplasias. En humanos, las mutaciones en *BUB1B* se relacionan con el síndrome de aneuploidía en mosaico variegada, una anomalía caracterizada por aneuploidías múltiples en mosaico que predisponen al desarrollo de neoplasias a edades muy tempranas. Recientemente, se ha visto que entre dichas neoplasias se incluyen los tumores gastrointestinales, y más concretamente, el CCR de inicio precoz (de Voer *et al.* 2013, Hoang *et al.* 2013, Rio Frio *et al.* 2010). Además, la

región 2q13 contiene un *loci* genómico que contribuye a la variación de los niveles de expresión (eQTL, *Expression quantitative trait loci*) del gen *PAX8*, recientemente relacionado con el CCR (Baker *et al.* 2015).

En los subgrupos B3 y B4 se observaron varias alteraciones recurrentes con frecuencias de aparición muy elevadas. Algunas de las regiones afectadas albergaron genes relacionados con distintos tumores (*RASA1*, *ERAP1*, *NR2F1*, *GLRX*, *FER*, *RGMB*, *ACKR3*, *GBX2*, *HES6*, *FLT1*, *FLT3*, *PDX1*, *GTF3A*, *POMP*, *CCDC37*, etc.), sin embargo, sólo una contuvo un gen vinculado al desarrollo de CCR. Se trató de la región 13q12 y del gen *CDX2*, un factor de transcripción específico que se expresa de forma temprana en el desarrollo intestinal, y cuya falta de expresión parece asociarse con un mal pronóstico de la enfermedad (Bae *et al.* 2015, Salari *et al.* 2012).

5.2.1. Correlación anatomoclínica y molecular en adultos jóvenes

No se observaron diferencias significativas en cuanto a las características anatomopatológicas de los tumores incluidos en los *clusters* A y B, siendo en general las esperadas teniendo en cuenta el mayor o menor componente familiar de cada uno de ellos. Como ya se ha mencionado, los tumores esporádicos suelen seguir la vía supresora durante su génesis, por lo que habitualmente son tumores asociados a EMS que presentan localización distal (Chang *et al.* 2012, Myers *et al.* 2013, Stigliano *et al.* 2014). Del mismo modo, la vía mutadora se relaciona con fenotipos característicos que incluyen la mayor frecuencia de la localización proximal, la mayor presencia de mucina y los menores grados de diferenciación (Kastrinos *et al.* 2013, Schneider *et al.* 2014, Valle 2014). En sintonía con esto, el *cluster* B, asociado a un mayor componente esporádico (50% vs. 39,5%), mostró predominio de la localización izquierda, mientras que el *cluster* A, asociado a una mayor agregación familiar (60,5% vs. 50%), mostró predominio de los tumores pobremente diferenciados y de las neoplasias mucosecretoras.

El CCR en el adulto joven suele presentar bajos grados de diferenciación, producción de mucina y células en “anillo de sello” (Chang *et al.* 2012). La invasión linfática y el patrón de crecimiento infiltrativo constituyen otras de sus características habituales, por lo que suelen ser tumores relacionados con comportamientos agresivos (Osorio *et al.* 2014). En el análisis de supervivencia

realizado mediante el estimador de Kaplan-Meier, se evaluó la ST y la SLE de los *clusters* principales (A y B) y secundarios (A1, A2, B3, B4), obteniendo únicamente relación significativa al comparar la aparición de recidiva entre los grupos A y B, claramente superior en el *cluster* A ($p=0,038$). Teniendo en cuenta que un mayor grado de INC se asocia con resultados clínicos más desfavorables (Hveem *et al.* 2014, Mouradov *et al.* 2013), en nuestra serie cabría esperar un peor pronóstico en el *cluster* B. En contra de ello, fueron los tumores del *cluster* A los asociados a peores resultados clínicos, posiblemente como consecuencia del error introducido al no considerar la diferencia de inestabilidad existente entre los subgrupos derivados de él. Para evitar esta fuente de error, las sucesivas comparaciones fueron realizadas considerando los cuatro subgrupos de manera independiente.

Como era de esperar, el subgrupo con menor grado de INC presentó el mayor porcentaje pacientes con SL (*cluster* A2). Algunos autores han propuesto la IMS como un factor pronóstico asociado a resultados clínicos más favorables (Richman, 2015). En consonancia con esto, las variables ST, SLE, mortalidad y recidiva de nuestra serie presentaron mejores resultados en los subgrupos con mayor porcentaje de neoplasias IMS (Tablas IV.16, IV.17 y IV.18). Otros autores, sin embargo, consideran el estadio tumoral como el marcador más específico para la predicción de resultados, aunque su utilización cada vez resulta más comprometida debido al creciente uso de los programas de cribado poblacional (Walther *et al.* 2009). Nuestros resultados también corroboran esta afirmación, puesto que el mayor porcentaje de neoplasias en estadios III y IV se encontró incluido dentro del subgrupo con peor pronóstico (B4).

Coincidiendo con lo que ya se conoce para el CCR de forma general, la metástasis al diagnóstico se confirmó como un factor de mal pronóstico en nuestro estudio. Por ello, parece razonable pensar que el mal pronóstico de los adultos jóvenes no depende únicamente del factor “edad precoz”, sino que podría ser la combinación de éste y otros marcadores (dejando aparte los relacionados con la estadificación tumoral), la que ayudase a definir qué pacientes van a estar predispuestos a seguir una evolución más favorable, y cuáles no. Nuestros hallazgos sugieren como uno de estos posibles marcadores la IMS, lo que se ajustaría a lo publicado por otros autores (Richman, 2015).

5.3. Agrupación jerárquica no supervisada de los adultos ancianos

Nuevamente, el análisis estratificó los tumores en dos grupos principales: el *cluster* C y el *cluster* D, cada uno de los cuales se encontró a su vez dividido en dos grupos secundarios. En esta ocasión, los grupos principales difirieron significativamente en cuanto a sus características de inestabilidad, concentrándose en uno de ellos la práctica totalidad de la misma. Estos hallazgos coinciden con lo que cabría esperar teniendo en cuenta los antecedentes familiares predominantes en cada uno, pues la mayor inestabilidad se localizó en el grupo con mayor porcentaje de casos esporádicos (*cluster* C). Además, y dado que las vías supresora y mutadora son consideradas mutuamente excluyentes, en este mismo *cluster* se esperaría el menor porcentaje de tumores IMS, como también se ha observado.

Es sabido que los tumores con IMS pueden tener naturaleza hereditaria o esporádica, y que tanto la hipermetilación de los promotores génicos del sistema MMR como las mutaciones en *BRAF* se encuentran fuertemente asociadas con la segunda de ellas (Kirzin *et al.* 2014, Li *et al.* 2013). En línea con esto, el 57,2% de los tumores IMS de la serie presentó mutación *BRAF* (28,6%) o hipermetilación en el promotor de *MLH1* (28,6%). Las mutaciones en *BRAF* suelen estar presentes en el 5-15% de los CCR, ciñéndose casi en exclusiva a los tumores esporádicos (Richman, 2015). Nuestros resultados se encuentran en armonía con esta afirmación, pues el 4,7% de la población anciana mostró la alteración activadora más frecuente del gen (p.V600E).

A diferencia de lo acontecido en pacientes jóvenes, no existió ninguna alteración común a todos los tumores, si bien se contabilizaron 168 cambios recurrentes (52 ganancias y 116 pérdidas) con afectación significativamente diferencial en los dos *clusters* principales. Dichas alteraciones se encontraron repartidas de forma heterogénea, con predominio de ganancias y pérdidas en el *cluster* más inestable (Anexo 7). La alteración más frecuente del *cluster* C implicó la pérdida del brazo largo del cromosoma 22 (56%), donde se localizan varios genes relacionados con el desarrollo de neoplasias (*UPK3A*, *SRRD*, *RRP7A*, *BCR*, *DDT*, *SEPT5*, *EWSR1*, *SOX10*, etcétera), además de otros directamente relacionados con el CCR (*MMP11*, *GSTT2*, *CHEK2* y *EP300*). El gen *MMP11*, fue descrito por primera vez en el estroma que rodea las células neoplásicas que conforman el cáncer de mama, detectándose más

tarde en el estroma de otros tumores como el cáncer gástrico (Resende *et al.* 2011). Sus niveles de proteína han sido sugeridos como un marcador predictivo en suero, de forma que valores elevados se asocian con peor pronóstico (Yan *et al.* 2011, Yang *et al.* 2008). Por su parte, los polimorfismos en el promotor de *GSTT2* y las mutaciones en *CHEK2* (gen relacionado con el cáncer de mama y con el síndrome de Li-Fraumeni-like), parecen asociarse con un mayor riesgo de padecer CCR (Jang *et al.* 2007, Han *et al.* 2013). Finalmente, el gen *EP300* codifica para una proteína cuyos defectos juegan un papel importante en el desarrollo de los tumores epiteliales (histología mayoritaria en el CCR), y cuya sobreexpresión podría representar un factor pronóstico favorable para la SLE de los pacientes con CCR (Huh *et al.* 2013).

En lo que respecta al *cluster D*, las pérdidas en 9q21 constituyeron las alteraciones más frecuentes (54%). Esta región contiene el gen *KLF9*, un factor de transcripción implicado en el control del crecimiento, la proliferación, la apoptosis y la angiogénesis de una amplia variedad de tejidos y células. Algunos autores han referido bajos niveles de proteína en pacientes con CCR, sugiriendo su posible implicación durante el proceso de carcinogénesis (Brown *et al.* 2015). Asimismo, el 31% de los tumores del *cluster D* mostró ganancias en el locus 19q13, región examinada en detalle en los Apartados 4.3 y 5.1 de la Discusión.

La comparación de los subgrupos derivados de los *clusters* principales reveló diferencias estadísticamente importantes entre C1 y C2, que se tornaron moderadas entre D3 y D4 (Tablas IV.20 y IV.21). En términos generales, el subgrupo C2 resultó más inestable que C1 y el subgrupo D4 más inestable que D3. No obstante, las diferencias significativas fueron dependientes de diferentes factores en cada uno de ellos, estando ligadas al número de CNV en los subgrupos derivados de C (Tabla IV.20), y a los GII en los subgrupos derivados de D (Tabla IV.21). En estos últimos, además, se observó una situación parecida a la descrita en el análisis no supervisado de los adultos jóvenes, en la que uno de los subgrupos (en este caso D4) acumuló casi toda la inestabilidad asociada al *cluster* principal (ver Apartado 5.2 de la Discusión). El 59% de los tumores de C1 mostraron pérdidas en 4p15.2, mientras que el 50% de los de C2 lo hicieron en 6p12. En la región 4p15.2 apenas se localizan genes importantes desde el punto de vista

oncológico, pudiendo únicamente mencionar a *CCKAR*, un gen que codifica para un importante mediador fisiológico de la secreción de enzimas pancreáticas relacionado con el desarrollo de tumores en el tracto biliar (Xu *et al.* 2013). En lo que respecta a la región 6p12, se sabe que alberga genes relacionados con el desarrollo de ciertos tipos de tumores entre los que se encuentran *CD2AP* (vinculado al cáncer renal) y *CRISP3* (vinculado al cáncer de próstata), además de cinco miembros de la familia de enzimas de desintoxicación de carcinógenos en la dieta (*GSTA1*, *GSTA2*, *GSTA3*, *GSTA4*, *GSTA5*). Por último, mencionar que dentro de los subgrupos D3 y D4 predominaron las mismas alteraciones que en el *cluster* D: las pérdidas en 9q21 (región analizada en el párrafo anterior) y las ganancias en 19q13 (región analizada en los Apartados 4.3 y 5.1 de la Discusión).

5.3.1. Correlación anatomoclínica y molecular en adultos ancianos

Los *clusters* C y D mostraron características clínicas y pronósticas similares, por lo que apenas se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos. El colon izquierdo (23,2% en C vs. 33,3% en D) y el recto/unión rectosigmoidea (37,5% en C vs. 40% en D) constituyeron las localizaciones predominantes en los dos grupos, hecho por otra parte esperable dada la naturaleza esporádica de todos los tumores (Banerjea *et al.* 2009). Se observaron, sin embargo, diferencias respecto a los grados de diferenciación: mientras que en el *cluster* C los tumores predominantes fueron moderadamente o bien diferenciados (91,5%), en el *cluster* D la diferenciación mayoritaria fue moderada/baja (95,7%). Aunque el grado de diferenciación representa un factor asociado a mal pronóstico, el estadio tumoral continua siendo el marcador más específico para la predicción de resultados clínicos (Walther *et al.* 2009). Teniendo en cuenta esto, no es de extrañar que el *cluster* con mayor porcentaje de tumores diseminados en el momento de diagnóstico (23,2% en C y 16,7% en D) presentase valores más desfavorables de ST ($37,56 \pm 23,06$ vs. $44,57 \pm 37,67$) y SLE ($30,50 \pm 25,80$ vs. $32,00 \pm 36,36$), a pesar de ser el *cluster* con mayores grados de diferenciación (29,8% vs. 4,3%).

El mal pronóstico del *cluster* C también se vio reforzado por el menor porcentaje de neoplasias IMS, un factor relacionado con resultados clínicos favorables pero minoritario dentro de dicho *cluster* (5,4% vs. 13,3%) (Richman, 2015). Como se adelantó en el Apartado 3 de la Discusión, no existió ningún tumor con mutación

patogénica en los genes MMR, por lo que no hubo ningún caso confirmado con SL entre los adultos ancianos. Como era de esperar, la IMS fue producto de la mutación en *BRAF* y de la metilación de los promotores de los genes del sistema de reparación del ADN, principalmente de *MLH1* (Kirzin *et al.* 2014, Li *et al.* 2013, Richman 2015). Tanto la ST ($46,50 \pm 23,44$ vs. $45,14 \pm 12,82$) como la SLE ($42,75 \pm 28,99$ vs. $7,42 \pm 10,79$) fueron más favorables en los pacientes con *BRAF* alterado, llegándose a alcanzar la significación estadística sólo en el caso de la SLE ($p=0,015$) (Loupakis *et al.* 2009).

No se observaron diferencias importantes desde el punto de vista anatomopatológico al comparar los cuatro subgrupos derivados de los *clusters* principales, alcanzando el nivel de significación únicamente al evaluar el promedio de pólipos y la tendencia al desarrollo de tumores metacrónicos, ambos significativamente superiores en D3 (Tabla IV.22). Tampoco se obtuvieron diferencias significativas para ninguno de los parámetros analizados mediante el estimador de Kaplan-Meier. En líneas generales, el pronóstico de C1 fue más favorable que el de C2, y el de D3 más favorable que el de D4. Previsiblemente, estos hallazgos concuerdan con lo que cabría esperar si se considera su INC (Tablas IV.20 y IV.21), que como ya se ha comentado, se encuentra ligada a un peor pronóstico conforme aumenta su magnitud (Hveem *et al.* 2014, Mouradov *et al.* 2013). En contra de lo esperable, la localización izquierda (típica de los tumores INC) fue predominante en el subgrupo cromosómicamente más estable (D3). Curiosamente, este subgrupo también incluyó la mayor tasa de mutación en *BRAF*, por lo que nuestros resultados parecen situar a las mutaciones en *BRAF* como un condicionante de la localización tumoral más potente incluso que la INC. Por último, el *cluster* con mayor proporción de tumores IMS (C2) presentó predominio de las características propias de los tumores desarrollados mediante la vía mutadora, siendo el que albergó un mayor porcentaje de tumores proximales y una mayor producción de mucina (Kastrinos *et al.* 2013, Schneider *et al.* 2014, Valle 2014).

6. INESTABILIDAD CROMOSÓMICA Y SÍNDROME DE LYNCH

La IMS es un fenómeno molecular característico del SL, que surge como consecuencia del mal funcionamiento de la maquinaria enzimática que corrige los errores producidos durante la replicación del ADN.

La vía carcinogénica asociada a la formación de las neoplasias IMS (vía mutadora) se considera excluyente de la otra gran vía de carcinogénesis conocida (vía supresora), por lo que los tumores desarrollados a partir de cada una de ellas no deberían presentar características propias de la otra y viceversa. En otras palabras, se espera que los tumores con IMS no presenten INC, y que los tumores con INC no presenten IMS. En contra de ello, en nuestra serie hubo 4 pacientes jóvenes con SL que arrojaron resultados contradictorios. Aunque estos 4 pacientes manifestaron la IMS propia del síndrome, también manifestaron un grado de INC similar al que cabría esperar en tumores de naturaleza esporádica, y por tanto, generados mediante la vía supresora (Tablas IV.23 y IV.24). Estos 4 tumores presentaron histología de adenocarcinoma y mostraron predilección por el colon izquierdo. No se relacionaron con el desarrollo de tumores sincrónicos y/o metacrónicos ni con la aparición de recidiva, sin embargo, los 4 presentaron características pronósticas más desfavorables que sus análogos cromosómicamente estables, encontrándose asociados a valores más bajos de ST y SLE.

Es importante señalar que hasta la fecha, no existe un criterio universal que permita clasificar el CCR como estable o inestable en términos de INC. Se han utilizado distintos enfoques metodológicos (citometría, cariotipo, análisis de LOH, FISH, y más recientemente, a-CGH) para tratar de solventar este problema, sin embargo, a día de hoy continúa siendo un aspecto dependiente de la publicación consultada. Así, mientras que unos autores consideran cromosómicamente inestables aquellos tumores con aneuploidía o LOH en regiones concretas del genoma (Furlan *et al.* 2011), otros han llegado a proponer diferentes grados de inestabilidad en base al número de alteraciones acumuladas (Weber *et al.* 2007), o a establecer umbrales a partir de los valores de GII^{total} obtenidos mediante análisis a-CGH (Bonnet *et al.* 2012). Los 4 tumores asociados al SL con características especiales de nuestra serie podrían ser considerados inestables en base a todos los

criterios mencionados anteriormente. Por un lado, los 4 mostraron ganancias y pérdidas de cromosomas enteros, destacando en tres de ellos la ganancia del cromosoma 22 (Tabla IV.24) que como se mencionó en el Apartado 5.3 de la Discusión, alberga varios genes relacionados con el cáncer en general y con el CCR en particular. Además, los 4 se caracterizaron por un elevado número de segmentos alterados por muestra, superando la centena de CNVs en todos los casos (Tabla IV.24). Finalmente, los 4 se encontraron estratificados dentro de los subgrupos con mayor inestabilidad del análisis jerárquico no supervisado (subgrupos A1 y B3).

No existen antecedentes bibliográficos sobre tumores asociados al SL que, además, exhiban INC, por lo que la interpretación de nuestros hallazgos resulta muy complicada. En parte, podrían ser consecuencia del solapamiento las dos vías principales de carcinogénesis, y en parte, podrían incluso estar relacionados con el papel que ejercen los factores ambientales sobre el desarrollo de la enfermedad. En cualquier caso, queda patente la enorme complejidad que rodea a este tipo de neoplasia, y más específicamente, a la subpoblación joven.

VI. CONCLUSIONES

1. El CCR en el adulto joven presenta características clínicas y anatomopatológicas diferentes al del adulto anciano. En general, son tumores preferentemente localizados en el colon izquierdo, con menor grado de diferenciación y mayor frecuencia de neoplasias productoras de moco o con células en “anillo de sello”. Aunque habitualmente se asocian con un mayor número de pólipos, son tumores menos propensos al desarrollo de neoplasias sincrónicas y/o metacrónicas.
2. Los adultos jóvenes con CCR presentan con mayor frecuencia antecedentes familiares de la misma patología, y suelen ajustarse a los criterios clínicos definidos para el SL. El 16,1% de la población joven presentó IMS, siendo el 53,8% de ellos consecuencia de mutaciones germinales en los genes del sistema MMR. El 13% de la población anciana también presentó IMS, sin embargo, en ningún caso dicha inestabilidad estuvo ligada a tales mutaciones.
3. El CCR presenta diferentes perfiles de inestabilidad genómica en función de la edad de inicio de la enfermedad. Los tumores de inicio temprano se caracterizan por un menor número de segmentos alterados pero una mayor cifra de cambios recurrentes, lo que podría significar que tal vez su proceso de carcinogénesis requiera la contribución de cambios más específicos, que lo hagan más susceptible de adaptarse a un patrón determinado de cambios.
4. Desde un punto de vista cuantitativo, hemos definido un conjunto de CNV frecuentemente afectadas en cada población, así como otras comunes a ambos grupos que contienen genes previamente relacionados con la carcinogénesis colorrectal. Estas regiones podrían jugar un papel crítico en el desarrollo de la enfermedad con independencia de la edad. Desde un punto de vista cualitativo, hemos definido 24 regiones con afectación significativamente diferencial entre las dos poblaciones.

5. Aunque por el momento no se conocen con detalle los mecanismos moleculares que subyacen tras el CCR en el adulto joven, su carcinogénesis parece estar vinculada a regiones cromosómicas que no son las más habituales en el desarrollo del CCR. Nuestros resultados indican que las pérdidas en 1p36, 1p12, 1q21 (que contiene *BCL9*), 9p13, 14q11, 16p13 y 16p12 son más frecuentes en los tumores de inicio temprano, mientras que las ganancias en 7q11 y 7q22 predominan en los de inicio tardío.

6. El análisis jerárquico no supervisado realizado en base al perfil de INC de cada población no mostró correlación con el pronóstico de la enfermedad. Se observó, sin embargo, un cierto grado de paralelismo entre las características anatomoclínicas y el patrón de INC, siendo esta correlación más acentuada en la población joven. En nuestra serie, además, la IMS parece asociarse con resultados clínicos más favorables.

7. A pesar de ser un número muy reducido de casos, se observaron 4 pacientes jóvenes con diagnóstico de síndrome de Lynch que presentaron parámetros de INC propios de los tumores esporádicos sin IMS. Dado que no existen antecedentes bibliográficos que relacionen el SL con niveles elevados de INC, nuestros hallazgos podrían estar aportando indicios sobre el solapamiento de estas dos vías principales de carcinogénesis, o incluso ser reflejo del papel que ejercen los factores ambientales sobre el desarrollo de la enfermedad.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*. 1993 May 7;260(5109):812-6.
- Alkushi A, Clarke BA, Akbari M, Makretsov N, Lim P, Miller D, et al. Identification of prognostically relevant and reproducible subsets of endometrial adenocarcinoma based on clustering analysis of immunostaining data. *Mod Pathol*. 2007 Nov;20(11):1156-65.
- Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. Molecular pathways in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012 Sep;27(9):1423-31.
- Anderson JC. Pathogenesis and management of serrated polyps: current status and future directions. *Gut Liver*. 2014 Nov;8(6):582-9.
- Antelo M, Balaguer F, Shia J, Shen Y, Hur K, Moreira L, et al. A high degree of LINE-1 hypomethylation is a unique feature of early-onset colorectal cancer. *PLoS One*. 2012;7(9):e45357.
- Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res*. 2012 Jan;5(1):19-27.
- Armelao F, de Pretis G. Familial colorectal cancer: a review. *World J Gastroenterol*. 2014 Jul 28;20(28):9292-8.
- Arvelo F, Sojo F, Cotte C. Biology of colorectal cancer. *Ecancermedicalscience*. 2015 Apr 9;9:520.
- Astler VB, Collier FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg*. 1954 Jun;139(6):846-52.
- Ayiomamitis GD, Notas G, Zaravinos A, Zizi-Sermpetzoglou A, Georgiadou M, Sfakianaki O, et al. Differences in telomerase activity between colon and rectal cancer. *Can J Surg*. 2014 Jun;57(3):199-208.
- Baca B, Beart RW Jr, Etzioni DA. Surveillance after colorectal cancer resection: a systematic review. *Dis Colon Rectum*. 2011 Aug;54(8):1036-48.

- Bae JM, Kim JH, Cho NY, Kim TY, Kang GH. Prognostic implication of the CpG island methylator phenotype in colorectal cancers depends on tumour location. *Br J Cancer*. 2013 Aug 20;109(4):1004–12.
- Bae JM, Lee TH, Cho NY, Kim TY, Kang GH. Loss of CDX2 expression is associated with poor prognosis in colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol*. 2015 Feb 7;21(5):1457-67.
- Bae SI, Kim YS. Colon cancer screening and surveillance in inflammatory bowel disease. *Clin Endosc*. 2014 Nov;47(6):509-15.
- Baker H, Bandera EV, Bean Y, Beckmann MW, Bisogna M, Bjorge L, et al. Genome-wide significant risk associations for mucinous ovarian carcinoma. *Nat Genet*. 2015 Aug;47(8):888-97.
- Balmaña J, Balaguer F, Cervantes A, Arnold D; ESMO Guidelines Working Group. Familial risk-colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol*. 2013 Oct;24 Suppl 6:vi73-80.
- Banerjea A, Hands RE, Powar MP, Bustin SA, Dorudi S. Microsatellite and chromosomal stable colorectal cancers demonstrate poor immunogenicity and early disease recurrence. *Colorectal Dis*. 2009 Jul;11(6):601-8.
- Bas B, Dinc B, Oymaci E, Mayir B, Gunduz UR. What are the Endoscopic and Pathological Characteristics of Colorectal Polyps? *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(13):5163-7.
- Bass AJ, Lawrence MS, Brace LE, Ramos AH, Drier Y, Cibulskis K, et al. Genomic sequencing of colorectal adenocarcinomas identifies a recurrent VTI1A-TCF7L2 fusion. *Nat Genet*. 2011 Sep 4;43(10):964-8.
- Benedix F, Kube R, Meyer F, Schmidt U, Gastinger I, Lippert H. Comparison of 17,641 patients with right- and left-sided colon cancer: differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival. *Dis Colon Rectum*. 2010 Jan;53(1):57–64.

- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B* 1995;57:289-300.
- Berg M, Agesen TH, Thiis-Evensen E; INFAC-study group, Merok MA, Teixeira MR, Vatn MH, et al. Distinct high resolution genome profiles of early onset and late onset colorectal cancer integrated with gene expression data identify candidate susceptibility loci. *Mol Cancer*. 2010 May 6;9:100.
- Beroukhim R, Mermel CH, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J, et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 2010 Feb 18;463(7283):899-905.
- Biancheri P, Di Sabatino A, Rovedatti L, Giuffrida P, Calarota SA, Vetrano S, et al. Effect of tumor necrosis factor- α blockade on mucosal addressin cell-adhesion molecule-1 in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2013 Feb;19(2):259-64.
- Binefa G, Rodríguez-Moranta F, Teule A, Medina-Hayas M. Colorectal cancer: from prevention to personalized medicine. *World J Gastroenterol*. 2014 Jun 14;20(22):6786-808.
- Blanco-Calvo M, Concha Á, Figueroa A, Garrido F, Valladares-Ayerbes M. Colorectal Cancer Classification and Cell Heterogeneity: A Systems Oncology Approach. *Int J Mol Sci*. 2015 Jun 15;16(6):13610-32.
- Boardman LA, Johnson RA, Petersen GM, Oberg AL, Kabat BF, Slusser JP, et al. Higher frequency of diploidy in young-onset microsatellite-stable colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2007 Apr 15;13(8):2323-8.
- Boardman LA, Johnson RA, Viker KB, Hafner KA, Jenkins RB, Rieger-Johnson DL, et al. Correlation of chromosomal instability, telomere length and telomere maintenance in microsatellite stable rectal cancer: a molecular subclass of rectal cancer. *PLoS One*. 2013 Nov 21;8(11):e80015.
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer

- detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998 Nov 15;58(22):5248-57.
- Bonnet F, Guedj M, Jones N, Sfar S, Brouste V, Elarouci N, et al. An array CGH based genomic instability index (G2I) is predictive of clinical outcome in breast cancer and reveals a subset of tumors without lymph node involvement but with poor prognosis. *BMC Med Genomics.* 2012 Nov 27;5:54.
- Boticario C y Cascales M. *Innovaciones en cáncer.* Universidad Nacional de Educación a Distancia. Madrid, 2012.
- Brand R, Nielsen M, Lynch H, Infante E. MUTYH-Associated Polyposis. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K, editors. *GeneReviews®*[Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015. 2012 Oct 04.
- Brosens RP, Belt EJ, Haan JC, Buffart TE, Carvalho B, Grabsch H, et al. Deletion of chromosome 4q predicts outcome in stage II colon cancer patients. *Cell Oncol (Dordr).* 2011 Jun;34(3):215-23.
- Brown AR, Simmen RC, Raj VR, Van TT, MacLeod SL, Simmen FA. Krüppel-like factor 9 (KLF9) prevents colorectal cancer through inhibition of interferon-related signaling. *Carcinogenesis.* 2015 Sep;36(9):946-55.
- Bruin SC, Klijn C, Liefers GJ, Braaf LM, Joosse SA, van Beers EH, et al. Specific genomic aberrations in primary colorectal cancer are associated with liver metastases. *BMC Cancer.* 2010 Dec 2;10:662.
- Burbach JP, den Harder AM, Intven M, van Vulpen M, Verkooijen HM, Reerink O. Impact of radiotherapy boost on pathological complete response in patients with locally advanced rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Radiother Oncol.* 2014 Oct;113(1):1-9.
- Burghel GJ, Lin WY, Whitehouse H, Brock I, Hammond D, Bury J, et al. Identification of candidate driver genes in common focal chromosomal aberrations of

- microsatellite stable colorectal cancer. *PLoS One*. 2013 Dec 18;8(12):e83859.
- Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012 Jul 18;487(7407):330-7.
- Cappell MS. Pathophysiology, clinical presentation, and management of colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am*. 2008 Mar;37(1):1-24.
- Carethers JM, Stoffel EM. Lynch syndrome and Lynch syndrome mimics: The growing complex landscape of hereditary colon cancer. *World J Gastroenterol*. 2015 Aug 21;21(31):9253-61.
- Carro A, Rico D, Rueda OM, Díaz-Uriarte R, Pisano DG. WaviCGH: a web application for the analysis and visualization of genomic copy number alterations. *Nucleic Acids Res*. 2010 Jul;38(Web Server issue):W182-7.
- Cederquist K, Emanuelsson M, Göransson I, Holinski-Feder E, Müller-Koch Y, Golovleva I, et al. Mutation analysis of the MLH1, MSH2 and MSH6 genes in patients with double primary cancers of the colorectum and the endometrium: a population-based study in northern Sweden. *Int J Cancer*. 2004 Apr 10;109(3):370-6.
- Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin*. 2009 Nov-Dec;59(6):366-78.
- Chang DT, Pai RK, Rybicki LA, Dimaio MA, Limaye M, Jayachandran P, et al. Clinicopathologic and molecular features of sporadic early-onset colorectal adenocarcinoma: an adenocarcinoma with frequent signet ring cell differentiation, rectal and sigmoid involvement, and adverse morphologic features. *Mod Pathol*. Aug 2012; 25(8):1128-39.
- Chen Z, Liu Z, Li W, Qu K, Deng X, Varma MG, et al. Chromosomal copy number alterations are associated with tumor response to chemoradiation in locally advanced rectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011 Sep;50(9):689-99.

- Cheng W, Su Y, Xu F. CHD1L: a novel oncogene. *Mol Cancer*. 2013 Dec 21;12(1):170.
- Cicek MS, Cunningham JM, Fridley BL, Serie DJ, Bamlet WR, Diergaarde B, et al. Colorectal cancer linkage on chromosomes 4q21, 8q13, 12q24, and 15q22. *PLoS One*. 2012;7(5):e38175.
- Corral J, Borràs JM, Chiarello P, García-Alzorriz E, Macià F, Reig A, et al. Estimation of hospital costs of colorectal cancer in Catalonia (Spain). *Gac Sanit*. 2015 Aug 26. [Epub ahead of print].
- Cortejoso L, López-Fernández LA. Pharmacogenetic markers of toxicity for chemotherapy in colorectal cancer patients. *Pharmacogenomics*. 2012 Jul;13(10):1173-91.
- Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch Ht, Minsky B, Nordlinger B, et al. Colorectal cancer. *Lancet*. 2010 Mar 20;375(9719):1030-47.
- da Fonseca LM, da Luz MM, Lacerda-Filho A, Cabral MM, da Silva RG. Colorectal carcinoma in different age groups: a histopathological analysis. *Int J Colorectal Dis*. 2012;27:249-255.
- Davies RJ, Miller R, Coleman N. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. *Nat Rev Cancer*. 2005 Mar;5(3):199-209.
- DeGraff DJ, Clark PE, Cates JM, Yamashita H, Robinson VL, Yu X, et al. Loss of the urothelial differentiation marker FOXA1 is associated with high grade, late stage bladder cancer and increased tumor proliferation. *PLoS One*. 2012;7(5):e36669.
- de Jong AE, Morreau H, Van Puijenbroek M, Eilers PH, Wijnen J, Nagengast FM, et al. The role of mismatch repair gene defects in the development of adenomas in patients with HNPCC. *Gastroenterology*. 2004 Jan;126(1):42-8.
- de Voer RM, Geurts van Kessel A, Weren RD, Ligtenberg MJ, Smeets D, Fu L, et al. Germline mutations in the spindle assembly checkpoint genes BUB1 and BUB3 are risk factors for colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2013 Sep;145(3):544-7.

- Ding Y, Xuan W, Chen C, Chen Z, Yang Z, Zuo Y, et al. Differences in carcinoembryonic antigen levels between colon and rectal cancer. *Mol Clin Oncol*. 2014 Jul;2(4):618-622.
- Dinu D, Birla R, Caragui A, Constantinoiu S. Therapeutic strategies in colonic cancer. *Chirurgia (Bucur)*. 2014 Nov-Dec;109(6):741-6
- Drost M, Zonneveld J, van Dijk L, Morreau H, Tops CM, Vasen HF, et al. A cell-free assay for the functional analysis of variants of the mismatch repair protein MLH1. *Hum Mutat*. 2010 Mar;31(3):247-53.
- Dunn KB, Trudel JL. Colorectal Cancer: Adjuvant Therapy. *The ASCRS Textbook of Colon and Rectal Surgery*. 2011; 773-82.
- Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al. Colon and rectum. eds.: *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, NY: Springer. 2010:143-164.
- Fadhil W, Kindle K, Jackson D, Zaitoun A, Lane N, Robins A, et al. DNA content analysis of colorectal cancer defines a distinct 'microsatellite and chromosome stable' group but does not predict response to radiotherapy. *Int J Exp Pathol*. 2014 Feb;95(1):16-23.
- Fairley TL, Cardinez CJ, Martin J, Alley L, Friedman C, Edwards B, et al. Colorectal cancer in U.S. adults younger than 50 years of age, 1998-2001. *Cancer*. 2006 Sep 1;107(5 Suppl):1153-61.
- Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:479-507.
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun 1;61(5):759-67.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2013) GLOBOCAN 2012 v1.0. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (2013). Disponible en <http://globocan.iarc.fr>.

- Foltran L, De Maglio G, Pella N, Ermacora P, Aprile G, Masiero E, et al. Prognostic role of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in advanced colorectal cancer. *Future Oncol.* 2015 Feb;11(4):629-40.
- Friis S, Riis AH, Erichsen R, Baron JA, Sørensen HT. Low-Dose Aspirin or Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Use and Colorectal Cancer Risk: A Population-Based, Case-Control Study. *Ann Intern Med.* 2015 Aug 25. doi: 10.7326/M15-0039. [Epub ahead of print].
- Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992 Mar 1;89(5):1827-31.
- Furlan D, Carnevali IW, Bernasconi B, Sahnane N, Milani K, Cerutti R, et al. Hierarchical clustering analysis of pathologic and molecular data identifies prognostically and biologically distinct groups of colorectal carcinomas. *Mod Pathol.* 2011 Jan;24(1):126-37.
- Gao P, Song YX, Xu YY, Sun Z, Sun JX, Xu HM, et al. Does the prognosis of colorectal mucinous carcinoma depend upon the primary tumour site? Results from two independent databases. *Histopathology.* 2013 Nov;63(5):603-15.
- Georgiades IB, Curtis LJ, Morris RM, Bird CC, Wyllie AH. Heterogeneity studies identify a subset of sporadic colorectal cancers without evidence for chromosomal or microsatellite instability. *Oncogene.* 1999 Dec 23;18(56):7933-40.
- Giráldez MD, López-Dóriga A, Bujanda L, Abulí A, Bessa X, Fernández-Rozadilla C, et al. Susceptibility genetic variants associated with early-onset colorectal cancer. *Carcinogenesis.* 2012 Mar;33(3):613-9.
- Globocan, 2012. International Agency for Research on Cancer (Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer) [actualizado 9 Ene 2014, citado 27 Oct 2014]. Disponible en <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>.

- Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, Chang DK, Ricciardiello L, Carethers JM, et al. Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Res.* 2003 Apr 1;63(7):1608-14.
- Goel A, Nagasaka T, Spiegel J, Meyer R, Lichliter WE, Boland CR. Low frequency of Lynch syndrome among young patients with non-familial colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2010 Nov;8(11):966-71.
- Greene FL, Page DL, Fleming ID, et al. *AJCC Cancer Staging Manual*, 6.^a ed. New York, NY: Springer-Verlag (2002).
- Guldberg P, Guttler F. A simple method for identification of point mutations using denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 1993 May 11; 21(9): 2261-2.
- Guraya SY. Association of type 2 diabetes mellitus and the risk of colorectal cancer: A meta-analysis and systematic review. *World J Gastroenterol.* 2015 May 21;21(19):6026-31.
- Habermann JK, Paulsen U, Roblick UJ, Upender MB, McShane LM, Korn EL, et al. Stage-specific alterations of the genome, transcriptome, and proteome during colorectal carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer.* 2007 Jan;46(1):10-26.
- Han FF, Guo CL, Liu LH. The effect of CHEK2 variant I157T on cancer susceptibility: evidence from a meta-analysis. *DNA Cell Biol.* 2013 Jun;32(6):329-35.
- Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998 Jun 9;95(12):6870-5.
- Hoang D, Sue GR, Xu F, Li P, Narayan D. Absence of aneuploidy and gastrointestinal tumours in a man with a chromosomal 2q13 deletion and BUB1 monoallelic deficiency. *BMJ Case Rep.* 2013 Feb 25;2013.
- Hoskins JM, Ong PS, Keku TO, Galanko JA, Martin CF, Coleman CA, et al. Association of eleven common, low-penetrance colorectal cancer susceptibility genetic variants at six risk loci with clinical outcome. *PLoS One.* 2012;7(7):e41954.

- Houlston RS, Webb E, Broderick P, Pittman AM, Di Bernardo MC, Lubbe S, et al. Meta-analysis of genome-wide association data identifies four new susceptibility loci for colorectal cancer. *Nat Genet.* 2008 Dec;40(12):1426-35.
- Hughes S, Williams RD, Webb E, Houlston RS. Meta-analysis and pooled re-analysis of copy number changes in colorectal cancer detected by comparative genomic hybridization. *Anticancer Res.* 2006 Sep-Oct;26(5A):3439-44.
- Huh JW, Kim HC, Kim SH, Park YA, Cho YB, Yun SH, et al. Prognostic impact of p300 expression in patients with colorectal cancer. *J Surg Oncol.* 2013 Nov;108(6):374-7.
- Human Genome Variation Society (Sociedad de Variaciones del Genoma Humano). Disponible en <http://www.hgvs.org/>.
- Hveem TS, Merok MA, Pretorius ME, Novelli M, Bævre MS, Sjo OH, et al. Prognostic impact of genomic instability in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2014 Apr 15;110(8):2159-64.
- Hyingstrom JR, Hu CY, Xing Y, You YN, Feig BW, Skibber JM, et al. Clinicopathology and outcomes for mucinous and signet ring colorectal adenocarcinoma: analysis from the National Cancer Data Base. *Ann Surg Oncol.* 2012 Sep;19(9):2814-21.
- Inamura K, Yamauchi M, Nishihara R, Kim SA, Mima K, Sukawa Y, et al. Prognostic significance and molecular features of signet-ring cell and mucinous components in colorectal carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2015 Apr;22(4):1226-35.
- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature.* 1993 Jun 10;363(6429):558-61.
- Jang SG, Kim IJ, Kang HC, Park HW, Ahn SA, Yoon HJ, et al. GSTT2 promoter polymorphisms and colorectal cancer risk. *BMC Cancer.* 2007 Jan 25;7:16.

- Jarosz M, Robbez-Masson L, Chioni AM, Cross B, Rosewell I, Grose R. Fibroblast growth factor 22 is not essential for skin development and repair but plays a role in tumorigenesis. *PLoS One*. 2012;7(6):e39436.
- Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Herediatry and familial colon cancer. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2044-58.
- Jorgensen ML, Young JM, Solomon MJ. Optimal delivery of colorectal cancer follow-up care: improving patient outcomes. *Patient Relat Outcome Meas*. 2015 May 18;6:127-38.
- Jover R, Payá A. Microsatellite instability in colorectal cancer: concept, detection methods and clinical utility. *Gastroenterol Hepatol*. 2003 Dec;26(10):656-63.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992 Oct 30;258(5083):818-21.
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, et al. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 1994 Aug; 10(4):231-43.
- Karahan B, Argon A, Yildirim M, Vardar E1. Relationship between MLH-1, MSH-2, PMS-2,MSH-6 expression and clinicopathological features in colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Apr 1;8(4):4044-53.
- Kastrinos F, Steyerberg EW, Balmaña J, Mercado R, Gallinger S, Haile R, et al. Comparison of the clinical prediction model PREMM (1,2,6) and molecular testing for the systematic identification of Lynch syndrome in colorectal cancer. *Gut*. 2013 Feb;62(2):272-9.
- Kim MY, Yim SH, Kwon MS, Kim TM, Shin SH, Kang HM, et al. Recurrent genomic alterations with impact on survival in colorectal cancer identified by genome-wide array comparative genomic hybridization. *Gastroenterology*. 2006 Dec;131(6):1913-24.

- Kim YJ, Jung YD, Kim TO, Kim HS. Alu-related transcript of TJP2 gene as a marker for colorectal cancer. *Gene*. 2013 Jul;524(2):268-74.
- Kinzler, K.W, Vogelstein, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 1996 Oct 18;87(2):159-70.
- Kirzin S, Marisa L, Guimbaud R, De Reynies A, Legrain M, Laurent-Puig P, et al. Sporadic early-onset colorectal cancer is a specific sub-type of cancer: a morphological, molecular and genetics study. *PLoS One*. 2014 Aug 1;9(8):e103159.
- Kocarnik JM, Shiovitz S, Phipps AI. Molecular phenotypes of colorectal cancer and potential clinical applications. *Gastroenterol Rep (Oxf)*. 2015 Sep 3. pii: gov046. [Epub ahead of print].
- Krijgsman O, Israeli D, Haan JC, van Essen HF, Smeets SJ, Eijk PP, et al. CGH arrays compared for DNA isolated from formalin-fixed, paraffin-embedded material. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012 Apr;51(4):344-52.
- Kye BH, Cho HM. Overview of radiation therapy for treating rectal cancer. *Ann Coloproctol*. 2014 Aug;30(4):165-74.
- Labots M, Buffart TE, Haan JC, van Grieken NC, Tijssen M, van de Velde CJ, et al. High-level copy number gains of established and potential drug target genes in gastric cancer as a lead for treatment development and selection. *Cell Oncol (Dordr)*. 2014 Feb;37(1):41-52.
- Lam AK, Chan SS, Leung M. Synchronous colorectal cancer: clinical, pathological and molecular implications. *World J Gastroenterol*. 2014 Jun 14;20(22):6815-20.
- Langner C, Harbaum L, Pollheimer MJ, Kornprat P, Lindtner RA, Schlemmer A, et al. Mucinous differentiation in colorectal cancer--indicator of poor prognosis?. *Histopathology*. 2012 Jun;60(7):1060-72.
- Lassmann S, Weis R, Makowiec F, Roth J, Danciu M, Hopt U, et al. Array CGH identifies distinct DNA copy number profiles of oncogenes and tumor

- suppressor genes in chromosomal- and microsatellite-unstable sporadic colorectal carcinomas. *J Mol Med (Berl)*. 2007 Mar;85(3):293-304.
- Laurent S, Franchimont D, Coppens JP, Leunen K, Macken L, Peeters M, et al. Familial adenomatous polyposis: clinical presentation, detection and surveillance. *Acta Gastroenterol Belg*. 2011 Sep;74(3):415-20.
- Lee JE, Chan AT. Fruit, vegetables, and folate: cultivating the evidence for cancer prevention. *Gastroenterology*. 2011 Jul;141(1):16-20.
- Li X, Yao X, Wang Y, Hu F, Wang F, Jiang L, et al. MLH1 Promoter Methylation Frequency in Colorectal Cancer Patients and Related Clinicopathological and Molecular Features. *PLoS One*. 2013;8(3):e59064.
- Liang H, Wang XN, Wang BG, Pan Y, Liu N, Wang DC, et al. Prognostic factors of young patients with colon cancer after surgery. *World J Gastroenterol*. 2006 Mar 7;12(9):1458-62.
- Liang JT, Huang KC, Cheng AL, Jeng YM, Wu MS, Wang SM. Clinicopathological and molecular biological features of colorectal cancer in patients less than 40 years of age. *Br J Surg*. 2003 Feb;90(2):205-14.
- Lin JT, Wang WS, Yen CC, Liu JH, Yang MH, Chao TC, et al. Outcome of colorectal carcinoma in patients under 40 years of age. *J Gastroenterol Hepatol*. 2005 Jun;20(6):900-5.
- Liu XP, Kawauchi S, Oga A, Sato T, Ikemoto K, Ikeda E, et al. Chromosomal aberrations detected by comparative genomic hybridization predict outcome in patients with colorectal carcinoma. *Oncol Rep*. 2007 Jan;17(1):261-7.
- Loo LW, Tiirikainen M, Cheng I, Lum-Jones A, Seifried A, Church JM, et al. Integrated analysis of genome-wide copy number alterations and gene expression in microsatellite stable, CpG island methylator phenotype-negative colon cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013 May;52(5):450-66.

- Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C, Vincenzi B, Salvatore L, Santini D, et al. KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2009 Aug 18;101(4):715-21.
- Lüchtenborg M, Weijenberg MP, Wark PA, Saritas AM, Roemen GM, van Muijen GN, et al. Mutations in APC, CTNNB1 and K-ras genes and expression of hMLH1 in sporadic colorectal carcinomas from the Netherlands Cohort Study. *BMC Cancer*. 2005 Dec 15;5:160.
- Ly P, Eskiocak U, Kim SB, Roig AI, Hight SK, Lulla DR, et al. Characterization of aneuploid populations with trisomy 7 and 20 derived from diploid human colonic epithelial cells. *Neoplasia*. 2011 Apr;13(4):348-57.
- Makec M Jr, Mercier B, Mackova A, Miller PW, Hamosh A, Ferec C, et al. Sensitivity of the denaturing gradient gel electrophoresis technique in detection of known mutations and novel Asian mutations in the CFTR gene. *Hum Mutat*. 1997; 9:136-47.
- Mampaey E, Fieuw A, Van Laethem T, Ferdinande L, Claes K, Ceelen W, et al. Focus on 16p13.3 Locus in Colon Cancer. *PLoS One*. 2015 Jul 29;10(7):e0131421.
- Mayrhofer M, Kultima HG, Birgisson H, Sundström M, Mathot L, Edlund K, et al. 1p36 deletion is a marker for tumour dissemination in microsatellite stable stage II-III colon cancer. *BMC Cancer*. 2014 Nov 24;14:872.
- Mekenkamp LJ, Heesterbeek KJ, Koopman M, Tol J, Teerenstra S, Venderbosch S, et al. Mucinous adenocarcinomas: poor prognosis in metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2012 Mar;48(4):501-9.
- Molinari C, Ballardini M, Teodorani N, Giannini M, Zoli W, Emiliani E, et al. Genomic alterations in rectal tumors and response to neoadjuvant chemoradiotherapy: an exploratory study. *Radiat Oncol*. 2011 Nov 18;6:161.18):382-7.
- Mouradov D, Domingo E, Gibbs P, Jorissen RN, Li S, Soo PY, et al. Survival in stage II/III colorectal cancer is independently predicted by chromosomal and

- microsatellite instability, but not by specific driver mutations. *Am J Gastroenterol*. 2013 Nov;108(11):1785-93.
- Mourra N, Zeitoun G, Buecher B, Finetti P, Lagarde A, Adelaide J, et al. High frequency of chromosome 14 deletion in early-onset colon cancer. *Dis Colon Rectum*. 2007 Nov;50(11):1881-6.
- Mundade R, Imperiale TF, Prabhu L, Loehrer PJ, Lu T. Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. *Oncoscience*. 2014 Jun 30;1(6):400-6.
- Murphy G, Devesa SS, Cross AJ, Inskip PD, McGlynn KA, Cook MB. Sex disparities in colorectal cancer incidence by anatomic subsite, race and age. *Int J Cancer*. 2011 Apr 1;128(7):1668-75.
- Myers EA, Feingold DL, Forde KA, Arnell T, Jang JH, Whelan RL. Colorectal cancer in patients under 50 years of age: a retrospective analysis of two institutions' experience. *World J Gastroenterol*. 2013 Sep 14;19(34):5651-7.
- Nakao K, Mehta KR, Fridyand J, Moore DH, Jain AN, Lafuente A, et al. High-resolution analysis of DNA copy number alterations in colorectal cancer by array-based comparative genomic hybridization. *Carcinogenesis*. 2004 Aug;25(8):1345-57.
- Nakao M, Kawauchi S, Uchiyama T, Adachi J, Ito H, Chochi Y et al. DNA copy number aberrations associated with the clinicopathological features of colorectal cancers: Identification of genomic biomarkers by array-based comparative genomic hybridization. *Oncol Rep*. 2011 Jun;25(6):1603-11.
- Nazemalhosseini Mojarad E, Kuppen PJ, Aghdaei HA, Zali MR. The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2013 Summer;6(3):120-8.
- Norat T, Scoccianti C, Boutron-Ruault MC, Anderson A, Berrino F, Cecchini M, et al. European Code against Cancer 4th edition: Diet and cancer. *Cancer Epidemiol*. 2015 Jul 8. pii: S1877-7821(15)00070-3.

- Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, Poston GJ, Schag PM, Rougier P, et al. Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC Intergroup trial 40983): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2008 Mar 22;371(9617):1007-16.
- O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Oct 6;96(19):1420-5.
- Ogino S, Goel A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J Mol Diagn*. 2008 Jan;10(1):13-27.
- Olshen AB, Venkatraman ES, Lucito R, Wigler M. Circular Binary Segmentation for the analysis of array-based DNA copy number data. *Biostatistics*. 2004 Oct;5(4):557-72.
- Orsetti B, Selves J, Bascoul-Mollevis C, Lasorsa L, Gordien K, Bibeau F, et al. Impact of chromosomal instability on colorectal cancer progression and outcome. *BMC Cancer*. 2014 Feb 22;14:121.
- Osorio I, Rueda D, Rodríguez Y, García JL, de la Cruz Vigo F, et al. Early-onset colorectal cancer: A separate subset of colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014 Dec 14; 20(46): 17288–17296.
- Panczyk M. Pharmacogenetics research on chemotherapy resistance in colorectal cancer over the last 20 years. *World J Gastroenterol*. 2014 Aug 7;20(29):9775-827.
- Papaoiconomou E, Lymperi M, Petraki C, Philippou A, Msaouel P, Michalopoulou F, et al. Kiss-1/GPR54 protein expression in breast cancer. *Anticancer Res*. 2014 Mar;34(3):1401-7.
- Parajuli R, Bjerkaas E, Tverdal A, Le Marchand L, Weiderpass E, Gram IT. Smoking increases rectal cancer risk to the same extent in women as in men: results from a Norwegian cohort study. *BMC Cancer*. 2014 May 6;14:321.

- Paritsky M, Pastukh N, Brodsky D, Isakovich N, Peretz A. Association of *Streptococcus bovis* presence in colonic content with advanced colonic lesion. *World J Gastroenterol*. 2015 May 14;21(18):5663-7.
- Perea J, Alvaro E, Rodríguez Y, Grávalos C, Sánchez-Tomé E, Rivera B, et al. Approach to early-onset colorectal cancer: clinicopathological, familial, molecular and immunohistochemical characteristics. *World J Gastroenterol*. 2010 Aug;16(29):3697-703.
- Perea J, Rodríguez Y, Rueda D, Marín JC, Díaz-Tasende J, Álvaro E, et al. Early-onset colorectal cancer is an easy and effective tool to identify retrospectively Lynch syndrome. *Ann Surg Oncol*. 2011 Nov;18(12):3285-91.
- Perea J, Rueda D, Canal A, Rodríguez Y, Alvaro E, Osorio I, et al. Age at onset should be a major criterion for subclassification of colorectal cancer. *J Mol Diagn*. 2014 Jan;16(1):116-26.
- Peters U, Jiao S, Schumacher FR, Hutter CM, Aragaki AK, Baron JA, et al. Identification of Genetic Susceptibility Loci for Colorectal Tumors in a Genome-Wide Meta-analysis. *Gastroenterology*. 2013 Apr;144(4):799-807.
- Phipps AI, Limburg PJ, Baron JA, Burnett-Hartman AN, Weisenberger DJ, Laird PW, et al. Association between molecular subtypes of colorectal cancer and patient survival. *Gastroenterology*. 2015 Jan;148(1):77-87.
- Pinheiro M, Pinto C, Peixoto A, Veiga I, Lopes P, Henrique R, et al. Target gene mutational pattern in Lynch syndrome colorectal carcinomas according to tumour location and germline mutation. *Br J Cancer*. 2015 Aug 11;113(4):686-92.
- Pinkel D, Se Graves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet*. 1998 Oct;20(2):207-11.
- Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2059-72.

- Plaschke J, Kruppa C, Tischler R, Bocker T, Pistorius S, Dralle H, et al. Sequence analysis of the mismatch repair gene hMSH6 in the germline of patients with familial and sporadic colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2000 Mar 1;85(5):606-13.
- Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CF, et al. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet*. 1999 Sep;23(1):41-6.
- Poulogiannis G, Ichimura K, Hamoudi RA, Luo F, Leung SY, Yuen ST, et al. Prognostic relevance of DNA copy number changes in colorectal cancer. *J Pathol*. 2010 Feb;220(3):338-47.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2012. ISBN 3-900051-07-0.
- Resende C, Thiel A, Machado JC, Ristimäki A. Gastric cancer: basic aspects. *Helicobacter*. 2011 Sep;16 Suppl 1:38-44.
- Rex DK, Ahnen DJ, Baron JA, Batts KP, Burke CA, Burt RW, et al. Serrated lesions of the colorectum: review and recommendations from an expert panel. *Am J Gastroenterol*. 2012 Sep;107(9):1315-29.
- Richman S. Deficient mismatch repair: Read all about it (Review). *Int J Oncol*. 2015 Aug 12. [Epub ahead of print].
- Rio Frio T, Lavoie J, Hamel N, Geyer FC, Kushner YB, Novak DJ, et al. Homozygous BUB1B mutation and susceptibility to gastrointestinal neoplasia. *N Engl J Med*. 2010 Dec 30;363(27):2628-37.
- Ross JS, Torres-Mora J, Wagle N, Jennings TA, Jones DM. Biomarker-based prediction of response to therapy for colorectal cancer: current perspective. *Am J Clin Pathol*. 2010 Sep;134(3):478-90.
- Salari K, Spulak ME, Cuff J, Forster AD, Giacomini CP, Huang S, et al. CDX2 is an amplified lineage-survival oncogene in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Nov 13;109(46):E3196-205.

- Sameer AS, Nissar S, Fatima K. Mismatch repair pathway: molecules, functions, and role in colorectal carcinogenesis. *Eur J Cancer Prev.* 2014 Jul;23(4):246-57.
- Savas N, Dagli U, Akbulut S, Yuksel O, Sahin B. Colorectal cancer localization in young patients: should we expand the screening program?. *Dig Dis Sci.* 2007 Mar;52(3):798-802.
- Sawada T, Yamamoto E, Suzuki H, Nojima M, Maruyama R, Shioi Y, et al. Association between genomic alterations and metastatic behavior of colorectal cancer identified by array-based comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer.* 2013 Feb;52(2):140-9.
- Schneider NI, Langner C. Prognostic stratification of colorectal cancer patients: current perspectives. *Cancer Manag Res.* 2014 Jul 2;6:291-300.
- Schneider R, Schneider C, Jakobeit C, Fürst A, Möslin G. Gender-Specific Aspects of Lynch Syndrome and Familial Adenomatous Polyposis. *Viszeralmedizin.* 2014 Apr;30(2):82-8.
- Segura PP, Fombella JP, Lorenzo BP, Martín MR, Lopez PG; Spanish Society for Medical Oncology. SEOM guide to primary and secondary prevention of cancer: 2014. *Clin Transl Oncol.* 2014 Dec;16(12):1072-8.
- Shen L, Toyota M, Kondo Y, Lin E, Zhang L, Guo Y, et al. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:18654-9.
- Shiovitz S, Copeland WK, Passarelli MN, Burnett-Hartman AN, Grady WM, Potter JD, et al. Characterisation of familial colorectal cancer Type X, Lynch syndrome, and non-familial colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2014 Jul 29;111(3):598-602.
- Silva SM, Rosa VF, Santos AC, Almeida RM, Oliveira PG, Sousa JB. Influence of patient age and colorectal polyp size on histopathology findings. *Arq Bras Cir Dig.* 2014 Apr-Jun;27(2):109-13.
- Silver A, Sengupta N, Propper D, Wilson P, Hagemann T, Patel A, et al. A distinct DNA methylation profile associated with microsatellite and chromosomal

- stable sporadic colorectal cancers. *Int J Cancer*. 2012 Mar 1;130(5):1082-92.
- Slebos RJ, Wang X, Wang X, Zhang B, Tabb DL, Liebler DC. Proteomic analysis of colon and rectal carcinoma using standard and customized databases. *Sci Data*. 2015 Jun 23;2:150022.
- Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJ, Lightfoot TJ, Coxhead J, et al. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jul 9;99(14):9433-8.
- Snaebjornsson P, Jonasson L, Jonsson T, Möller PH, Theodors A, Jonasson JG. Colon cancer in Iceland-a nationwide comparative study on various pathology parameters with respect to right and left tumor location and patients age. *Int J Cancer*. 2010 Dec 1;127(11):2645-53.
- Snover DC. Update on serrated pathway to colorectal carcinoma. *Hum Pathol*. 2011 Jan;42(1):1-10.
- Sociedad Española de Oncología Médica [actualizado 1 Feb 2012, citado 13 Mar 2014]. Disponible en <http://www.seom.org/en/prensa/el-cancer-en-espanyacom/103644-el-cancer-en-espana-2012?showall=1>.
- Song YK, Park YS, Seon CS, Lim HJ, Son BK, Ahn SB, et al. Alcohol drinking increased the risk of advanced colorectal adenomas. *Intest Res*. 2015 Jan;13(1):74-9.
- Steinhagen E, Shia J, Markowitz AJ, Stadler ZK, Salo-Mullen EE, Zheng J, et al. Systematic immunohistochemistry screening for Lynch syndrome in early age-of-onset colorectal cancer patients undergoing surgical resection. *J Am Coll Surg*. 2012 Jan;214(1):61.
- Stigliano V, Sanchez-Mete L, Martayan A, Anti M. Early-onset colorectal cancer: a sporadic or inherited disease? *World J Gastroenterol*. 2014 Sep 21;20(35):12420-30.
- Stigliano V, Sanchez-Mete L, Martayan A, Diodoro M, Casini B, Sperduti I, et al. Early-onset colorectal cancer patients without family history are "at very low risk" for lynch syndrome. *J Exp Clin Cancer Res*. 2014 Jan 2;33:1.

- Suter CM, Martin DI, Ward RL. Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers. *Nat Genet.* 2004 May;36(5):497-501.
- Sweetser S, Smyrk TC, Sinicrope FA. Serrated colon polyps as precursors to colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013 Jul;11(7):760-7.
- Tang R, Changchien CR, Wu MC, Fan CW, Liu KW, Chen JS, et al. Colorectal cancer without high microsatellite instability and chromosomal instability: an alternative genetic pathway to human colorectal cancer. *Carcinogenesis.* 2004 May;25(5):841-6.
- Tannergard P, Lipford JR, Kolodner R, Frodin JE, Nordenskjold M, Lindblom A: Mutation screening in the hMLH1 gene in Swedish hereditary nonpolyposis colon cancer families. *Cancer Res.* 1995 Dec 15;55(24):6092-6.
- Tattini L, D'Aurizio R, Magi A. Detection of Genomic Structural Variants from Next-Generation Sequencing Data. *Front Bioeng Biotechnol.* 2015 Jun 25;3:92.
- Teufel A, Gerken M, Hartl J, Itzel T, Fichtner-Feigl S, Stroszczyński C, et al. Benefit of adjuvant chemotherapy in patients with T4 UICC II colon cancer. *BMC Cancer.* 2015 May 20;15:419.
- Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science.* 1993 May 7;260(5109):816-9.
- Tomasetti C, Marchionni L, Nowak MA, Parmigiani G, Vogelstein B. Only three driver gene mutations are required for the development of lung and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Jan 6;112(1):118-23.
- Trojan J, Brieger A, Raedle J, Esteller M, Zeuzem S. 5'-CpG island methylation of the LKB1/STK11 promoter and allelic loss at chromosome 19p13.3 in sporadic colorectal cancer. *Gut.* 2000 Aug;47(2):272-6.
- Turnbull RB Jr, Kyle K, Watson FR, Spratt J. Cancer of the colon: the influence of the no-touch isolation technic on survival rates. *Ann Surg.* 1967 Sep;166(3):420-7.

- Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Feb 18;96(4):261-8.
- Valle L. Genetic predisposition to colorectal cancer: Where we stand and future perspectives. *World J Gastroenterol.* 2014 Aug 7; 20(29): 9828–9849.
- Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology.* 1999 Jun;116(6):1453-6.
- Vasovcak P, Pavlikova K, Sedlacek Z, Skapa P, Kouda M, Hoch J, et al. Molecular genetic analysis of 103 sporadic colorectal tumours in Czech patients. *PLoS One.* 2011;6(8):e24114.
- Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* 2009 Jul;9(7):489-99.
- Wang FW, Hsu PI, Chuang HY, Tu MS, Mar GY, King TM, et al. Prevalence and risk factors of asymptomatic colorectal polyps in Taiwan. *Gastroenterol Res Pract.* 2014;2014:985205.
- Wang H, Haiman CA, Burnett T, Fortini BK, Kolonel LN, Henderson BE, et al. Fine-mapping of genome-wide association study-identified risk loci for colorectal cancer in African Americans. *Hum Mol Genet.* 2013 Dec 15;22(24):5048-55.
- Wang R, Wang MJ, Ping J. Clinicopathological Features and Survival Outcomes of Colorectal Cancer in Young Versus Elderly: A Population-Based Cohort Study of SEER 9 Registries Data (1988-2011). *Medicine (Baltimore).* 2015 Sep;94(35):e1402.
- Weber JC, Meyer N, Pencreach E, Schneider A, Guérin E, Neuville A, et al. Allelotyping analyses of synchronous primary and metastasis CIN colon

- cancers identified different subtypes. *Int J Cancer*. 2007 Feb 1;120(3):524-32.
- Whiffin N, Hosking FJ, Farrington SM, Palles C, Dobbins SE, Zgaga L, et al. Identification of susceptibility loci for colorectal cancer in a genome-wide meta-analysis. *Hum Mol Genet*. 2014 Sep 1;23(17):4729-37.
- Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, et al. Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clin Pharmacol Ther*. 2012 Oct;92(4):414-7.
- Wielandt AM, Zárate AJ, Hurtado C, Orellana P, Alvarez K, Pinto E, et al. Lynch syndrome: selection of families by microsatellite instability and immunohistochemistry. *Rev Med Chil*. 2012 Sep;140(9):1132-9.
- Wijnen J, Khan PM, Vasen H, Menko F, van der Klift H, van den Broek M, et al. Majority of hMLH1 mutations responsible for hereditary nonpolyposis colorectal cancer cluster at the exonic region 15-16. *Am J Hum Genet*. 1996;58:300-7.
- Wijnen J, Vasen H, Khan PM, Menko FH, van der Klift H, van Leeuwen C, et al. Seven new mutations in hMSH2, an HNPCC gene, identified by denaturing gradient gel electrophoresis. *Am Hum Genet*. 1995;56:1060-6.
- Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gouttlieb LS, Sternberg SS, et al. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med*. 1993 Dec 30;329(27):1977-81.
- Xie T, D' Ario G, Lamb JR, Martin E, Wang K, Tejpar S, et al. A comprehensive characterization of genome-wide copy number aberrations in colorectal cancer reveals novel oncogenes and patterns of alterations. *PLoS One*. 2012;7(7):e42001.
- Xu HL, Hsing AW, Vogtmann E, Chu LW, Cheng JR, Gao J, et al. Variants in CCK and CCKAR genes to susceptibility to biliary tract cancers and stones: a

- population-based study in Shanghai, China. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013 Sep;28(9):1476-81.
- Yamane L, Scapulatempo-Neto C, Reis RM, Guimarães DP. Serrated pathway in colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 2014 Mar 14;20(10):2634-40.
- Yamauchi M, Morikawa T, Kuchiba A, Imamura Y, Qian ZR, Nishihara R, et al. Assessment of colorectal cancer molecular features along bowel subsites challenges the conception of distinct dichotomy of proximal versus distal colorectum. *Gut*. 2012 Jun;61(6):847-54.
- Yan D, Dai H, Liu JW. Serum levels of MMP-11 correlate with clinical outcome in Chinese patients with advanced gastric adenocarcinoma. *BMC Cancer*. 2011 Apr 24;11:151.
- Yang YH, Deng H, Li WM, Zhang QY, Hu XT, Xiao B, et al. Identification of matrix metalloproteinase 11 as a predictive tumor marker in serum based on gene expression profiling. *Clin Cancer Res*. 2008 Jan 1;14(1):74-81.
- Yi JM, Kim TO. Epigenetic alterations in inflammatory bowel disease and cancer. *Intest Res*. 2015 Apr;13(2):112-21.
- Young JP, Win AK, Rosty C, Flight I, Roder D, Young GP, et al. Rising incidence of early-onset colorectal cancer in Australia over two decades: report and review. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015 Jan;30(1):6-13.
- Zahir MN, Azhar EM, Rafiq S, Ghias K, Shabbir-Moosajee M. Clinical Features and Outcome of Sporadic Colorectal Carcinoma in Young Patients: A Cross-Sectional Analysis from a Developing Country. *ISRN Oncol*. 2014; 2014: 461570.
- Zhang B, Wang J, Wang X, Zhu J, Liu Q, Shi Z, et al. Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2014 Sep 18;513(7518):382-7.
- Zhi X, Zhao D, Wang Z, Zhou Z, Wang C, Chen W, et al. E3 ubiquitin ligase RNF126 promotes cancer cell proliferation by targeting the tumor suppressor p21 for ubiquitin-mediated degradation. *Cancer Res*. 2013 Jan 1;73(1):385-94.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1**Hoja de consentimiento informado para el uso de excedentes de tejido o sangre con fines de investigación biomédica.***Finalidad y descripción del proceso*

Este documento tiene como objeto solicitar su autorización escrita para la donación gratuita de parte de la muestra sobrante de tejido o sangre que le van a extraer, con el fin de utilizar dicho sobrante en investigación biomédica relacionada con el cáncer. Es importante que lea detenidamente esta hoja de consentimiento informado, que entienda su contenido y el objeto de la misma y que, en su caso, haga todas las preguntas que crea preciso acerca de la misma.

La principal vía de obtener dichos tejidos o sangre que permitan la investigación biomédica son las muestras sobrantes de las extracciones que se hacen con fines diagnósticos. Parte de la muestra de tejido o sangre no es necesaria para el correspondiente estudio y para establecer un diagnóstico y por ello, es normalmente destruida.

Usted como paciente puede donar el sobrante de su muestra para que, en lugar de ser destruido, pueda ser utilizado en investigación biomédica relacionada con el cáncer. La finalidad de la donación es dotar a los investigadores de tejido o sangre para que puedan desarrollar avances en el terreno del conocimiento sobre el cáncer, en particular sobre su aparición, evolución y tratamiento.

El consentimiento que ahora presta no supone para usted ningún riesgo o molestia adicional ya que únicamente va a autorizar la investigación con muestras sobrantes de tejido o sangre, que de otra forma se desecharían. Para la obtención de este material, no se llevará a cabo ninguna prueba o intervención distinta de aquella en la que se obtiene la muestra de tejido o sangre para su estudio.

La donación de este sobrante de tejido/sangre es voluntaria por lo que, si usted da el consentimiento para su uso, en cualquier momento puede revocarlo. En caso de producirse esta revocación ello no supondrá ningún cambio en la relación con su médico ni perjuicio alguno en su diagnóstico/tratamiento y/o seguimiento. En caso de revocación su muestra dejará de formar parte de la investigación aunque los datos obtenidos hasta ese momento sí formarán parte de la misma.

Carácter altruista de la donación

La donación tiene por disposición legal carácter altruista, por lo que usted no obtendrá ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma. No está previsto compensarle por los productos desarrollados a partir de esta investigación. En todo caso, usted renuncia a cualquier beneficio económico que pudiera corresponderle en el futuro y que sea, lógicamente, renunciabile. Tampoco obtendrá ningún otro beneficio directo como resultado de su participación en este estudio. Sin embargo, los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de su muestra y de muchas otras pueden ayudar al avance médico y, por ello, a otras personas.

La titularidad de la muestra incorporada y de los resultados de la investigación corresponderá al Hospital 12 de Octubre y, en su caso, al investigador. Las muestras podrán ser cedidas a otros grupos de investigación bajo acuerdos de colaboración y siempre para la investigación biomédica del cáncer.

Protección de datos y confidencialidad

Los datos personales que se recojan sobre usted, serán confidenciales y procesados de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal y la legislación sanitaria y relativa a la investigación biomédica vigente, tratándose los mismos únicamente de acuerdo con los objetivos en el presente comunicado descritos, por lo que cualquier relación entre la muestra y su identidad personal tienen carácter estrictamente confidencial. Asimismo, se informa que los resultados obtenidos de los diferentes estudios llevados a cabo con las muestras, pueden ser publicados en revistas científicas, sin embargo, nunca será facilitada su identidad o datos que le identifiquen o puedan llegar a identificarle.

En el momento que usted consienta el uso de excedente de muestra para los fines de investigación aplicada descritos, dicho excedente (incluyendo terapias experimentales) será sometido a un proceso de disociación. Es decir, sólo será identificado por un número y/o un código constando todos sus datos debidamente codificados, por lo que los investigadores implicados nunca conocerán su identidad o dato alguno que pudiera llegar a identificarle; sin embargo, los mismos,

sí podrán en todo caso acceder a otros datos como su sexo o edad, pero siempre manteniendo la debida confidencialidad conforme a la legislación vigente.

De igual modo, sus datos personales serán incorporados a un fichero automatizado de carácter confidencial, debidamente inscrito en la Agencia Española de Protección de Datos, conforme a los términos establecidos en la Ley Orgánica 15/1999 de protección de datos de carácter personal, con la finalidad de gestionar el uso del excedente cedido por usted para los fines de investigación descrito en el presente comunicado, pudiendo ejercer en cualquier momento, los derechos de acceso, rectificación, cancelación u oposición, reconocidos por la citada normativa en materia de protección de datos de carácter personal.

Los datos que se obtengan del análisis de la muestra serán archivados, y formarán parte del estudio/proyecto de investigación manteniéndose durante el desarrollo del mismo.

Información sobre resultados del estudio

Los datos que se obtengan del análisis de la muestra serán archivados, y formarán parte del estudio/proyecto de investigación manteniéndose durante el desarrollo del mismo. Los métodos utilizados en investigación biomédica suelen ser diferentes de los aprobados para la práctica clínica, por lo que no deben de ser considerados con valor clínico para usted.

Sin embargo, en el caso que estas investigaciones proporcionen datos que pudieran ser tanto clínica como genéticamente relevantes para usted e interesar a su salud o a la de su familia, le serán comunicados si así usted lo estima oportuno. Un facultativo del Hospital 12 de Octubre se compromete a ofrecerle consejo genético, una vez obtenidos y evaluados los resultados del estudio.

Asimismo, podría obtenerse información relevante para su familia, le corresponderá a usted decidir si quiere o no comunicárselo. Si usted quiere que se le comunique dicha información relevante debe consignarlo en la casilla que aparece al final de esta hoja.

La muestra

La muestra formará parte de un banco de muestras o tumores hasta su uso en el proyecto de investigación pudiendo ser cedida a otros investigadores, los que a su

vez podrán realizar ensayos relacionados con la finalidad para la que usted haya donado la muestra. Estos investigadores no tendrán en ningún momento, como ya se ha indicado anteriormente, acceso a su identidad.

Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina y, de forma especial, en referencia a la investigación sobre la aparición, desarrollo y tratamiento del cáncer.

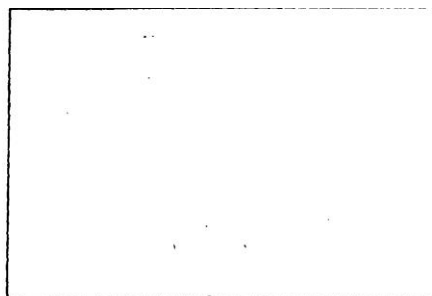
DATOS DEL PACIENTE	
<i>Apellidos</i>	
<i>Nombre</i>	
<i>Dirección</i>	
DNI	<i>Nº historia clínica</i>
Autoriza la comunicación de la información relevante derivada de la investigación	SÍ <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
<i>Firma</i>	<i>Fecha</i>
<i>Manifiesto que he recibido la información que me ha sido proporcionada sobre el procedimiento anteriormente indicado y he podido formular las preguntas que he considerado oportunas</i>	



Hospital Universitario
12 de Octubre

Comunidad de Madrid

CONSENTIMIENTO INFORMADO



D.N.I. del paciente: _____

Fecha: ____/____/____

Nombre del Médico que informa: _____

Nº Colegiado: _____

UNIDAD DE CÁNCER FAMILIAR. ESTUDIO DE FACTORES GENÉTICOS PREDISPONENTES A CÁNCER DE COLON NO ASOCIADO A POLIPOSIS (CÁNCER DE COLON HEREDITARIO NO POLIPÓSICO)

En la mayoría de las ocasiones el cáncer de colon se presenta con carácter esporádico. Existen algunas familias en las que se observa que el número de casos es superior a lo que cabría esperar en la población general, sin que ello se acompañe de poliposis intestinal y acompañados de una elevada incidencia de tumores como el de estómago, vías biliares, endometrio u ovario entre otros. Estudios recientes han puesto de manifiesto que algunas de estas familias presentan mutaciones en alguno de sus genes que son los responsables de este hecho.

Estas mutaciones se transmiten de padres a hijos, igual que se transmiten otros caracteres físicos (como, por ejemplo, el color del pelo) y su presencia supone un aumento del riesgo de desarrollar a lo largo de la vida un cáncer de colon, recto, endometrio y en menor medida de otros tumores como los mencionados anteriormente.

La presencia de una de las mutaciones citadas en una persona no significa que se tenga la certeza absoluta de que este individuo vaya a desarrollar este tipo de tumor, únicamente indica que existe un riesgo mayor al de la población general.

Por el contrario, la ausencia de dicha mutación no puede garantizar la no aparición del cáncer, puesto que es posible que existan otras mutaciones hoy en día desconocidas y que por lo tanto no pueden ser estudiadas o simplemente que no hayan sido detectadas y por otro lado siempre persiste el riesgo de desarrollar un cáncer de forma esporádica (no hereditario).

Su caso ha sido valorado por una Unidad de Consejo Genético en Cáncer Familiar que, a la vista de sus antecedentes familiares, ha considerado la posibilidad de proceder a un estudio molecular con el fin de determinar si posee alguna alteración genética de las que hoy en día conocemos como responsables del "Síndrome de Cáncer de Colon Hereditario no Polipósico".

El análisis se realiza sobre una muestra de sangre extraída a tal efecto una vez otorgado el consentimiento, valorándose de forma exclusiva factores genéticos relacionados con este síndrome sin que pueda ser utilizada para otros fines ni para estudiar otros aspectos que no sean los relacionados con este tipo de tumores. En ocasiones y previo al estudio de mutaciones en sangre debe procederse a un estudio del tejido tumoral para lo cual puede ser preciso solicitar muestras de tejido al servicio de Anatomía patológica correspondiente.

La información sobre los resultados es estrictamente confidencial y únicamente será facilitada a la persona estudiada y a quienes ella nos autorice por escrito. Estos datos quedarán bajo la custodia de la Unidad de Consejo Genético que le atiende, sin que consten en su historial clínico y no podrán ser cedidos a ninguna entidad o persona sin su autorización expresa. Los datos podrán ser utilizados con el fin de realizar estudios epidemiológicos, garantizando en todo momento el anonimato. Si, no obstante lo anteriormente expuesto, en algún momento usted decide que esta información sea destruida, podrá solicitarlo por escrito a la persona responsable de la Unidad que le ha estudiado.

Si su análisis genético es negativo, es decir, no se encuentra ningún tipo de mutación que suponga especial predisposición al cáncer, se le indicarán cuáles son las medidas de prevención a tomar y que dependerán de la existencia o no de casos de portadores de la mutación conocidos en su familia.

Si su análisis genético es positivo se le informará sobre el riesgo existente, así como de las alternativas de prevención disponibles en la actualidad.

En ocasiones se puede obtener un resultado que denominamos no informativo. Este tipo de resultados implica que no se conoce en la actualidad las repercusiones que ciertas alteraciones detectadas puede tener sobre el riesgo de padecer cáncer de colon.

Cuando la existencia de la mutación en la familia ha sido confirmada, debe saber que otros miembros de su familia pueden haberla heredado: de usted (en caso de sus descendientes) o de sus antepasados (en caso de otros familiares como tíos o primos). La Unidad de Consejo Genético en ningún caso contactará con ellos por propia iniciativa para advertirles de esta circunstancia, ya que esta información es estrictamente confidencial. Es decisión personal suya informar a dichos familiares con el fin de que, si ellos lo desean, puedan ser estudiados y valorar así cuál es su riesgo individual con respecto a estos tumores.

De igual manera debe conocer que este tipo de pruebas pueden repercutir en su estado emocional y/o psicológico, tanto positiva como negativamente.

Si usted decide que no desea realizarse un estudio genético, sepa que su decisión será respetada en todo momento y recibirá el asesoramiento genético apropiado a su caso. De igual manera debe saber que existen modelos teóricos que permiten conocer de manera aproximada su riesgo de padecer determinados tipos de cáncer, los cuales podrían aplicársele si no desea realizarse este tipo de test.

Comentarios del médico que informa: _____

AUTORIZACIÓN

Yo, _____, he sido informado oralmente y por escrito sobre las características, beneficios y problemas que plantea el estudio genético en el cáncer.

He comprendido esta información y cualquier duda surgida me ha sido aclarada por el médico.

Por lo anterior **OTORGO MI CONSENTIMIENTO** para que se proceda al estudio de factores genéticos predisponentes al cáncer sobre una muestra de sangre que me será extraída a tal efecto y análisis de tejido tumoral si ello fuera necesario.

Firma
Fecha:

Firma tutor (caso de menor o incapacitado legalmente)
Fecha:

Firma Médico
Fecha:

Autorizo para que las personas abajo indicadas puedan ser informadas sobre los resultados del estudio realizado.

Nombre..... TF.....
Nombre..... TF.....
Nombre..... TF.....
Nombre..... TF.....

Fdo.: D. /Dª

Fecha:

REVOCACIÓN

En ejercicio del derecho que tengo de anular el consentimiento prestado manifiesto mi voluntad de revocarlo y solicito se proceda a la destrucción de las muestras sanguíneas extraídas y de la información de ellas obtenida.

Firma:

Fecha:

ANEXO 2**Información adicional referente al estudio molecular de los genes MMR (*MLH1*, *MSH2* y *MSH6*).**

ANEXO 2A. Cebadores y condiciones de desnaturalización para el gen <i>MLH1</i>.			
Exón <i>MLH1</i>	Cebadores	Tamaño (Bp)	Gradiente desnaturalizante
1	(M13) 5' - AGACGTTTCCTTGGCTCTTC - 3' (Pinza CG) 5' - CCGTTAAGTCGTAGCCCTTA - 3'	257	50-70%
2	(Pinza CG) 5' - TTTTCTGTTTGATTTGCCAG - 3' (M13) 5' - CGCACAAACATCCTGCTACT - 3'	210	30-50%
3	(Pinza CG) 5' - TGGAAAAATGAGTAACATGATT - 3' (M13) 5' - CAACAGGAGGATATTTTACACA - 3'	255	30-50%
4	(Pinza CG) 5' - TTCCTTTTTCTTTTCAGTCTATTT - 3' (M13) 5' - TGAATATATATGAGTAAAAGAGTCAG - 3'	207	30-50%
5	(Pinza CG) 5' - TCTCTCTACTGGATATTAATTTGTT - 3' (M13) 5' - AAGCTCAACAATTTACTCTCC - 3'	214	30-50%
6	(M13) 5' - CAAGAAAAATCAATCTTCTGTT - 3' (Pinza CG) 5' - ATGACAAATCTCAGAGACCC - 3'	223	30-50%
7	(M13) 5' - TCTAGTGTGTGTTTTTGCA - 3' (Pinza CG) 5' - AACAAAACCATCCCCATAA - 3'	194	30-50%
8	(M13) 5' - AATCCTTGTGTCTTCTGCTG - 3' (Pinza CG) 5' - AAAGATTTTTTATATAGGTTATCG - 3'	217	30-50%
9	(M13) 5' - CAAAAGCTTCAGAATCTCTTT - 3' (Pinza CG) 5' - TTTCCCATGTGGTTCTTTTT - 3'	233	30-50%
10	(M13) 5' - GGACAGTTTTGAAGTCTGTTG - 3' (Pinza CG) 5' - GTCTTGGTTGAGGAGTTTGG - 3'	227	30-50%
11	(M13) 5' - AAGGTAATTGTTCTCTTATTTTT - 3' (Pinza CG) 5' - CACAAGTAGCTGGATGAGAA - 3'	280	30-50%
12	(Pinza CG) 5' - TAATACAGACTTTGCTACCAGGA - 3' (M13) 5' - GGTAGGCTGTACTTTTCCCA - 3'	473	30-50%
13	(Pinza CG) 5' - CTGCACTTCCTTTTCTTCAT - 3' (M13) 5' - CCCTATGCATCCCAGGCA - 3'	270	30-50%
14	(Pinza CG) 5' - TGTTTTTTGGTTTTATTTTTTG - 3' (M13) 5' - TCTGCTTGTTCACACTCA - 3'	232	30-50%
15	(Pinza CG) 5' - AATTCAGCTTTTCCTTAAAGTC - 3' (M13) 5' - AAATTCAGAAGTGAAAAGGA - 3'	200	30-50%
16	(M13) 5' - CTCCTTCATGTTCTTGCTTC - 3' (Pinza CG) 5' - AGAAGTATAAGAATGGCTGTCA - 3'	280	30-50%
17	(Pinza CG) 5' - TTCCCTTGTCTTTTTTCTG - 3' (M13) 5' - CATGTACCGAATGCTTAGTA - 3'	222	30-50%
18	(Pinza CG) 5' - TAAATTCGTACCTATTTTGAGG - 3' (M13) 5' - CCTGGGGTGCCAGTGTGCAT - 3'	251	15-30%
19	(M13) 5' - GGAGGCTTATGACATCTAATG - 3' (Pinza CG) 5' - AAGAACACATCCCACAGTGC - 3'	300	30-50%

ANEXO 2A. Cebadores y condiciones de desnaturalización empleadas en la amplificación e identificación del estado mutacional del gen *MLH1* (modificado de Wijnen *et al.* 1995 y Wijnen *et al.* 1996). La “Pinza CG” (5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCC-3') se une en el extremo 5' de un cebador y estabiliza el ADN. La secuencia M13 (5'-GCCAGTCGACGTTGTAACGACG-3') se une al otro cebador y ejerce de molde para la secuenciación de aquellos fragmentos con patrones anómalos de migración. Bp: pares de bases.

ANEXO 2B. Cebadores y condiciones de desnaturalización para el gen <i>MSH2</i> .			
Exón <i>MSH2</i>	Cebadores	Tamaño (Bp)	Gradiente desnaturalizante
1	(M13) 5' - TCGCGCATTTCCTTCAACC - 3' (Pinza CG) 5' - GTCCCTCCCAGCACGC - 3'	277	50-70%
2	(Pinza CG) 5' - TTGAACATGTAATATCTCAAATCTGT - 3' (M13) 5' - AAAGGAAGATAATTACCTTATATGC - 3'	283	15-50%
3	(M13) 5' - TCAAGAGTTTGTTAAATTTTAAAA - 3' (Pinza CG) 5' - CTAGGCCTGGAATCTCCTCT - 3'	421	30-50%
4	(Pinza CG) 5' - TTCCTTTTCTCATAGTAGTTTAAAC - 3' (M13) 5' - TTGTAATTCACATTTATAATCCATG - 3'	280	15-50%
5	(M13) 5' - CCAGATGGTATAGAAATCTTCG - 3' (Pinza CG) 5' - CCATTCAACATTTTAAACCCTT - 3'	308	15-30%
6	(M13) 5' - GCTTGCCATTCTTTCTATTTTATT - 3' (Pinza CG) 5' - GCAGGTTACATAAACTAACGAAAG - 3'	277	30-50%
7	(M13) 5' - CATTAATTCAGTTAATTTATTTC - 3' (Pinza CG) 5' - AAAACAAAATCACCTGTACCTTCA - 3'	309	30-50%
8	(M13) 5' - TGAGATCTTTTTATTGTTTGT - 3' (Pinza CG) 5' - TTTGCTTTTTAAAAATAACTACTGC - 3'	263	15-50%
9	(M13) 5' - GGATTTTGTCACTTTGTTCTGTT - 3' (Pinza CG) 5' - TCCAACCTCCAATGACCCAT - 3'	241	30-50%
10	(M13) 5' - TGGAATACTTTTTCTTTCTTCTT - 3' (Pinza CG) 5' - GCATTTAGGGAATTAATAAAGGG - 3'	298	30-40%
11	(Pinza CG) 5' - ATAAAAGTGTATTTTCGATTTGCA - 3' (M13) 5' - CCAGGTGACATTCAGAACATT - 3'	227	30-50%
12	(Pinza CG) 5' - TTATTATTCAGTATTCCTGTGTACA - 3' (M13) 5' - CCCACAAAGCCCAAAAACC - 3'	388	30-50%
13	(Pinza CG) 5' - ATAATTTGTTTTGTAGGCCCC - 3' (M13) 5' - TTTCTATCTTCAAGGGACTAGGAG - 3'	318	30-50%
14	(Pinza CG) 5' - CCACATTTTATGTGATGGGAA - 3' (M13) 5' - CCAATAGTACATACCTTCTTACC - 3'	370	30-50%
15	(M13) 5' - GTCCCTCACGCTTCCC - 3' (Pinza CG) 5' - AACTATGAAAACAACTGACAAAC - 3'	295	30-50%
16	(M13) 5' - AATGGGACATTCACATGTGTT - 3' (Pinza CG) 5' - CCATGGGCACTGACAGTTAA - 3'	369	15-30%

ANEXO 2B. Cebadores y condiciones de desnaturalización empleadas en la amplificación e identificación del estado mutacional del gen *MSH2* (modificado de Wijnen *et al.* 1995 y Wijnen *et al.* 1996). La “Pinza CG” (5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCC-3') se une en el extremo 5' de un cebador y estabiliza el ADN. La secuencia M13 (5'-GCCAGTCGACGTTGTAAAACGACG-3') se une al otro cebador y ejerce de molde para la secuenciación de aquellos fragmentos con patrones anómalos de migración. Bp: pares de bases.

ANEXO 2C. Sondas para la detección de grandes reordenamientos en los genes *MLH1* y *MSH2*.

Longitud (nucleótidos)	Sonda MLPA	Localización cromosómica		
		Control	<i>MLH1</i>	<i>MSH2</i>
94	Sonda control sintética	2q14		
130	Sonda control 0797-L0463	5q31		
136	Sonda control 0981-L0566	10p11		
142	Sonda <i>MLH1</i> 0886-L0474		exón 1	
148	Sonda <i>MSH2</i> 1027-L0599			exón 1
154	Sonda <i>MLH1</i> 1008-L0577		exón 2	
160	Sonda <i>MSH2</i> 0906-L0494			exón 2
166	Sonda <i>MLH1</i> 0888-L0476		exón 3	
172	Sonda <i>MSH2</i> 1029-L0601			exón 3
178	Sonda <i>MLH1</i> 0889-L0477		exón 4	
184	Sonda <i>MSH2</i> 0908-L0496			exón 4
193	Sonda control 0976-L0563	11p13		
210	Sonda <i>MLH1</i> 0890-L0478		exón5	
211	Sonda <i>MSH2</i> 0909-L0497			exón 5
220	Sonda <i>MLH1</i> 0891-L0479		exón 6	
229	Sonda <i>MSH2</i> 0910-L0498			exón 6
238	Sonda <i>MLH1</i> 0892-L0480		exón 7	
247	Sonda <i>MSH2</i> 0911-L0499			exón 7
256	Sonda <i>MLH1</i> 0893-L0481		exón 8	
265	Sonda <i>MSH2</i> 0912-L0582			exón 8
274	Sonda <i>MLH1</i> 0894-L0482		exón 9	
283	Sonda control 0438-L0003	17q21		
292	Sonda <i>MSH2</i> 0913-L0583			exón 9
301	Sonda <i>MLH1</i> 0895-L0483		exón 10	
310	Sonda <i>MSH2</i> 0914-L0584			exón 10
319	Sonda <i>MLH1</i> 0896-L0484		exón 11	
328	Sonda <i>MSH2</i> 0915-L0503			exón 11
337	Sonda <i>MLH1</i> 0897-L0485		exón 12	
346	Sonda <i>MSH2</i> 0916-L0504			exón 12
355	Sonda <i>MLH1</i> 0898-L0486		exón 13	
364	Sonda <i>MSH2</i> 1013-L0575			exón 13
373	Sonda control 0681-L0154	4q25		
382	Sonda <i>MLH1</i> 0899-L0586		exón 14	
391	Sonda <i>MSH2</i> 0918-L0506			exón 14
400	Sonda <i>MLH1</i> 0900-0488		exón 15	
409	Sonda <i>MSH2</i> 0919-L0585			exón 15
418	Sonda <i>MLH1</i> 1009-L0576		exón 16	
427	Sonda <i>MSH2</i> 1053-L0627			exón 16
436	Sonda <i>MLH1</i> 1030-L0602		exón 17	
445	Sonda <i>MLH1</i> 1031-L0603		exón 18	
454	Sonda <i>MLH1</i> 0904-L0492		exón 19	
463	Sonda control 0979-L0568	10p14		
472	Sonda control 0980-L0567	11p12		

ANEXO 2C. Sondas que componen el reactivo comercial *Salsa MLPA Kit P003-B1 MLH1/MSH2* (MRC-Holland, Ámsterdam, Holanda) para la detección de grandes reordenamientos en los genes *MLH1* y *MSH2*.

ANEXO 2D. Cebadores y condiciones de desnaturalización para el gen <i>MSH6</i> .					
Exón/ Fragmento	Cebadores	Tamaño (Bp)	Tiempos PCR	Tª PCR (°C)	Tª dHPLC (°C)
1A	5'-TCCGTCCGACAGAACGGTTG-3' 5'-TTCGCGTGAGGCCCTGGCCGA-3'	129	Largo	55,0	66,0
1B	5'-CGCTGAGTGATGCCAACAAG-3' 5'-CAACCCCTGTGCGAGCCTC-3'	300	Largo	48,0	67,1
2	5'-AACTAAGTTATGTATTTCT-3' 5'-CCTGTCTGTCTGTTTCTCTC-3'	300	Intermedio	55,0	59,4
3A	5'-GAACTGCTGGGATTACAGGC-3' 5'-GTATTTCAAGCCTTTGCACTG-3'	130	Corto	63,0	59,1
3B	5'-CCCAGAAGGGAGGTCATTTT-3' 5'-CCCCATCACCTAACATAAA-3'	200	Largo	55,0	58,6
4A	5'-CCAAATTTTGATTTGTTTT-3' 5'-CCACATCAGAGCCACCAATG-3'	207	Largo	55,0	58,3
4B	5'-CGAAGGGTCATATCAGATTC-3' 5'-ATACCAAACAGTAGGGGAC-3'	357	Largo	55,0	59,0
4C	5'-CGTTAGTGGAGGTGGTGATG-3' 5'-ATGAATACCAGCCCCAGTTC-3'	303	Corto	55,0	58,4
4D	5'-CTGTACCACATGGATGCTCT-3' 5'-CTTCTCTTTTTCTTTGAGG-3'	304	Corto	48,0	58,5
4E	5'-CCTCTGAGAACTACAGTAAG-3' 5'-CCAAAAGTGGGAGCCGGTA-3'	293	Corto	50,0	57,1
4F	5'-CTGTTCTCTTCAGGAAGGTC-3' 5'-AGCCATTGATAAAAAGCTCCT-3'	271	Corto	55,0	58,5
4G	5'-CCTCAAAAAATGCCTTATTG-3' 5'-AGCCATTGCTTTAGGAGCCG-3'	304	Corto	55,0	56,7
4H	5'-ACTTGCCTACTCCTTTTGG-3' 5'-TCCAGAGCAGAAAAGAAAATC-3'	299	Corto	48,0	57,7
4I	5'-CTACATACAGCAAGAAGAAG-3' 5'-CCTGCTTTGGGAGTAATAAG-3'	253	Largo	55,0	56,0
4J	5'-GAAAAGGCTCGAAAGACTGG-3' 5'-TCGTTACAGCCCTTCTTGG-3'	230	Corto	45,0	59,1
4K	5'-GAAGAATACGACTTGAATC-3' 5'-GCACTACTTATCAAAGCCTG-3'	244	Corto	46,0	57,6
5A	5'-AAAACCCCAAACGATGAAG-3' 5'-GTCTTCGTAATGCAAGGATG-3'	220	Corto	60,0	59,2
5B	5'-CTTAGAGCTTAAAGGATCAC-3' 5'-CTTTCTGATAACAAAACCTT-3'	208	Largo	54,0	57,1
6	5'-CTTTATGAACTGTTACTACC-3' 5'-GCAAATATCTTTTATCACAT-3'	237	Corto	50,0	56,6
7	5'-GAGTATTCATTTGTGATTTT-3' 5'-AAATGTTTTTAAGATAGATAGTCTTC-3'	171	Corto	50,0	53,7
8	5'-CCTTTTTTGTTTTAATTCCT-3' 5'-CAAGAGAAGTGCCTCTCAA-3'	268	Corto	50,0	56,4
9	5'-TTTTGAGAGGGCACTTCTCT-3' 5'-CCCCTTTTACTGTTTCTTTG-3'	266	Corto	50,0	57,0
10	5'-ATTTTAAGGGAAGTTTGCC-3' 5'-GTTTATTAGATCATAATGTT-3'	165	Largo	50,0	57,4

ANEXO 2D. Condiciones de PCR y temperaturas de desnaturalización empleadas para el análisis del estado mutacional del gen *MSH6*. Bp: pares de bases.

ANEXO 3

Listado de las regiones recurrentemente alteradas en población joven (frecuencia de aparición superior o igual al 30%).

ANEXO 3. Regiones recurrentemente alteradas en población joven.							
Cromosoma	Inicio	Final	Región	% de tumores con el cambio	Tipo	Tamaño (Bp)	Tamaño (Mb)
Cr 1	37196	782738	p36.33-p36.33	61	Pérdida	745483	0,745483
Cr 1	1069258	13881396	p36.33-p36.21	37	Ganancia	12812079	12,812079
Cr 1	15108352	16661919	p36.21-p36.13	32	Ganancia	1553508	1,553508
Cr 1	16817704	16963439	p36.13-p36.13	32	Pérdida	145676	0,145676
Cr 1	17114814	17747165	p36.13-p36.13	32	Ganancia	632292	0,632292
Cr 1	18607784	29892192	p36.13-p35.3	40	Ganancia	11284349	11,284349
Cr 1	30990226	33667623	p35.2-p35.1	43	Ganancia	2677338	2,677338
Cr 1	33771675	34904712	p35.1-p34.3	45	Pérdida	1132978	1,132978
Cr 1	35048650	36838461	p34.3-p34.3	40	Ganancia	1789752	1,789752
Cr 1	37588531	38530532	p34.3-p34.3	37	Ganancia	941942	0,941942
Cr 1	38913069	46814154	p34.3-p33	33	Ganancia	7901026	7,901026
Cr 1	52436165	53470974	p32.3-p32.3	30	Ganancia	1034750	1,034750
Cr 1	53953959	54994847	p32.3-p32.3	30	Ganancia	1040829	1,040829
Cr 1	116942100	116995821	p13.1-p13.1	38	Pérdida	53662	0,053662
Cr 1	120374173	143940269	p12-q21.1	53	Pérdida	23566037	23,566037
Cr 1	120374173	144851227	p12-q21.1	53	Pérdida	24476995	24,476995
Cr 1	145938612	148063174	q21.1-q21.2	48	Pérdida	2124503	2,124503
Cr 1	148268162	149731681	q21.2-q21.2	32	Ganancia	1463460	1,463460
Cr 2	204242050	204362806	q32.1-q32.1	42	Pérdida	120697	0,120697
Cr 2	25548556	26169381	p23.3-p23.3	30	Ganancia	620766	0,620766
Cr 2	86992179	87880563	p11.2-p11.2	42	Pérdida	888325	0,888325
Cr 2	89097237	95026803	p11.2-q11.1	45	Pérdida	5929507	5,929507
Cr 2	95442924	96141467	q11.1-q11.1	38	Pérdida	698484	0,698484
Cr 2	96597568	96655261	q11.1-q11.1	31	Ganancia	57634	0,057634
Cr 2	97268528	97318329	q11.2-q11.2	30	Pérdida	49742	0,049742
Cr 2	109907480	111059561	q12.3-q13	38	Pérdida	1152022	1,152022
Cr 2	111673819	112349426	q13-q13	35	Pérdida	675548	0,675548

ANEXO 3 (Continuación)							
Cr 2	241124790	242593318	q37.3-q37.3	33	Ganancia	1468469	1,468469
Cr 2	242675900	242706350	q37.3-q37.3	30	Pérdida	30391	0,030391
Cr 3	46988350	53360302	p21.31-p21.1	43	Ganancia	6371893	6,371893
Cr 3	184208450	187278286	q27.1-q27.3	32	Ganancia	3069777	3,069777
Cr 3	195462986	195910873	q29-q29	30	Ganancia	447828	0,447828
Cr 3	196423015	199247786	q29-q29	33	Ganancia	2824712	2,824712
Cr 4	516875	2549964	p16.3-p16.3	30	Ganancia	2033030	2,033030
Cr 4	21974254	22047060	p14.3-p14.3	43	Pérdida	72747	0,072747
Cr 4	190717003	190873748	q35.2-q35.2	35	Pérdida	156686	0,156686
Cr 4	144953677	145283514	q31.21-q31.21	33	Pérdida	329778	0,329778
Cr 5	68788914	70779564	q13.2-q13.2	57	Pérdida	1990591	1,990591
Cr 5	108265110	108288190	q21.3-q21.3	30	Pérdida	23021	0,023021
Cr 5	113532250	115664852	q22.3-q23.1	30	Pérdida	2132543	2,132543
Cr 5	116282780	116305293	q23.1-q23.1	30	Pérdida	22454	0,022454
Cr 5	137638577	138153712	q31.2-q31.2	30	Ganancia	515076	0,515076
Cr 6	27321652	37954608	p22.1-p21.2	40	Ganancia	10632897	10,632897
Cr 6	41895635	42026044	p21.1-p21.1	30	Ganancia	130350	0,130350
Cr 6	42445767	44022710	p21.1-p21.1	30	Ganancia	1576884	1,576884
Cr 6	57375635	58809497	p11.2-p11.1	38	Pérdida	1433803	1,433803
Cr 7	130978	6815930	p22.3-p22.1	38	Ganancia	6684893	6,684893
Cr 7	56364350	64990998	p11.2-q11.21	30	Pérdida	8626589	8,626589
Cr 7	72022321	72363297	q11.22-q11.23	37	Pérdida	340917	0,340917
Cr 7	72382850	73733199	q11.23-q11.23	47	Ganancia	1350290	1,350290
Cr 7	73803410	74873342	q11.23-q11.23	35	Pérdida	1069873	1,069873
Cr 7	75016404	75943550	q11.23-q11.23	35	Ganancia	927087	0,927087
Cr 7	75945288	76692001	q11.23-q11.23	35	Pérdida	746654	0,746654
Cr 7	97306690	101857360	q21.3-q22.1	43	Ganancia	4550611	4,550611
Cr 7	101904918	102096550	q22.1-q22.1	40	Pérdida	191573	0,191573
Cr 7	127604630	130918866	q32.1-q32.3	35	Ganancia	3314177	3,314177
Cr 7	142942378	143801725	q34-q35	33	Pérdida	859288	0,859288
Cr 7	147991984	149090779	q36.1-q36.1	32	Ganancia	1098736	1,098736
Cr 7	150202817	150202876	q36.1-q36.1	32	Ganancia	0000000	0,000000

ANEXO 3 (Continuación)							
Cr 7	156716717	158816093	q36.3-q36.3	30	Ganancia	2099317	2,099317
Cr 8	16975	837507	p23.3-p23.3	33	Pérdida	820473	0,820473
Cr 8	6837435	7884993	p23.1-p23.1	41	Pérdida	1047499	1,047499
Cr 9	140794039	146264291	q24.3-q24.3	33	Ganancia	5470193	5,470193
Cr 9	36013399	38129130	p13.3-p13.2	30	Ganancia	2115672	2,115672
Cr 9	38869064	70202759	p13.1-q21.12	57	Pérdida	31333636	31,333636
Cr 9	117005092	122121162	q32-q33.1	35	Pérdida	5116011	5,116011
Cr 9	125621381	140209730	q33.2-q34.3	45	Ganancia	14588290	14,588290
Cr 9	140215147	140224149	q34.3-q34.3	35	Pérdida	8943	0,008943
Cr 10	37490461	37524172	p11.21-p11.21	47	Pérdida	33652	0,033652
Cr 10	44870523	52371353	q11.21-q11.23	42	Pérdida	7500771	7,500771
Cr 10	69469183	72433577	q21.3-q22.1	32	Ganancia	2964335	2,964335
Cr 10	73255752	76512210	q22.1-q22.2	32	Ganancia	3256399	3,256399
Cr 10	81419039	81612999	q22.3-q22.3	38	Pérdida	193901	0,193901
Cr 10	87691576	87941088	q23.1-q23.2	30	Pérdida	249453	0,249453
Cr 10	88920768	89249049	q23.2-q23.2	47	Pérdida	328222	0,328222
Cr 10	97862154	99150609	q24.1-q24.1	30	Ganancia	1288396	1,288396
Cr 10	101069145	105153511	q24.2-q24.33	33	Ganancia	4084307	4,084307
Cr 10	106792729	111531117	q25.1-q25.1	30	Pérdida	4738329	4,738329
Cr 11	4889498	5479112	p15.4-p15.4	30	Pérdida	589555	0,589555
Cr 11	11025191	14020935	p15.3-p15.2	30	Pérdida	2995685	2,995685
Cr 11	15016874	16396710	p15.2-p15.1	30	Pérdida	1379777	1,379777
Cr 11	20255097	20289613	p15.1-p15.1	43	Ganancia	34457	0,034457
Cr 11	20606485	32139158	p15.1-p13	37	Pérdida	11532614	11,532614
Cr 11	34559616	43212369	p13-p12	35	Pérdida	8652694	8,652694
Cr 11	44328581	44975021	p11.2-p11.2	30	Pérdida	646381	0,646381
Cr 11	45374300	45680149	p11.2-p11.2	32	Pérdida	305790	0,305790
Cr 11	45923615	48190140	p11.2-p11.2	35	Ganancia	2266466	2,266466
Cr 11	48975862	56505878	p11.12-q12.1	50	Pérdida	7529957	7,529957
Cr 11	56825292	57066954	q12.1-q12.1	30	Ganancia	241603	0,241603
Cr 11	60234326	71843375	q12.2-q13.4	42	Ganancia	11608990	11,608990
Cr 11	78296740	110910724	q14.1-q23.1	38	Pérdida	32613925	32,613925

ANEXO 3 (Continuación)							
Cr 11	111628123	115782456	q23.1-q23.3	32	Pérdida	4154274	4,154274
Cr 11	130067267	134092303	q24.3-q25	37	Pérdida	4024977	4,024977
Cr 12	47265824	56577370	q13.11-q13.2	43	Ganancia	9311487	9,311487
Cr 12	118766927	124260571	q24.23-q24.31	37	Ganancia	5493585	5,493585
Cr 13	109607314	114085670	q33.3-q34	37	Ganancia	4478297	4,478297
Cr 14	18407780	19359996	q11.1-q11.2	61	Pérdida	952157	0,952157
Cr 14	19552691	22675218	q11.2-q11.2	33	Ganancia	3122468	3,122468
Cr 14	26499374	26566421	q12-q12	30	Pérdida	66988	0,066988
Cr 14	72507629	74886354	q24.2-q24.3	37	Ganancia	2378666	2,378666
Cr 14	77477595	87856580	q24.3-q31.3	37	Pérdida	10378926	10,378926
Cr 14	96281242	98380658	q32.13-q32.2	37	Pérdida	2099357	2,099357
Cr 14	101425950	106342135	q32.31-q32.33	37	Ganancia	4916126	4,916126
Cr 15	18422770	26864659	p11.1-q12	32	Pérdida	8441830	8,441830
Cr 15	28248482	28452314	q13.1-q13.1	30	Pérdida	203773	0,203773
Cr 15	80528336	80982568	q25.1-q25.1	35	Pérdida	454173	0,454173
Cr 15	85100885	86724461	q25.2-q25.3	32	Pérdida	1623517	1,623517
Cr 15	91474962	93825906	q26.1-q26.1	30	Pérdida	2350885	2,350885
Cr 16	95546	14738282	p13.3-p13.12	37	Ganancia	14642677	14,642677
Cr 16	14778511	15353119	p13.11-p13.11	40	Pérdida	574549	0,574549
Cr 16	15464751	16213400	p13.11-p13.11	38	Ganancia	748590	0,748590
Cr 16	16245207	16447913	p13.11-p13.11	35	Pérdida	202647	0,202647
Cr 16	16512254	18010721	p13.11-p12.3	35	Ganancia	1498408	1,498408
Cr 16	18038778	18594572	p12.3-p12.3	38	Pérdida	555735	0,555735
Cr 16	18618876	23121774	p12.3-p12.2	30	Ganancia	4502839	4,502839
Cr 16	29473201	31711863	p11.2-p11.2	40	Ganancia	2238603	2,238603
Cr 16	31888699	33366648	p11.2-p11.2	37	Pérdida	1477890	1,477890
Cr 16	62913343	64047048	q21-q21	32	Pérdida	1133646	1,133646
Cr 16	64900356	69242742	q21-q22.1	47	Ganancia	4342327	4,342327
Cr 16	69532118	69758867	q22.1-q22.1	35	Pérdida	226690	0,226690
Cr 16	87940391	88704662	q24.2-q24.3	33	Ganancia	764212	0,764212
Cr 17	78259	10283354	p13.3-p13.1	35	Ganancia	10205036	10,205036
Cr 17	16954652	18257724	p11.2-p11.2	30	Ganancia	1303013	1,303013

ANEXO 3 (Continuación)							
Cr 17	18287891	19075717	p11.2-p11.2	32	Pérdida	787767	0,787767
Cr 17	19091256	20143868	p11.2-p11.2	42	Ganancia	1052553	1,052553
Cr 17	20167115	20738119	p11.2-p11.2	37	Pérdida	570945	0,570945
Cr 17	21247123	22372531	p11.2-p11.1	30	Pérdida	1125349	1,125349
Cr 17	23317186	27975206	p11.1-q11.2	33	Ganancia	4657961	4,657961
Cr 17	28515224	30166846	q11.2-q11.2	32	Pérdida	1651563	1,651563
Cr 17	31076344	46694286	q11.2-q21.32	45	Ganancia	15617883	15,617883
Cr 17	52236804	65373911	q22-q24.2	40	Ganancia	13137048	13,137048
Cr 17	68013563	78637182	q24.3-q25.3	50	Ganancia	10623560	10,623560
Cr 18	15636	112438	p11.32-p11.32	33	Pérdida	96743	0,096743
Cr 18	14397827	15014176	p11.21-p11.21	33	Pérdida	616290	0,616290
Cr 18	20890532	41740141	q11.2-q12.3	33	Pérdida	20849550	20,849550
Cr 18	43154947	43433426	q12.3-q12.3	30	Pérdida	278420	0,278420
Cr 18	47671711	52930061	q21.1-q21.2	32	Pérdida	5258291	5,258291
Cr 18	59338887	72045213	q21.33-q22.3	32	Pérdida	12706267	12,706267
Cr 19	45911	21758732	p13.3-p12	57	Ganancia	21712762	21,712762
Cr 19	37674877	63782948	q13.12-q13.43	52	Ganancia	26108012	26,108012
Cr 20	166419	464538	p13-p13	30	Ganancia	298060	0,298060
Cr 20	2241691	4949560	p13-p13	30	Ganancia	2707810	2,707810
Cr 20	25120777	37143320	p11.21-q11.23	48	Ganancia	12022484	12,022484
Cr 20	41019694	62364287	q12-q13.33	38	Ganancia	21344534	21,344534
Cr 21	13469523	14424968	q11.1-q11.2	47	Pérdida	955386	0,955386
Cr 21	42406592	46809657	q22.2-q22.3	38	Ganancia	4403006	4,403006
Cr 22	14763133	49565997	q11.1-q22.33	42	Ganancia	34802805	34,802805

ANEXO 3. Listado de las alteraciones observadas con frecuencias superiores o iguales al 30% en el grupo de pacientes jóvenes. Las ganancias se representan en color verde y las pérdidas se representan en color rojo. Los fragmentos con tamaños superiores a 1Mb se muestran destacados en color amarillo. Cr: cromosoma. Bp: pares de bases. Mb: Megabase.

ANEXO 4

Listado de las regiones recurrentemente alteradas en población anciana (frecuencia de aparición superior o igual al 30%).

ANEXO 4. Regiones recurrentemente alteradas en población anciana.							
Cromosoma	Inicio	Final	Región	% de tumores con el cambio	Tipo	Tamaño (Bp)	Tamaño (Mb)
Cr 1	37196	782738	p36.33-p36.33	38	Pérdida	745542	0,745542
Cr 1	8004570	10584597	p36.23-p36.22	32	Ganancia	2580027	2,580027
Cr 1	33684738	34904712	p35.1-p34.3	39	Pérdida	1219974	1,219974
Cr 1	48214817	50432010	p33-p33	33	Pérdida	2217193	2,217193
Cr 1	55828626	58702787	p32.3-p32.2	31	Pérdida	2874161	2,874161
Cr 1	59946536	60779435	p32.1-p32.1	30	Pérdida	832899	0,832899
Cr 1	69298208	77653895	p31.2-p31.1	32	Pérdida	8355687	8,355687
Cr 1	78464100	84186685	p31.1-p31.1	32	Pérdida	5722585	5,722585
Cr 1	97248909	99714760	p21.3-p21.2	30	Pérdida	2465851	2,465851
Cr 1	101239039	101239098	p21.2-p21.2	30	Pérdida	59	0,000059
Cr 1	120374173	143895571	p12-q21.1	35	Pérdida	23521398	23,521398
Cr 1	144095692	144267559	q21.1-q21.1	32	Ganancia	171867	0,171867
Cr 1	146107562	147962931	q21.1-q21.2	32	Pérdida	1855369	1,855369
Cr 1	148063115	149688312	q21.2-q21.2	31	Ganancia	1625197	1,625197
Cr 1	204242050	204347270	q32.1-q32.1	32	Pérdida	105220	0,105220
Cr 2	4272519	6802196	p25.3-p25.2	30	Pérdida	2529677	2,529677
Cr 2	87655848	87880563	p11.2-p11.2	30	Pérdida	224715	0,224715
Cr 2	89097237	95026803	p11.2-q11.1	37	Pérdida	5929566	5,929566
Cr 2	137089936	139300429	q22.1-q22.1	31	Pérdida	2210493	2,210493
Cr 2	143897043	144077820	q22.2-q22.2	30	Pérdida	180777	0,180777
Cr 3	8328434	8540495	p26.1-p26.1	30	Pérdida	212061	0,212061
Cr 3	47089939	50544648	p21.31-p21.31	33	Ganancia	3454709	3,454709
Cr 3	77022174	77177387	p12.3-p12.3	30	Pérdida	155213	0,155213
Cr 4	4705531	5219656	p16.2-p16.2	31	Pérdida	514125	0,514125
Cr 4	10221230	15290926	p16.1-p15.32	34	Pérdida	5069696	5,069696
Cr 4	15775613	15864768	p15.32-p15.32	32	Pérdida	89155	0,089155
Cr 4	17525610	23853451	p15.32-p15.2	30	Pérdida	6327841	6,327841

ANEXO 4 (Continuación)							
Cr 4	31143948	33778874	p15.1-p15.1	30	Pérdida	2634926	2,634926
Cr 4	144953677	145283514	q31.21-q31.21	32	Pérdida	329837	0,329837
Cr 4	166704644	169575008	q32.3-q32.3	31	Pérdida	2870364	2,870364
Cr 4	171670003	173720360	q33-q34.1	30	Pérdida	2050357	2,050357
Cr 4	174795216	182341128	q34.1-q34.3	32	Pérdida	7545912	7,545912
Cr 4	190555716	190873748	q35.2-q35.2	32	Pérdida	318032	0,318032
Cr 5	2311769	6623783	p15.33-p15.31	33	Pérdida	4312014	4,312014
Cr 5	21310323	22047060	p14.3-p14.3	30	Pérdida	736737	0,736737
Cr 5	68788914	70779564	q13.2-q13.2	44	Pérdida	1990650	1,990650
Cr 5	82752236	124813769	q14.2-q23.2	30	Pérdida	42061533	42,061533
Cr 6	30333015	37897378	p22.1-p21.2	33	Ganancia	7564363	7,564363
Cr 6	57903473	58793320	p11.2-p11.1	31	Pérdida	889847	0,889847
Cr 7	130978	6892833	p22.3-p22.1	38	Ganancia	6761855	6,761855
Cr 7	63969095	66600277	q11.21-q11.21	35	Ganancia	2631182	2,631182
Cr 7	70991788	76123971	q11.22-q11.23	40	Ganancia	5132183	5,132183
Cr 7	76431621	76888892	q11.23-q11.23	31	Ganancia	457271	0,457271
Cr 7	97306690	102491902	q21.3-q22.1	42	Ganancia	5185212	5,185212
Cr 7	104341894	105102745	q22.2-q22.3	33	Ganancia	760851	0,760851
Cr 7	127416899	131054664	q32.1-q32.3	36	Ganancia	3637765	3,637765
Cr 7	137983367	140393075	q33-q34	31	Ganancia	2409708	2,409708
Cr 7	143590133	143704676	q35-q35	30	Pérdida	114543	0,114543
Cr 7	147963723	149237521	q36.1-q36.1	34	Ganancia	1273798	1,273798
Cr 7	150202817	152017978	q36.1-q36.1	31	Ganancia	1815161	1,815161
Cr 7	156538150	158816093	q36.3-q36.3	32	Ganancia	2277943	2,277943
Cr 8	44879	479034	p23.3-p23.3	30	Pérdida	434155	0,434155
Cr 8	3654737	5420750	p23.2-p23.2	30	Pérdida	1766013	1,766013
Cr 8	6837435	7884993	p23.1-p23.1	34	Pérdida	1047558	1,047558
Cr 8	100301068	102815785	q22.2-q22.3	31	Ganancia	2514717	2,514717
Cr 8	103393373	104021217	q22.3-q22.3	32	Ganancia	627844	0,627844
Cr 8	120751631	121249663	q24.12-q24.12	32	Ganancia	498032	0,498032
Cr 8	123861277	124910630	q24.13-q24.13	32	Ganancia	1049353	1,049353
Cr 8	125234619	126763485	q24.13-q24.13	32	Ganancia	1528866	1,528866

ANEXO 4 (Continuación)							
Cr 8	140794039	146264291	q24.3-q24.3	34	Ganancia	5470252	5,470252
Cr 9	38987240	70202759	p13.1-q21.12	38	Pérdida	31215519	31,215519
Cr 9	117339053	122035229	q32-q33.1	32	Pérdida	4696176	4,696176
Cr 9	125806325	140089577	q33.3-q34.3	33	Ganancia	14283252	14,283252
Cr 10	37493081	37524172	p11.21-p11.21	34	Pérdida	31091	0,031091
Cr 10	45395892	51630099	q11.21-q11.23	37	Pérdida	6234207	6,234207
Cr 10	52091296	52371353	q11.23-q11.23	30	Pérdida	280057	0,280057
Cr 10	89041760	89249049	q23.2-q23.2	37	Pérdida	207289	0,207289
Cr 10	109054587	110871965	q25.1-q25.1	30	Pérdida	1817378	1,817378
Cr 10	130236811	130402405	q26.2-q26.2	30	Pérdida	165594	0,165594
Cr 11	20862993	31208638	p15.1-p13	30	Pérdida	10345645	10,345645
Cr 11	36891794	42687530	p12-p12	31	Pérdida	5795736	5,795736
Cr 11	48975862	54821358	p11.12-q11	36	Pérdida	5845496	5,845496
Cr 11	61395615	70459618	q12.2-q13.4	33	Ganancia	9064003	9,064003
Cr 11	78473443	82089520	q14.1-q14.1	33	Pérdida	3616077	3,616077
Cr 11	87895721	92739532	q14.2-q14.3	33	Pérdida	4843811	4,843811
Cr 11	96200883	99301505	q21-q22.1	30	Pérdida	3100622	3,100622
Cr 11	102666154	106365824	q22.2-q22.3	31	Pérdida	3699670	3,699670
Cr 11	111837198	112579769	q23.1-q23.2	30	Pérdida	742571	0,742571
Cr 11	114331302	114861068	q23.2-q23.3	30	Pérdida	529766	0,529766
Cr 11	130298607	133181567	q24.3-q25	34	Pérdida	2882960	2,882960
Cr 12	47175214	50388129	q13.11-q13.12	36	Ganancia	3212915	3,212915
Cr 12	51579531	56577370	q13.13-q13.2	34	Ganancia	4997839	4,997839
Cr 12	118766927	122904829	q24.23-q24.31	34	Ganancia	4137902	4,137902
Cr 12	123444989	124101207	q24.31-q24.31	30	Ganancia	656218	0,656218
Cr 13	94061940	95173976	q31.3-q32.1	31	Ganancia	1112036	1,112036
Cr 13	97212748	100173509	q32.1-q32.3	33	Ganancia	2960761	2,960761
Cr 13	109638987	110799432	q33.3-q34	32	Ganancia	1160445	1,160445
Cr 13	111907737	114085670	q34-q34	35	Ganancia	2177933	2,177933
Cr 14	18407780	19359996	q11.1-q11.2	45	Pérdida	952216	0,952216
Cr 14	24333453	24359646	q11.2-q11.2	30	Pérdida	26193	0,026193
Cr 14	26499374	27325327	q12-q12	30	Pérdida	825953	0,825953

ANEXO 4 (Continuación)							
Cr 14	72560327	74817409	q24.2-q24.3	30	Ganancia	2257082	2,257082
Cr 14	77723928	87656104	q24.3-q31.3	34	Pérdida	9932176	9,932176
Cr 14	96434284	98384060	q32.2-q32.2	33	Pérdida	1949776	1,949776
Cr 14	102126488	103094729	q32.31-q32.31	30	Ganancia	968241	0,968241
Cr 15	18422770	21062213	p11.1-q11.2	33	Pérdida	2639443	2,639443
Cr 15	21851422	22110773	q11.2-q11.2	31	Pérdida	259351	0,259351
Cr 15	26152619	26732615	q12-q12	31	Pérdida	579996	0,579996
Cr 15	85788326	86073394	q25.3-q25.3	30	Pérdida	285068	0,285068
Cr 15	92652097	95527749	q26.1-q26.2	30	Pérdida	2875652	2,875652
Cr 16	95546	5340336	p13.3-p13.3	37	Ganancia	5244790	5,244790
Cr 16	8533132	9308126	p13.2-p13.2	32	Ganancia	774994	0,774994
Cr 16	10257678	13133556	p13.2-p13.12	32	Ganancia	2875878	2,875878
Cr 16	13958239	19975882	p13.12-p12.3	33	Ganancia	6017643	6,017643
Cr 16	20835054	23121774	p12.3-p12.2	32	Ganancia	2286720	2,286720
Cr 16	27989924	31711863	p12.1-p11.2	34	Ganancia	3721939	3,721939
Cr 16	65125929	69250643	q21-q22.1	38	Ganancia	4124714	4,124714
Cr 17	78259	2184349	p13.3-p13.3	32	Ganancia	2106090	2,106090
Cr 17	19091256	20099208	p11.2-p11.2	33	Ganancia	1007952	1,007952
Cr 17	20167115	20261742	p11.2-p11.2	33	Pérdida	94627	0,094627
Cr 17	23397882	27792273	p11.1-q11.2	32	Ganancia	4394391	4,394391
Cr 17	31263448	46549327	q11.2-q21.32	37	Ganancia	15285879	15,285879
Cr 17	52409474	64111364	q22-q24.1	36	Ganancia	11701890	11,701890
Cr 17	68143174	78637182	q24.3-q25.3	39	Ganancia	10494008	10,494008
Cr 18	1165145	2382387	p11.32-p11.32	32	Pérdida	1217242	1,217242
Cr 18	4163757	5489245	p11.31-p11.31	30	Pérdida	1325488	1,325488
Cr 18	14397827	15014176	p11.21-p11.21	33	Pérdida	616349	0,616349
Cr 18	20587534	27517859	q11.2-q12.1	33	Pérdida	6930325	6,930325
Cr 18	28139160	41603555	q12.1-q12.3	37	Pérdida	13464395	13,464395
Cr 18	43154947	43363296	q12.3-q12.3	30	Pérdida	208349	0,208349
Cr 18	46372511	46404684	q21.1-q21.1	30	Pérdida	32173	0,032173
Cr 18	47006302	53160845	q21.1-q21.2	36	Pérdida	6154543	6,154543
Cr 18	55986144	72095903	q21.31-q22.3	36	Pérdida	16109759	16,109759

ANEXO 4 (Continuación)							
Cr 18	72742815	75173054	q22.3-q23	32	Pérdida	2430239	2,430239
Cr 19	45911	21769826	p13.3-p12	47	Ganancia	21723915	21,723915
Cr 19	37604537	63782948	q13.12-q13.43	42	Ganancia	26178411	26,178411
Cr 20	19264	551090	p13-p13	31	Ganancia	531826	0,531826
Cr 20	2112685	5784469	p13-p12.3	33	Ganancia	3671784	3,671784
Cr 20	24901888	37321965	p11.21-q11.23	47	Ganancia	12420077	12,420077
Cr 20	38920128	62421635	q12-q11.1	36	Ganancia	23501507	23,501507
Cr 21	13469523	13825130	q11.1-q11.1	34	Pérdida	355607	0,355607
Cr 21	46340586	46731075	q22.3-q22.3	30	Ganancia	390489	0,390489
Cr 22	15551536	23990431	q11.1-q11.23	34	Ganancia	8438895	8,438895
Cr 22	27293799	45623365	q12.1-q13.31	31	Ganancia	18329566	18,329566
Cr 22	48110394	49565997	q13.31-p22.33	32	Ganancia	1455603	1,455603

ANEXO 4. Listado de las alteraciones observadas con recurrencias superiores o iguales al 30% en el grupo de pacientes ancianos. Las ganancias se representan en color verde y las pérdidas se representan en color rojo. Los fragmentos con tamaños superiores a 1Mb se muestran destacados en color amarillo. Cr: cromosoma. Bp: pares de bases. Mb: Megabase.

ANEXO 5

Agrupación jerárquica no supervisada de los 146 tumores: listado de las alteraciones recurrentes con afectación estadísticamente diferencial en las dos ramas principales (*cluster 1* y *cluster 2*) ($p < 0,05$).

ANEXO 5. Alteraciones recurrentes estadísticamente diferenciales entre los <i>clusters</i> 1 y 2.							
Cromosoma	Inicio	Final	Región	Cluster 1 % de cambios	Cluster 2 % de cambios	Tipo	Tamaño (Mb)
Cr 1	37196	782738	p36.33-p36.33	57	29	Pérdida	0,745542
Cr 1	1400200	1648874	p36.33-p36.33	40	42	Ganancia	0,248674
Cr 1	2753466	15672072	p36.32-p36.21	34	38	Ganancia	12,918606
Cr 1	17084305	17494892	p36.13-p36.13	36	34	Ganancia	0,410587
Cr 1	18607784	30818685	p36.13-p35.2	32	26	Ganancia	12,210901
Cr 1	31105512	33817529	p35.2-p35.1	36	11	Ganancia	2,712017
Cr 1	35085113	37579448	p34.3-p34.3	38	30	Ganancia	2,494335
Cr 1	37676155	37716504	p34.3-p34.3	38	38	Ganancia	0,040349
Cr 1	37839097	46195438	p34.3-p34.1	38	36	Ganancia	8,356341
Cr 1	46538234	46595912	p34.1-p34.1	34	34	Ganancia	0,057678
Cr 1	144502667	144838929	q21.1-q21.1	40	23	Pérdida	0,336262
Cr 3	46988350	53499719	p21.31-p21.1	38	30	Ganancia	6,511369
Cr 3	183879536	184242285	q27.1-q27.1	26	32	Ganancia	0,362749
Cr 3	185870350	199381773	q27.2-q29	36	40	Ganancia	13,511423
Cr 6	27013001	30912319	p22.1-p21.33	30	45	Ganancia	3,899318
Cr 6	31239851	33861326	p21.33-p21.31	45	45	Ganancia	2,621475
Cr 6	34876321	38062223	p21.31-p21.2	43	28	Ganancia	3,185902
Cr 6	40281090	41106833	p21.2-p21.1	32	16	Pérdida	0,825743
Cr 6	51859017	53214508	p12.2-p12.1	30	15	Pérdida	1,355491
Cr 7	119981116	146400352	q31.31-q35	32	16	Pérdida	26,419236
Cr 8	16975	265678	p23.3-p23.3	43	22	Pérdida	0,248703
Cr 8	703811	837507	p23.3-p23.3	40	23	Pérdida	0,133696
Cr 8	136903688	136984216	q24.23-q24.23	30	15	Pérdida	0,080528
Cr 9	38987240	44317602	p13.1-p11.2	45	24	Pérdida	5,330362
Cr 9	44543265	68390592	p11.2-q13	53	33	Pérdida	23,847327
Cr 9	125495302	125684712	q33.2-q33.2	30	36	Ganancia	0,18941

ANEXO 5 (Continuación)							
Cr 9	125860832	140094930	q33.3-q34.3	45	40	Ganancia	14,234098
Cr 10	45675141	46059198	q11.21-q11.21	49	30	Pérdida	0,384057
Cr 10	46358135	47055269	q11.22-q11.22	51	32	Pérdida	0,697134
Cr 10	50091361	50653192	q11.23-q11.23	45	26	Pérdida	0,561831
Cr 10	50970485	51562396	q11.23-q11.23	45	27	Pérdida	0,591911
Cr 10	69652584	74369824	q21.3-q22.1	40	38	Ganancia	4,71724
Cr 10	74928966	76237639	q22.2-q22.2	38	36	Ganancia	1,308673
Cr 10	96993191	98747023	q23.33-q24.1	28	32	Ganancia	1,753832
Cr 10	104126712	104628297	q24.32-q24.32	40	40	Ganancia	0,501585
Cr 10	111278016	111531117	q25.1-q25.1	32	16	Pérdida	0,253101
Cr 11	12896282	13851248	p15.2-p15.2	32	16	Pérdida	0,954966
Cr 11	34633534	36731014	p13-p12	34	17	Pérdida	2,09748
Cr 11	43153453	43968253	p12-p11.2	34	16	Pérdida	0,8148
Cr 11	44328581	45162270	p11.2-p11.2	30	15	Pérdida	0,833689
Cr 11	45460221	45623831	p11.2-p11.2	34	17	Pérdida	0,16361
Cr 11	64386665	64768018	q13.1-q13.1	45	47	Ganancia	0,381353
Cr 11	68083084	68171527	q13.2-q13.2	42	42	Ganancia	0,088443
Cr 11	86194674	86497966	q14.2-q14.2	36	19	Pérdida	0,303292
Cr 11	110957404	111740672	q23.1-q23.1	30	15	Pérdida	0,783268
Cr 12	55020515	55108147	q13.2-q13.2	47	47	Ganancia	0,087632
Cr 12	55601413	55723329	q13.2-q13.2	45	45	Ganancia	0,121916
Cr 12	55939932	56050954	q13.2-q13.2	45	45	Ganancia	0,111022
Cr 14	18407780	24038142	q11.1-q11.2	60	38	Pérdida	5,630362
Cr 14	74603806	74817409	q24.3-q24.3	42	42	Ganancia	0,213603
Cr 14	77477595	77823643	q24.3-q24.3	38	19	Pérdida	0,346048
Cr 14	83720346	83878119	q31.2-q31.2	47	29	Pérdida	0,157773
Cr 15	18422770	26551335	p11.1-q12	51	26	Pérdida	8,128565
Cr 15	86792009	86925560	q25.3-q25.3	32	16	Pérdida	0,133551
Cr 16	14778511	47489492	p13.12-q12.1	36	18	Pérdida	32,710981
Cr 17	2891176	3120015	p13.3-p13.3	36	36	Ganancia	0,228839
Cr 17	3338115	3393728	p13.2-p13.2	34	36	Ganancia	0,055613
Cr 17	5289038	5510319	p13.2-p13.2	36	36	Ganancia	0,221281

ANEXO 5 (Continuación)							
Cr 17	6233179	6620757	p13.2-p13.1	36	36	Ganancia	0,387578
Cr 17	7765520	7851974	p13.1-p13.1	38	38	Ganancia	0,086454
Cr 17	8221506	8876283	p13.1-p13.1	40	36	Ganancia	0,654777
Cr 17	9332598	9547032	p13.1-p13.1	36	36	Ganancia	0,214434
Cr 17	9980604	10112290	p13.1-p13.1	36	36	Ganancia	0,131686
Cr 17	17910731	18140901	p11.2-p11.2	36	36	Ganancia	0,23017
Cr 17	19091256	20143868	p11.2-p11.2	45	36	Ganancia	1,052612
Cr 17	21967232	30204399	p11.2-p11.2	30	15	Pérdida	8,237167
Cr 17	21156292	21677685	p11.2-p11.2	30	30	Ganancia	0,521393
Cr 17	36038226	36363093	q12-q12	47	47	Ganancia	0,324867
Cr 17	38203570	39321774	q21.1-q21.2	49	49	Ganancia	1,118204
Cr 17	40591685	40823133	q21.2-q21.2	47	49	Ganancia	0,231448
Cr 17	40920609	44348048	q21.31-q21.31	51	51	Ganancia	3,427439
Cr 17	45207134	46333076	q21.32-q21.32	49	51	Ganancia	1,125942
Cr 17	70640329	78637182	q24.3-q25.3	53	53	Ganancia	7,996853
Cr 19	234741	750492	p13.3-p13.3	60	58	Ganancia	0,515751
Cr 19	47679816	48533039	q13.32-q13.33	53	53	Ganancia	0,853223
Cr 19	48941155	49805346	q13.33-q13.33	55	55	Ganancia	0,864191
Cr 19	51274869	51428837	q13.33-q13.41	55	55	Ganancia	0,153968
Cr 21	13469523	13825130	q11.1-q11.1	45	27	Pérdida	0,355607
Cr 21	42819357	43374013	q22.3-q22.3	40	40	Ganancia	0,554656
Cr 21	44332860	46797839	q22.3-q22.3	40	40	Ganancia	2,464979
Cr 22	16014200	16307023	q11.1-q11.1	49	49	Ganancia	0,292823
Cr 22	18883523	20037430	q11.21-q11.21	49	16	Pérdida	1,153907
Cr 22	19660346	21244926	q11.21-q11.21	45	47	Ganancia	1,58458
Cr 22	26587981	26852292	q12.1-q12.1	38	38	Ganancia	0,264311
Cr 22	31407280	32038069	q12.2-q12.2	38	38	Ganancia	0,630789
Cr 22	32920584	33730878	q12.3-q12.3	34	40	Ganancia	0,810294
Cr 22	33948058	34043584	q12.3-q12.3	40	40	Ganancia	0,095526
Cr 22	34468345	34654395	q12.3-q12.3	42	42	Ganancia	0,18605
Cr 22	34937970	41741808	q12.3-q13.2	43	45	Ganancia	6,803838
Cr 22	42377102	42442883	q13.2-q13.2	42	42	Ganancia	0,065781

ANEXO 5 (Continuación)							
Cr 22	44516623	45173039	q13.31-q13.31	42	43	Ganancia	0,656416
Cr 22	45533803	45803668	q13.31-q13.31	45	40	Ganancia	0,269865
Cr 22	48184160	48295450	q13.31-q13.31	42	42	Ganancia	0,11129

ANEXO 5. Listado de las alteraciones recurrentes que demostraron afectación estadísticamente diferencial ($p < 0,05$) en los *clusters* 1 ($n=55$) y 2 ($n=91$) tras el análisis no supervisado de los 146 tumores. Las ganancias se representan en color verde y las pérdidas se representan en color rojo. Los fragmentos con tamaños superiores a 1Mb se muestran destacados en color amarillo. Cr: cromosoma. Mb: Megabase.

ANEXO 6

Agrupación jerárquica no supervisada de los 60 tumores de inicio temprano: listado de las alteraciones recurrentes con afectación estadísticamente diferencial en las dos ramas principales (*cluster A* y *cluster B*) ($p < 0,05$).

ANEXO 6. Alteraciones recurrentes estadísticamente diferenciales entre los <i>clusters</i> A y B.							
Cromosoma	Inicio	Final	Región	Cluster A % de cambios	Cluster B % de cambios	Tipo	Tamaño (Mb)
Cr 1	1790897	5739639	p36.33-p36.31	50	18	Ganancia	3,948742
Cr 1	1879943	4191769	p36.33-p36.32	0	32	Pérdida	2,311826
Cr 1	5790540	38972164	p36.31-p34.3	0	32	Pérdida	33,181624
Cr 1	7004110	7702191	p36.31-p36.23	47	14	Ganancia	0,698081
Cr 1	11396816	13870673	p36.22-p36.21	53	18	Ganancia	2,473857
Cr 1	14188732	18607843	p36.21-p36.13	37	9	Ganancia	4,419111
Cr 1	29606699	29859455	p35.3-p35.3	45	18	Ganancia	0,252756
Cr 1	29977696	30946975	p35.3-p35.2	37	9	Ganancia	0,969279
Cr 1	33678362	33728154	p35.1-p35.1	32	9	Ganancia	0,049792
Cr 1	37152757	37642046	p34.3-p34.3	37	9	Ganancia	0,489289
Cr 1	38156559	46767826	p34.3-p34.1	47	18	Ganancia	8,611267
Cr 1	53952417	54978842	p32.3-p32.3	39	9	Ganancia	1,026425
Cr 2	235535079	238899373	q37.1-q37.3	34	5	Ganancia	3,364294
Cr 3	130601039	135696558	q22.1-q22.2	8	32	Ganancia	5,095519
Cr 3	188442412	194966065	q28-q29	13	32	Ganancia	6,523653
Cr 5	17843181	31351345	p15.1-p13.3	8	32	Ganancia	13,508164
Cr 7	130978	5954404	p22.3-p22.1	50	14	Ganancia	5,823426
Cr 7	72591869	73218450	q11.23-q11.23	0	32	Pérdida	0,626581
Cr 7	73855403	74920207	q11.23-q11.23	34	5	Ganancia	1,064804
Cr 7	97502956	101852405	q21.3-q22.1	50	18	Ganancia	4,349449
Cr 8	62926537	66431775	q12.3-q13.1	8	36	Ganancia	3,505238
Cr 8	76970306	80835376	q21.11-q21.13	8	36	Ganancia	3,86507
Cr 8	81757877	94645101	q21.13-q22.1	8	32	Ganancia	12,887224
Cr 8	104189018	120751690	q22.3-q24.12	13	41	Ganancia	16,562672
Cr 8	123121347	123567652	q24.13-q24.13	13	41	Ganancia	0,446305
Cr 8	126763426	128446217	q24.13-q24.21	16	41	Ganancia	1,682791

ANEXO 6 (Continuación)							
Cr 8	129135433	129681392	q24.21-q24.21	11	36	Ganancia	0,545959
Cr 8	131849830	134047292	q24.22-q24.22	8	36	Ganancia	2,197462
Cr 8	134983303	138973121	q24.22-q24.23	8	32	Ganancia	3,989818
Cr 9	125802859	127323777	q33.3-q33.3	47	14	Ganancia	1,520918
Cr 9	127694938	140003381	q33.3-q34.3	58	23	Ganancia	12,308443
Cr 9	134574905	134964078	q34.13-q34.13	0	32	Pérdida	0,389173
Cr 10	727056666	73526438	q22.1-q22.1	37	9	Ganancia	0,820772
Cr 11	56810118	57267916	q12.1-q12.1	34	5	Ganancia	0,457798
Cr 11	59822821	73462760	q12.1-q13.4	34	5	Ganancia	13,639939
Cr 12	55341278	55716882	q13.2-q13.2	55	27	Ganancia	0,375604
Cr 12	55936553	56022850	q13.2-q13.2	53	18	Ganancia	0,086297
Cr 12	107534242	108817927	q23.3-q23.3	0	36	Pérdida	1,283685
Cr 12	109594166	112926699	q24.11-q24.13	0	32	Pérdida	3,332533
Cr 12	115451496	131753825	q24.21-q24.33	0	32	Pérdida	16,302329
Cr 12	119324213	124253424	q24.23-q24.31	47	14	Ganancia	4,929211
Cr 13	26342079	30511688	q12.13-q12.3	8	36	Ganancia	4,169609
Cr 13	30667467	109516998	q12.3-q33.3	8	36	Ganancia	78,849531
Cr 16	83206883	83620889	q23.3-q23.3	3	41	Pérdida	0,414006
Cr 16	87940391	88704662	q24.2-q24.3	0	32	Pérdida	0,764271
Cr 17	78259	4952847	p13.3-p13.2	58	9	Ganancia	4,874588
Cr 17	2560862	31249514	p13.3-q11.2	0	32	Pérdida	28,688652
Cr 17	5271837	8875167	p13.2-p13.1	47	14	Ganancia	3,60333
Cr 17	25583882	27978684	q11.1-q11.2	45	14	Ganancia	2,394802
Cr 17	69699026	70036248	q24.3-q24.3	53	18	Ganancia	0,337222
Cr 17	70300535	78581525	q24.3-q25.3	58	23	Ganancia	8,28099
Cr 19	750433	19630123	p13.3-p13.11	71	36	Ganancia	18,87969
Cr 19	40155830	61084993	q13.2-q13.43	53	18	Ganancia	20,929163
Cr 19	62036354	63240562	q13.43-q13.43	58	23	Ganancia	1,204208
Cr 22	16895384	17291277	q11.1-q11.1	58	23	Ganancia	0,395893
Cr 22	17671003	18961119	q11.1-q11.21	58	23	Ganancia	1,290116
Cr 22	19051034	25345200	q11.21-q11.23	0	36	Pérdida	6,294166
Cr 22	20037371	26275168	q11.21-q12.1	37	18	Ganancia	6,237797

ANEXO 6 (Continuación)							
Cr 22	26254454	32913295	q12.1-q12.3	0	32	Pérdida	6,658841
Cr 22	30628022	31225200	q12.2-q12.2	50	18	Ganancia	0,597178
Cr 22	41741749	44675355	q13.2-q13.31	55	23	Ganancia	2,933606
Cr 22	45172980	45717669	q13.31-q13.31	55	23	Ganancia	0,544689

ANEXO 6. Listado de las alteraciones recurrentes que demostraron afectación estadísticamente diferencial ($p < 0,05$) en los *clusters* A ($n=38$) y B ($n=22$) tras el análisis no supervisado de los 60 tumores de inicio temprano. Las ganancias se representan en color verde y las pérdidas se representan en color rojo. Los fragmentos con tamaños superiores a 1Mb se muestran destacados en color amarillo. Cr: cromosoma. Mb: Megabase.

ANEXO 7

Agrupación jerárquica no supervisada de los 86 tumores de inicio tardío: listado de las alteraciones recurrentes con afectación estadísticamente diferencial en las dos ramas principales (*cluster C y cluster D*) ($p < 0,05$).

ANEXO 7. Alteraciones recurrentes estadísticamente diferenciales entre los <i>clusters C y D</i>.							
Cromosoma	Inicio	Final	Región	Cluster C % de cambios	Cluster D % de cambios	Tipo	Tamaño (Mb)
Cr 1	37196	782738	p36.33-p36.33	31	0	Ganancia	0,745542
Cr 1	1018317	1648874	p36.33-p36.33	31	0	Pérdida	0,630557
Cr 1	1710611	7001337	p36.33-p36.31	31	0	Pérdida	5,290726
Cr 1	7363702	7598208	p36.23-p36.23	31	0	Pérdida	0,234506
Cr 1	10636709	11033130	p36.22-p36.22	31	0	Pérdida	0,396421
Cr 1	15911296	16661919	p36.21-p36.13	31	0	Pérdida	0,750623
Cr 1	17172571	18674015	p36.13-p36.13	31	0	Pérdida	1,501444
Cr 1	18782259	19059208	p36.13-p36.13	31	0	Pérdida	0,276949
Cr 1	20166387	22540192	p36.13-p36.12	31	0	Pérdida	2,373805
Cr 1	29503356	31130392	p35.3-p35.2	31	0	Pérdida	1,627036
Cr 1	37258055	37310657	p34.3-p34.3	31	0	Pérdida	0,052602
Cr 1	41509720	42198850	p34.2-p34.2	31	0	Pérdida	0,68913
Cr 1	120374173	143582505	p12-q21.1	31	0	Ganancia	23,208332
Cr 1	146111761	146163929	q21.1-q21.1	31	0	Ganancia	0,052168
Cr 1	146559707	147588158	q21.1-q21.2	31	0	Ganancia	1,028451
Cr 1	184851137	198214840	q25.3-q31.3	31	0	Ganancia	13,363703
Cr 2	45857	3763225	p25.3-p25.3	38	0	Pérdida	3,717368
Cr 2	131205332	131523450	q21.1-q21.1	31	0	Pérdida	0,318118
Cr 2	161097506	161231048	q24.2-q24.2	31	0	Ganancia	0,133542
Cr 2	235526684	242706350	q37.1-q37.3	44	0	Pérdida	7,179666
Cr 3	13487536	13853337	p25.1-p25.1	31	0	Pérdida	0,365801
Cr 3	101899670	101928546	q12.3-q12.3	31	0	Ganancia	0,028876
Cr 3	194964690	195223463	q29-q29	31	0	Ganancia	0,258773
Cr 3	199351530	199381773	q29-q29	31	0	Ganancia	0,030243
Cr 4	106643	9789135	p16.3-p16.1	31	0	Pérdida	9,682492
Cr 4	132751038	133077229	q28.3-q28.3	31	0	Ganancia	0,326191

ANEXO 7 (Continuación)							
Cr 4	133740807	133799359	q28.3-q28.3	31	0	Ganancia	0,058552
Cr 4	143274049	143322494	q31.21-q31.21	31	0	Ganancia	0,048445
Cr 4	144953677	145283514	q31.21-q31.21	31	0	Ganancia	0,329837
Cr 4	189089078	189333009	q35.2-q35.2	31	0	Pérdida	0,243931
Cr 4	190519603	191220624	q35.2-q35.2	44	8	Pérdida	0,701021
Cr 5	144656	6828856	p15.33-p15.31	31	0	Pérdida	6,6842
Cr 5	20738430	22047060	p14.3-p14.3	31	0	Ganancia	1,30863
Cr 5	69691949	69795703	q13.2-q13.2	31	0	Ganancia	0,103754
Cr 5	70345357	70443571	q13.2-q13.2	31	0	Ganancia	0,098214
Cr 5	160279070	165086241	q34-q34	31	0	Ganancia	4,807171
Cr 6	11286276	13436054	p24.2-p23	31	0	Ganancia	2,149778
Cr 6	13521664	13560493	p23-p23	31	0	Ganancia	0,038829
Cr 6	13674562	13770303	p23-p23	31	0	Ganancia	0,095741
Cr 6	14236842	16881668	p23-p22.3	31	0	Ganancia	2,644826
Cr 6	17696313	18518315	p22.3-p22.3	31	0	Ganancia	0,822002
Cr 6	24175841	24250655	p22.3-p22.3	31	0	Ganancia	0,074814
Cr 6	24462882	25815102	p22.3-p22.2	31	0	Ganancia	1,35222
Cr 6	26799119	27108302	p22.2-p22.1	31	0	Ganancia	0,309183
Cr 6	29102861	29467464	p22.1-p22.1	31	0	Ganancia	0,364603
Cr 6	46371850	107338112	p12.3-q21	31	0	Ganancia	60,966262
Cr 6	108963923	109897942	q21-q21	31	0	Ganancia	0,934019
Cr 6	112158099	112250765	q21-q21	31	0	Ganancia	0,092666
Cr 6	113734233	114540507	q21-q21	31	0	Ganancia	0,806274
Cr 6	119234911	119631818	q22.31-q22.31	31	0	Ganancia	0,396907
Cr 6	131047308	131079816	q23.1-q23.1	31	0	Ganancia	0,032508
Cr 6	165849639	170760224	q27-q27	38	0	Pérdida	4,910585
Cr 7	130978	2796106	p22.3-p22.3	31	0	Pérdida	2,665128
Cr 7	2966808	4205627	p22.2-p22.2	31	0	Pérdida	1,238819
Cr 7	4540499	4924546	p22.1-p22.1	31	0	Pérdida	0,384047
Cr 7	30561815	31117962	p14.3-p14.3	31	0	Pérdida	0,556147
Cr 7	64165787	66452177	q11.21-q11.21	31	0	Ganancia	2,28639
Cr 7	71685933	71964260	q11.22-q11.22	31	0	Ganancia	0,278327

ANEXO 7 (Continuación)							
Cr 7	72074982	72363297	q11.22-q11.23	31	0	Ganancia	0,288315
Cr 7	73788565	74057800	q11.23-q11.23	31	0	Ganancia	0,269235
Cr 7	76461459	76624574	q11.23-q11.23	31	0	Ganancia	0,163115
Cr 7	86889496	87865426	q21.12-q21.12	31	0	Ganancia	0,97593
Cr 7	98523854	98734143	q22.1-q22.1	31	0	Ganancia	0,210289
Cr 7	98970415	99265488	q22.1-q22.1	31	0	Ganancia	0,295073
Cr 7	102125708	102245883	q22.1-q22.1	31	0	Ganancia	0,120175
Cr 7	130875183	131844918	q32.3-q32.3	31	0	Pérdida	0,969735
Cr 7	142713030	142906069	q34-q34	31	0	Pérdida	0,193039
Cr 7	143504894	143704676	q35-q35	31	0	Ganancia	0,199782
Cr 7	148630219	149238579	q36.1-q36.1	31	0	Pérdida	0,60836
Cr 7	149403678	149569463	q36.1-q36.1	31	0	Pérdida	0,165785
Cr 7	153817014	158722979	q36.2-q36.3	31	0	Pérdida	4,905965
Cr 8	486894	2041697	p23.3-p23.3	44	8	Pérdida	1,554803
Cr 8	6616518	6707647	p23.1-p23.1	31	0	Pérdida	0,091129
Cr 8	9596856	12678694	p23.1-p23.1	31	0	Pérdida	3,081838
Cr 8	20056451	20348759	p21.3-p21.3	31	0	Pérdida	0,292308
Cr 8	20469940	23182451	p21.3-p21.3	31	0	Pérdida	2,712511
Cr 8	49651883	49910927	q11.21-q11.21	31	0	Pérdida	0,259044
Cr 8	122363398	123649716	q24.12-q24.13	31	0	Ganancia	1,286318
Cr 8	140674434	146264291	q24.3-q24.3	50	8	Pérdida	5,589857
Cr 9	38869064	70164286	p13.1-q21.11	31	0	Ganancia	31,295222
Cr 9	69815571	69951424	q21.11-q21.11	13	54	Pérdida	0,135853
Cr 9	94777955	95067541	q22.31-q22.31	31	0	Pérdida	0,289586
Cr 9	134407025	140224149	q34.13-q34.3	44	0	Pérdida	5,817124
Cr 10	143762	2055923	p15.3-p15.3	31	0	Pérdida	1,912161
Cr 10	70901810	73409580	q22.1-q22.1	31	0	Pérdida	2,50777
Cr 10	78707399	80926995	q22.3-q22.3	31	0	Pérdida	2,219596
Cr 10	124218448	135235140	q26.13-q26.3	50	0	Pérdida	11,016692
Cr 11	171667	3657656	p15.5-p15.4	31	0	Pérdida	3,485989
Cr 11	7702951	8418376	p15.4-p15.4	31	0	Pérdida	0,715425
Cr 11	10952214	12646314	p15.3-p15.3	31	0	Pérdida	1,6941

ANEXO 7 (Continuación)							
Cr 11	20087272	20165049	p15.1-p15.1	31	0	Pérdida	0,077777
Cr 11	33357333	33650729	p13-p13	31	0	Pérdida	0,293396
Cr 11	35277725	37315782	p13-p12	31	0	Pérdida	2,038057
Cr 11	43227930	45705096	p12-p11.2	31	0	Pérdida	2,477166
Cr 11	56301544	70964720	q12.1-q13.4	31	0	Pérdida	14,663176
Cr 11	77980929	79574876	q14.1-q14.1	31	0	Pérdida	1,593947
Cr 11	111350546	116110946	q23.1-q23.3	31	0	Pérdida	4,7604
Cr 11	116667559	117042302	q23.3-q23.3	31	0	Pérdida	0,374743
Cr 11	117746762	117903818	q23.3-q23.3	31	0	Pérdida	0,157056
Cr 11	118658437	119662240	q23.3-q23.3	31	0	Pérdida	1,003803
Cr 11	119855169	126988464	q23.3-q24.2	31	0	Pérdida	7,133295
Cr 11	127279512	127390649	q24.2-q24.2	31	0	Pérdida	0,111137
Cr 11	130355726	134401939	q24.3-q25	31	0	Pérdida	4,046213
Cr 12	112738	382103	p13.33-p13.33	31	0	Pérdida	0,269365
Cr 12	1631432	1927120	p13.33-p13.33	31	0	Pérdida	0,295688
Cr 12	2351609	3621198	p13.33-p13.32	31	0	Pérdida	1,269589
Cr 12	4740877	5971124	p13.32-p13.31	31	0	Pérdida	1,230247
Cr 12	51225110	51342088	q13.12-q13.12	31	0	Pérdida	0,116978
Cr 12	112381170	113447832	q24.13-q24.13	31	0	Pérdida	1,066662
Cr 12	128943785	132283344	q24.32-q24.33	31	0	Pérdida	3,339559
Cr 13	18016985	19475214	q11-q11	31	0	Ganancia	1,458229
Cr 13	45891618	50665433	q14.13-q14.2	31	0	Ganancia	4,773815
Cr 13	51029409	108733796	q14.3-q33.3	31	0	Ganancia	57,704387
Cr 13	109921838	114085670	q33.3-q34	44	0	Pérdida	4,163832
Cr 14	19552691	19998929	q11.2-q11.2	31	0	Pérdida	0,446238
Cr 14	22374505	24359646	q11.2-q11.2	31	0	Pérdida	1,985141
Cr 14	52730197	54580355	q22.1-q22.2	31	0	Pérdida	1,850158
Cr 14	55417987	60955107	q22.2-q23.1	31	0	Pérdida	5,53712
Cr 14	61397180	62903721	q23.1-q23.2	31	0	Pérdida	1,506541
Cr 14	65309395	67456150	q23.3-q23.3	31	0	Pérdida	2,146755
Cr 14	68305544	73237826	q24.1-q24.2	31	0	Pérdida	4,932282
Cr 14	73473134	74206859	q24.2-q24.3	31	0	Pérdida	0,733725

ANEXO 7 (Continuación)							
Cr 14	74854387	78827045	q24.3-q24.3	31	0	Pérdida	3,972658
Cr 14	90644065	106342135	q32.11-q32.33	44	8	Pérdida	15,69807
Cr 15	18642785	18964206	p11.1-p11.1	31	0	Ganancia	0,321421
Cr 15	19993266	20269549	q11.1-q11.1	31	0	Ganancia	0,276283
Cr 15	21361577	21812091	q11.2-q11.2	31	0	Pérdida	0,450514
Cr 15	22407508	25955785	q11.2-q12	38	0	Pérdida	3,548277
Cr 15	27197191	27217854	q12-q12	31	0	Pérdida	0,020663
Cr 15	32507336	32656810	q13.3-q13.3	31	0	Pérdida	0,149474
Cr 15	63268546	65089566	q22.2-q22.31	31	0	Pérdida	1,82102
Cr 15	65438137	75861237	q22.31-q24.2	31	0	Pérdida	10,4231
Cr 15	77108279	78587455	q24.3-q25.1	31	0	Pérdida	1,479176
Cr 15	78908109	79417365	q25.1-q25.1	31	0	Pérdida	0,509256
Cr 15	81012661	83104545	q25.1-q25.2	31	0	Pérdida	2,091884
Cr 15	84208930	87365692	q25.2-q25.3	31	0	Pérdida	3,156762
Cr 15	89162314	90966928	q26.1-q26.1	31	0	Pérdida	1,804614
Cr 15	91392604	100165425	q26.1-q26.3	31	0	Pérdida	8,772821
Cr 16	95546	3706417	p13.3-p13.3	31	0	Pérdida	3,610871
Cr 16	5444614	5976940	p13.3-p13.3	31	0	Pérdida	0,532326
Cr 16	6461127	6899738	p13.3-p13.3	31	0	Pérdida	0,438611
Cr 16	16245207	16534517	p13.11-p13.11	31	0	Ganancia	0,28931
Cr 16	18100529	18620825	p12.3-p12.3	31	0	Ganancia	0,520296
Cr 16	47333787	47892115	q12.1-q12.1	31	0	Pérdida	0,558328
Cr 16	52549943	54959075	q12.1-q12.2	31	0	Pérdida	2,409132
Cr 16	77296839	77715627	q23.1-q23.1	31	0	Pérdida	0,418788
Cr 16	77923573	79097470	q23.1-q23.1	31	0	Pérdida	1,173897
Cr 16	80844310	81205540	q23.2-q23.2	31	0	Pérdida	0,36123
Cr 16	82530645	82644825	q23.3-q23.3	31	0	Pérdida	0,11418
Cr 16	82712212	88704662	q23.3-q24.3	44	0	Pérdida	5,99245
Cr 17	78259	410725	p13.3-p13.3	31	0	Pérdida	0,332466
Cr 17	42179460	42285169	q21.31-q21.31	31	0	Pérdida	0,105709
Cr 17	71715302	78637182	q25.1-q25.3	44	0	Pérdida	6,92188
Cr 18	8376216	8420180	p11.23-p11.23	31	0	Pérdida	0,043964

ANEXO 7 (Continuación)							
Cr 18	13170107	13625744	p11.21-p11.21	31	0	Pérdida	0,455637
Cr 18	44581924	44737351	q21.1-q21.1	31	0	Pérdida	0,155427
Cr 18	69534798	76108599	q22.3-q23	44	0	Pérdida	6,573801
Cr 19	255431	2539116	p13.3-p13.3	31	0	Pérdida	2,283685
Cr 19	21559347	21758732	p12-p12	31	0	Pérdida	0,199385
Cr 19	47198029	47364885	q13.32-q13.32	31	0	Pérdida	0,166856
Cr 19	56215110	56892897	q13.42-q13.43	31	0	Pérdida	0,677787
Cr 19	56215110	60871459	q13.42-q13.43	0	31	Ganancia	4,656349
Cr 20	14831338	14968466	p12.1-p12.1	31	0	Pérdida	0,137128
Cr 20	54722034	62421635	q13.2-q11.1	38	0	Pérdida	7,699601
Cr 21	38125644	38340213	q22.13-q22.13	31	0	Pérdida	0,214569
Cr 21	40209688	46907149	q22.2-q11.1	44	0	Pérdida	6,697461
Cr 22	14763133	49565997	q11.1-p22.33	56	0	Pérdida	34,802864

ANEXO 7. Listado de las alteraciones recurrentes que demostraron afectación estadísticamente diferencial ($p < 0,05$) en los *clusters* C ($n=56$) y D ($n=30$) tras el análisis no supervisado de los 86 tumores de inicio tardío. Las ganancias se representan en color verde y las pérdidas se representan en color rojo. Los fragmentos con tamaños superiores a 1Mb se muestran destacados en color amarillo. Cr: cromosoma. Mb: Megabase.

ANEXO 8

Producción científica.

Artículos publicados:

- Arriba M, García JL, Inglada-Pérez L, Rueda D, Osorio I, Rodríguez Y, Álvaro E, Sánchez R, Fernández-Miguel T, Pérez J, Hernández JM, Benítez J, González-Sarmiento R, Urioste M, Perea J. ***DNA copy number profiling reveals different patterns of chromosomal instability within colorectal cancer according to the age of onset.*** *Mol Carcinog.* 2015 Mar 25. doi: 10.1002/mc.22315. [Epub ahead of print]. Factor de impacto: 4,808.
- Perea J, Rueda D, García JL, Inglada-Pérez L, Osorio I, Arriba M, Pérez J, Sánchez R, Fernández-Miguel T, Rodríguez Y, Cano JM, Benítez J, González-Sarmiento R, Urioste M. ***Classifying early-onset colorectal cancer according to tumor location: new potential subcategories to explore.*** *Am J Cancer Res.* 2015 Jun 15;5(7):2308-13. eCollection 2015. Factor de impacto: 4,165.
- Perea J, Alegre C, Osorio I, Rueda D, Sánchez R, Arriba M, Gaspar M, Brandariz L, Pajares JA, García-Borda J, Ferrero E. ***New perspectives in multiple primary colorectal cancers.*** *Colorectal Disease* (en proceso de revisión). Factor de impacto: 2,351.

Comunicaciones a congresos:

- ***Chromosomal instability in colorectal cancer according to the age of onset***
Autores: M. Arriba, Juan L. García, L. Inglada-Pérez, D. Rueda, I. Osorio, Y. Rodríguez, M. Gaspar, R. Sánchez, J. Pérez, R. González-Sarmiento, M. Urioste, J. Perea.
Congreso: *European Cancer Congress 2015.* 25-29 Septiembre 2015. Viena, Austria.
Modalidad: Póster.

- **Análisis de las vías de carcinogénesis colorrectal en el cáncer colorrectal sincrónico**

Autores: J. Perea García, D. Rueda, R. Sánchez, M. Arriba, Juan L. García, T. Fernández de Miguel, E. Ferrero, R. González Sarmiento, M. Urioste.

Congreso: XIX Reunión Nacional Fundación Asociación Española de Coloproctología. 20-22 Mayo 2015. Valencia.

Modalidad: Comunicación oral.