

Biomédica 2010;30:390-400

ARTÍCULO ORIGINAL

Detección de aneuploidías del cromosoma 17 y delección del gen *TP53* en una amplia variedad de tumores sólidos mediante hibridación *in situ* fluorescente bicolor

Juan Carlos Herrera¹, Luis Fernando Isaza², José Luis Ramírez¹, Gonzalo Vásquez¹, Carlos Mario Muñetón¹

¹ Unidad de Genética Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

² Departamento de Cirugía, Hospital Universitario San Vicente de Paúl, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Introducción. El *TP53* es un gen supresor de tumores localizado en la región cromosómica 17p13.1; controla el ciclo celular y se encuentra alterado en cerca de 50% de todas las neoplasias.

Objetivos. Determinar las aneuploidías del cromosoma 17 y la delección en el *locus* 17p13.1 del gen *TP53*, en diversos tumores sólidos primarios utilizando la técnica FISH-bicolor.

Materiales y métodos. Se analizaron 38 muestras de diversos tipos de tumores sólidos primarios. Todas las muestras se disociaron mecánicamente y enzimáticamente con colagenasa al 0,2%, antes de la obtención de los núcleos interfásicos. La técnica de FISH-bicolor se realizó en núcleos interfásicos, mediante sondas marcadas directamente con fluorocromos para el centrómero del cromosoma 17 (CEP 17; señal verde; VYSIS) y para el *locus* específico del gen *TP53* (LSI 17p13.1; señal naranja; VYSIS).

Resultados. Se encontró que 63% (24/38) de las muestras tenían aneuploidías del cromosoma 17. La monosomía fue la aneuploidía más frecuente (75%; 18/24), seguida de la trisomía (17%; 4/24); la nulisomía y la tetrasomía fueron menos frecuentes. El 89,5% (34/38) de los casos presentaron delección del gen *TP53*. Sólo cuatro casos fueron normales para el número de copias del cromosoma 17 y del gen *TP53*. El estudio histopatológico mostró que la mayoría de las muestras eran tumores malignos.

Conclusiones. La aneuploidía del cromosoma 17 y la delección en el *locus* 17p13.1 del gen *TP53* son alteraciones muy frecuentes en los tumores sólidos. La técnica FISH-bicolor permite detectar simultáneamente alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales en núcleos interfásicos.

Palabras clave: aneuploidía, delección cromosómica, gen *Tp53*, hibridación fluorescente *in situ*, neoplasias, inestabilidad cromosómica, heterogeneidad genética.

Detection of chromosome 17 aneuploidy and *TP53* gene deletion in a broad variety of solid tumors by dual-color fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

Introduction. *TP53* is a tumor suppressor gene located on chromosome 17p13.1. This gene is essential for the control of cell cycle and has been found altered in about 50% of all tumor types.

Objective. The presence of aneuploidy of chromosome 17 and *TP53* gene deletion at 17p13.1 locus was determined in primary solid tumors using the dual-color FISH (fluorescence *in situ* hybridization).

Materials and methods. Thirty-eight samples consisted of several types of primary solid tumors. All samples were mechanically and enzymatically disaggregated with 0.2% collagenase prior to obtaining interphase nuclei. The dual-color FISH was performed using direct fluorescent labeling probes for the chromosome 17 centromere (green signal) and for the *TP53* gene locus-specific (orange signal).

Results. Characteristic aneuploidy on chromosome 17 was found in 63% (24/38) of the samples. Monosomy occurred most frequently (75%, 18/24), followed by trisomy (17%, 4/24); nullisomy and tetrasomy were less frequent. *TP53* gene deletion was found in 89.5% (34/38) of cases. Only four tumors were normal for copy number of chromosome 17 and *TP53* gene. The histopathologic study showed that most of the samples were malignant tumors.

Conclusions. Aneuploidy of chromosome 17 and deletion at 17p13.1 locus of *TP53* gene were genetic alterations found to be very frequent in solid tumors. The dual-color FISH was able to detect both numerical and structural chromosomal abnormalities in interphase nuclei.

Key words: Aneuploidy, chromosome deletion; genes, p53; *in situ* hybridization, fluorescence; neoplasms, chromosomal instability, genetic heterogeneity.

El cáncer se origina por la acumulación de diversas alteraciones genéticas en genes supresores de tumores, protooncogenes o genes de reparación (1). La mayoría de los tumores sólidos humanos presenta una amplia variedad de alteraciones génicas y de desequilibrios cromosómicos (ganancias y pérdidas) (2). Además, la inestabilidad cromosómica es una característica común de los tumores sólidos.

Desde hace décadas se ha propuesto la teoría de la aneuploidía como causa de la carcinogénesis, así como de la inestabilidad cromosómica (3). Numerosos estudios informan la presencia de aneuploidías en casi todos los tumores sólidos humanos que se han analizado (2,4). Los recientes trabajos realizados por Duesberg *et al.* (5) están dirigidos a corroborar la anterior teoría y en ellos se establece que la inestabilidad cromosómica de las células tumorales es proporcional al grado de la aneuploidía o del desequilibrio cromosómico (6). Por esta vía, las alteraciones cromosómicas afectan la expresión de genes clave, como son los del control del ciclo celular, de la estabilidad genómica, de la angiogénesis, de la apoptosis y de la reparación, entre muchos otros (4).

Por otra parte, se considera que las alteraciones en el gen *TP53* juegan un papel importante en el desarrollo de diversas neoplasias. El *TP53* es un gen supresor de tumores, localizado en el brazo corto del cromosoma 17p13.1; codifica para una fosfoproteína nuclear de 53 kDa, que actúa como un factor de transcripción e interviene en múltiples funciones celulares, especialmente, en el control del ciclo celular, la apoptosis, la respuesta al daño y la reparación del ADN (7,8); por lo anterior, también se le conoce como “gen guardián del genoma humano”. El gen *TP53* se encuentra alterado en cerca de 50% de todos los cánceres estudiados y se ha observado más frecuentemente alterado en los tumores sólidos que en las leucemias y linfomas (7). Además, el *TP53* se propone como un marcador genético útil para el diagnóstico y el pronóstico de diversos tipos de tumores sólidos (9).

Las mutaciones en el gen *TP53* y las deleciones en la región 17p están entre las alteraciones más

comunes encontradas en tumores sólidos primarios de diferente origen histológico (4,9); ambos tipos de alteraciones inducen a la inestabilidad genómica en las células transformadas. Asimismo, se ha observado que la inactivación o pérdida del gen *TP53* se asocia con un mal pronóstico y estados avanzados del cáncer, así como con la progresión de diversas neoplasias (10), lo cual sugiere que la inactivación de este gen o la deleción de la región 17p tiene una gran importancia en la carcinogénesis, tal como se ha observado en el cáncer de mama, estómago, hígado y colon, y en tumores de cabeza (8,9).

En trabajos previos, encontramos una gran frecuencia de aneuploidías del cromosoma 17 y de deleción del gen *TP53* en tumores gastrointestinales (11); pero, por el contrario, encontramos unas bajas frecuencias de estas mismas alteraciones en neoplasias hematológicas (12).

De otro lado, el desarrollo de la técnica de la hibridación fluorescente *in situ* (*fluorescence in situ hybridization*, FISH) permitió un gran avance en los análisis citogenéticos de tejidos tumorales, puesto que permitió detectar simultáneamente aneuploidías, deleciones, translocaciones y ampliaciones génicas, entre otros reordenamientos cromosómicos, en núcleos interfásicos, sin tener que establecer cultivos celulares (13). Por el contrario, con la citogenética convencional el análisis cromosómico de células tumorales tiene varios inconvenientes, como son el bajo índice mitótico, un bandeado deficiente y la contaminación con microorganismos; lo anterior impide el éxito en los cultivos celulares y en la identificación de las alteraciones cromosómicas (14).

Otra de las grandes ventajas que se tiene con la FISH en la citogenética del cáncer, es la posibilidad de realizar estudios retrospectivos de tejidos embebidos en bloques de parafina o congelados. Por lo anterior, la FISH permite realizar un análisis citogenético molecular rápido, con gran especificidad y sensibilidad en células de tumores sólidos y hematopoyéticos.

En Colombia se han informado pocos estudios sobre la detección de estas alteraciones en tumores sólidos y menos aún empleando la técnica de la FISH-bicolor. El objetivo del presente trabajo fue el de evaluar las aneuploidías del cromosoma 17 y la deleción del *locus* 17p13.1 del gen *TP53*, utilizando la técnica FISH-bicolor, en muestras de individuos con diferentes tipos de tumores sólidos.

Correspondencia:

Carlos Mario Muñeton, Unidad de Genética Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Carrera 51D N° 62-29, Medellín, Colombia

Teléfono: (054) 219 6930; fax: (054) 219 6932

cmuneton@quimbaya.udea.edu.co

Recibido: 17/06/09; aceptado:27/04/10

Materiales y métodos

Pacientes

Se realizó un estudio descriptivo, de tipo prospectivo; se evaluaron 38 muestras provenientes de pacientes con diagnóstico de diversos tipos de neoplasias; las muestras de los tejidos fueron obtenidas por los médicos especialistas, mediante procedimientos de resección quirúrgica o biopsia del tumor primario, practicados en los Servicios de Cirugía y Endoscopia del Hospital Universitario San Vicente de Paúl de Medellín.

Los pacientes no habían recibido quimioterapia ni radioterapia antes de la toma de la muestra. Las muestras provenían de 16 mujeres y 22 hombres procedentes del departamento de Antioquia, con un promedio de edad de 52 años y un rango entre 23 y 78 años.

Un fragmento de cada muestra de tejido tumoral se envió al Laboratorio de la Unidad de Genética Médica, de la Facultad de Medicina, de la Universidad de Antioquia, en donde se practicaron los estudios de FISH; mientras que otro fragmento de la misma muestra del tejido se envió al Departamento de Patología de la Universidad de Antioquia, en donde se hizo el estudio histopatológico. El resultado de este estudio se obtuvo luego de la revisión de la historia clínica de cada paciente, con el fin de corroborar el diagnóstico de las neoplasias de las muestras evaluadas. También se obtuvo información adicional como: edad, sexo, procedencia y antecedentes familiares.

Como control se incluyeron cinco muestras de sangre periférica pertenecientes a cinco individuos sanos sin antecedentes de cáncer.

Consideraciones éticas

Este trabajo fue producto de un proyecto de investigación aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Antioquia. Cada paciente participó voluntariamente en el estudio y se obtuvo su consentimiento informado escrito antes de ingresar al estudio.

Procesamiento de las muestras para obtener núcleos interfásicos

Las muestras de los tumores sólidos y de los controles se procesaron para obtener núcleos interfásicos. Los tejidos tumorales fueron recolectados y transportados en un frasco plástico con medio de transporte (RPMI-1640 Sigma; con suplemento de antibióticos y antimicóticos); los tejidos se lavaron dos veces con

PBS, luego se cortaron finamente y se disociaron enzimáticamente con colagenasa de tipo I (Sigma) al 0,2% y se incubaron a 37°C entre 1 y 16 horas.

Posteriormente, se centrifugaron a 800 rpm por 10 minutos; el botón celular se resuspendió en una solución hipotónica de KCl al 0,075 M y se incubó a 37°C por 15 minutos. Luego, la suspensión celular se fijó con metanol/ácido acético frío (3:1 volumen/volumen) y se hicieron tres lavados consecutivos.

Finalmente, para cada muestra la suspensión celular se goteó sobre tres portaobjetos como mínimo. Las placas con los extendidos de núcleos interfásicos se almacenaron en un congelador a -20°C, hasta el momento de realizar la técnica de la FISH-bicolor.

Para el grupo control, a cada individuo se le tomó una muestra de 5 ml de sangre periférica en un tubo con heparina. Posteriormente, los tubos se centrifugaron y el botón celular obtenido se resuspendió en KCl al 0,075 M; los núcleos interfásicos de estas muestras se obtuvieron siguiendo el mismo procedimiento que se mencionó anteriormente; finalmente, se gotearon cinco láminas portaobjetos por cada muestra.

FISH bicolor

La hibridación fluorescente *in situ* se realizó sobre las láminas de vidrio con núcleos interfásicos obtenidos de las muestras tumorales y de las muestras control, utilizando sondas marcadas directamente con diferentes fluorocromos para el centrómero del cromosoma 17 (CEP 17; señal verde; VYSIS) y para el locus específico del gen *TP53* (LSI 17p13.1; señal naranja; VYSIS).

La hibridación y detección de las señales de fluorescencia se hicieron siguiendo las instrucciones y recomendaciones del proveedor comercial (Vysis-Abbott). Las placas con núcleos interfásicos se desnaturalizaron en formamida al 70% a 73°C por 5 minutos. Después, las placas se deshidrataron en una serie de etanoles fríos a 70%, 85% y 100%. En cada placa se adicionaron 10 µl de cada una de las sondas CEP 17 y LSI *TP53* en el área de hibridación previamente seleccionada, sobre la cual se puso un cubreobjetos de 22 mm x 22 mm; la hibridación se llevó a cabo dentro de una cámara húmeda en incubación a 37°C por 16 horas. Luego, se hicieron dos lavados posteriores a la hibridación.

Finalmente, las placas con núcleos interfásicos se colorearon con DAPI. Las señales de fluorescencia

se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Axyoskop 2 plus Zeiss, Alemania) dotado con un filtro triple simultáneo (DAPI/ORANGE/GREEN) y con una cámara CCD AxioCam MRc (Zeiss). Un profesional capacitado en la técnica de FISH fue el encargado de realizar el análisis y conteo de los núcleos con señales de hibridación en un total de 100 núcleos interfásicos por caso.

La distribución de las señales observadas en las muestras analizadas se registró en tablas como aparece en el cuadro 1. Los núcleos superpuestos o con señales de hibridación difusas se excluyeron del análisis. Para la interpretación de los resultados de las señales de fluorescencia se establece que, en los casos normales (controles), el patrón de hibridación es de dos señales de color verde (cromosoma 17) y dos señales de color naranja (locus 17p13.1 del gen *TP53*), para un total de cuatro señales de hibridación (2V2N).

Análisis de la FISH bicolor

Inicialmente se hicieron análisis de las muestras de control (sangre periférica y tejido normal) (no se muestran los datos) en 1.000 núcleos interfásicos, se estimó el número promedio de núcleos con señales de hibridación para el cromosoma 17 y para el gen *TP53*.

De acuerdo con los anteriores resultados, se establecieron los siguientes puntos de corte para el análisis de la FISH bicolor: para aneuploidía, más de 9% de los núcleos con un número menor o mayor de dos señales de hibridación para el centrómero del cromosoma 17, es decir que la muestra se consideró normal (disómica) con un porcentaje mayor o igual a 91% de los núcleos con dos señales para el centrómero del cromosoma 17, mientras que, para la nulisomía, la monosomía y la trisomía, el punto de corte fue del 1%, 7% y 4%, respectivamente. No se observó tetrasomía en los núcleos normales; por lo tanto, se definió arbitrariamente un porcentaje menor de 1% como punto de corte.

En todos los casos, los puntos de corte se calcularon con dos desviaciones estándar. En los casos en que se detectaron subpoblaciones de núcleos con clones heterogéneos (mosómicos/disómicos/trisómicos/tetrasómicos) en el mismo tejido, el resultado final se estableció con base en el clon mayor, es decir, el que presentó el mayor porcentaje.

Por otro lado, la delección en el *locus* 17p.13.1 del gen *TP53* se determinó dividiendo el total

del número observado de señales de hibridación del gen, por el total del número de señales del centrómero del cromosoma 17 (total de señales LSI *TP53*/total de señales CEP 17). De acuerdo con los cálculos previos realizados en las muestras de control, se definió que una muestra tenía delección del gen *TP53* cuando se obtenía un valor de 0,94 o menor. Este punto de corte se calculó con base en dos desviaciones estándar.

Resultados

En el cuadro 1 se presenta la información general de las 38 muestras procedentes de individuos con diferentes tipos de tumores sólidos; se incluye la edad, el sexo, la localización del tumor primario, el diagnóstico histopatológico y los resultados obtenidos con la FISH bicolor en núcleos interfásicos.

De las 38 muestras de tumores sólidos evaluados, se encontró que 14 (37%) procedían de individuos menores de 40 años edad. De esta población sobresalen cuatro pacientes jóvenes entre los 23 y 25 años (casos 7, 15, 16 y 36) con tumores malignos.

El estudio histopatológico mostró que la mayoría de las muestras de los tumores sólidos analizadas (31/38) eran malignos y, además, se encontró una amplia variedad histopatológica en las muestras. Entre los tumores malignos, los más predominantes fueron los adenocarcinomas (12/38).

En este estudio se encontró que 63% (24/38) de los tumores sólidos estudiados tenían aneuploidías del cromosoma 17, mientras que 37% (14/38) eran normales para el número de copias del cromosoma 17. La monosomía fue la aneuploidía más frecuente (75%; 18/24), seguida de la trisomía, que se detectó en 17% (4/24). Se observaron pocos casos con nulisomía y tetrasomía (4%) (figura 1).

En el grupo de los casos se obtuvo un promedio de 80% para las dos copias del cromosoma 17; este valor fue muy inferior al promedio obtenido (95%) en el grupo control. En la mayoría de las muestras analizadas con la FISH bicolor, se detectó la presencia simultánea de subpoblaciones de núcleos con clones heterogéneos: disómicos, monosómicos, trisómicos y, en menor proporción, tetrasómicos (cuadro 1).

De todas las muestras examinadas, el caso 5 (sarcoma de tejidos blandos) fue el que mostró el porcentaje más bajo (5%) de núcleos con dos señales de hibridación para el cromosoma 17 y, a su vez,

Cuadro 1. Información de la edad, sexo, diagnóstico histopatológico y resultado de la FISH bicolor en las 38 muestras de tumores sólidos evaluados.

Caso	Sexo/ edad	Diagnóstico histopatológico	Número de señales								Delección (TP53/Cr17) ≤ 0,94		
			Cromosoma 17(%)					GEN TP53 (%)					
			0	1	2	3	4	0	1	2	3	≥4	
1	F/55	Meningioma	0	14	86	0	0	6	13	81	0	0	0,94
2	F/65	Carcinoma de tiroides	5	3	64	26	2	4	16	54	24	2	0,94
3	M/60	Adenocarcinoma de estómago	0	25	66	8	1	11	53	36	0	0	0,68
4	M/33	Linfoma de Hodgkin	14	30	56	0	0	19	38	41	2	0	0,89
5	M/35	Sarcoma de tejidos blandos	2	93	5	0	0	34	62	4	0	0	0,68
6	M/54	Adenocarcinoma de colon	0	5	91	3	1	3	15	80	1	1	0,89
7	M/25	Meduloblastoma	0	21	79	0	0	0	39	56	5	0	0,93
8	F/47	Adenoma de tiroides	0	5	79	16	0	7	22	69	2	0	0,79
9	M/56	Carcinoma renal	0	14	86	0	0	8	32	60	0	0	0,82
10	F/77	Carcinoma en peritoneo	0	4	96	0	0	3	27	70	0	0	0,85
11	F/48	Carcinoma de cuello uterino	0	2	98	0	0	2	3	95	0	0	0,98
12	M/59	Carcinoma de lengua	0	13	85	3	0	7	38	55	0	0	0,77
13	F/69	Adenocarcinoma de estómago	0	8	89	3	0	6	27	66	1	0	0,83
14	F/50	Sarcoma de tejidos blandos	0	6	70	17	7	21	26	48	5	0	0,60
15	F/23	Poliposis adenomatosa de colon	0	10	89	1	0	12	44	44	0	0	0,69
16	F/24	Astrocitoma cervical	0	0	57	22	21	0	23	69	3	5	0,68
17	M/39	Adenocarcinoma de recto	0	13	85	2	0	0	32	68	0	0	0,89
18	F/42	Mioepitelioma de parótida	0	2	98	0	0	0	7	93	0	0	0,98
19	M/66	Carcinoma de mandíbula	0	10	90	0	0	0	48	52	0	0	0,80
20	F/73	Carcinoma broncogénico	7	3	89	1	0	9	32	58	1	0	0,82
21	M/57	Carcinoma broncogénico	5	19	69	7	0	10	59	31	0	0	0,68
22	F/46	Liposarcoma de tejidos blandos	0	30	58	8	4	14	48	38	0	0	0,67
23	M/51	Carcinoma renal	0	9	90	1	0	11	25	64	0	0	0,80
24	F/48	Carcinoma papilar de tiroides	1	19	79	1	0	6	34	60	0	0	0,86
25	M/70	Adenocarcinoma de colon	0	27	61	2	10	9	53	28	2	8	0,74
26	F/29	Adenocarcinoma papilar de tiroides	0	28	71	1	0	0	67	33	0	0	0,77
27	F/76	Adenocarcinoma de duodeno	0	8	92	0	0	6	45	49	0	0	0,75
28	F/58	Carcinoma de mama	2	16	78	4	0	7	27	62	3	1	0,89
29	M/45	Carcinoma de laringe	0	7	93	0	0	0	17	83	0	0	0,95
30	M/57	Carcinoma de cavidad oral	0	0	14	11	75	5	30	39	16	10	0,54
31	F/57	Adenocarcinoma de estómago	0	1	98	0	1	23	3	73	0	1	0,75
32	M/67	Tumor fusocelular de estómago	0	0	98	1	1	53	3	43	0	1	0,46
33	F/68	Adenocarcinoma de estómago	0	8	92	0	0	8	23	69	0	0	0,84
34	M/75	Adenocarcinoma de esófago	0	6	94	0	0	78	8	14	0	0	0,19
35	M/72	Carcinoma de esófago	0	1	99	0	0	55	5	40	0	0	0,43
36	F/23	Adenocarcinoma de colon	0	1	99	0	0	16	10	74	0	0	0,79
37	M/63	Lipoma de colon	0	1	95	2	2	0	0	93	5	2	1,02
38	M/78	Adenocarcinoma de colon	0	6	93	1	0	4	71	25	0	0	0,62
Promedio de casos			0,95	12,1	80	3,7	3,2	12,0	29,5	55,6	1,8	0,8	0,77
Promedio de controles			0,2	3,4	95,0	1,4	0	1,6	6,6	89,6	2,2	0	0,97

presentó el mayor porcentaje de núcleos con una señal para el cromosoma 17 (93%; monosomía).

Otro resultado llamativo fue el del caso 30 (carcinoma de la cavidad oral), que mostró 75% de los núcleos interfásicos con cuatro señales de hibridación para el cromosoma 17 (tetrasómicos) (figura 1). Un resultado similar al anterior se observó en el caso 16 (astrocitoma cervical), el cual presentó un gran porcentaje de núcleos polisómicos; así, 22% de los núcleos tenían tres señales de hibridación (trisómicos), mientras que 21% de los núcleos tenían cuatro señales (tetrasómicos).

En el caso. 4 (linfoma de Hodgkin) se observó el mayor porcentaje (14%) de núcleos con pérdida de los dos cromosomas 17 (nulismía); igualmente,

tenía un gran porcentaje (30%) de núcleos con una señal de hibridación (monosómicos).

El caso 2 (carcinoma de tiroides) presentó el mayor porcentaje (26%) de núcleos con tres señales de hibridación para el cromosoma 17 (trisómicos).

Por otra parte, se encontró delección del gen *TP53* en 89,5% (34/38) de los tumores sólidos examinados (figura 1). Sólo cuatro casos (10,5%) no presentaron delección del gen *TP53*.

En el grupo de los casos se obtuvo un promedio de 55,6% para las dos copias del gen *TP53*, mientras que en el grupo control, el valor promedio fue de 89,6%. Estos valores presentan una diferencia muy importante. De acuerdo con la relación entre

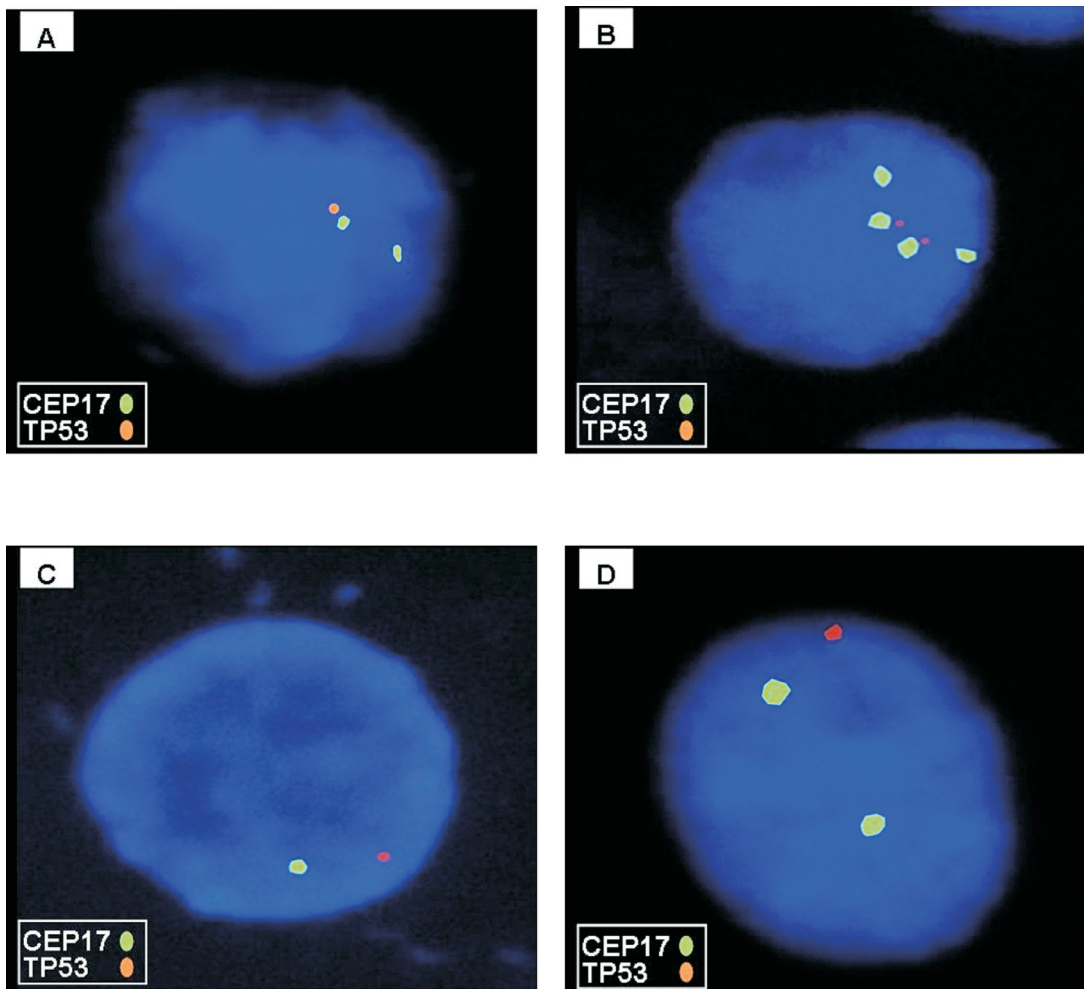


Figura 1. Imágenes de la FISH bicolor mediante sondas CEP17 para el cromosoma 17 (color verde) y LSIp53 para el locus 17p.13.1 del gen *TP53* (color naranja) en núcleos interfásicos. Al final de la descripción de cada numeral se informa el resultado de la FISH, siguiendo las recomendaciones del ISCN (*An Internacional System for Human Cytogenetic Nomenclature*) (2009). **A.** Carcinoma de laringe, núcleo con dos señales de hibridación para el cromosoma 17 y una señal para el gen *TP53* (delección); nuc ish(D1721x2, *TP53*x1). **B.** Carcinoma de la cavidad oral, núcleo con cuatro señales para el cromosoma 17 (tetrasomía) y dos señales para el gen *TP53*; nuc ish(D1721x4, *TP53*x2). **C.** Adenocarcinoma gástrico, núcleo con una señal para el cromosoma 17 (monosomía) y una señal para el gen *TP53* (delección); nuc ish(D1721, *TP53*x1). **D.** Poliposis adenomatosa de colon, núcleo con dos señales para el cromosoma 17 y una señal para el gen *TP53* (delección); nuc ish(D1721x2, *TP53*x1).

el número total de señales para el gen *TP53* y el número total de señales del cromosoma 17 para definir la delección, se encontró en el grupo de los casos un valor promedio de 0,77 mientras que en el grupo control fue de 0,97.

Estos resultados presentan una diferencia relevante. El caso 34 presentó el valor más bajo para la delección (0,19), seguido del caso 35 (0,43); ambos eran carcinomas de esófago. Por el contrario, el caso 37 (lipoma de colon) mostró el mayor valor para esta relación (1,02). Similar a lo encontrado para las aneuploidías del cromosoma 17, en el análisis de la FISH bicolor para el gen

TP53, se detectaron diferentes subpoblaciones de núcleos con clones heterogéneos.

Nuevamente, el caso 5 presentó un porcentaje muy bajo (4%) de núcleos con dos copias para el gen *TP53* y, a su vez, tenía un alto porcentaje (62%) de núcleos con pérdida de una copia del gen *TP53* (delección monoalélica), así como 34% de los núcleos con pérdida de las dos copia del gen *TP53* (delección bialélica). El caso 26 (adenocarcinoma de tiroides) mostró el mayor porcentaje (67%) de núcleos con una señal de hibridación para el gen *TP53*, mientras que el caso 34 presentó el mayor porcentaje (78%) de núcleos con pérdida de las

dos copias del gen *TP53*. Por otro lado, el caso 2 presentó el mayor porcentaje (24%) de núcleos con tres señales de hibridación.

En este trabajo se encontró que la mayoría de las muestras de los tumores sólidos (30/38) tenían subpoblaciones de núcleos con pérdida de las dos copias del gen *TP53*. Se resalta que cinco casos (31, 32, 34, 35 y 36) presentaron altos porcentajes de núcleos con pérdida de las dos copias del gen *TP53* (con un rango entre 16% y 78%). Dichas muestras correspondían a dos casos de cáncer de estómago, dos de esófago y uno de colon (paciente de 23 años). Sólo en ocho casos se observaron tres o cuatro señales de hibridación para el gen *TP53*. En general, el análisis de la FISH bicolor para la región 17p13.1, reveló que la pérdida de una copia del gen *TP53* fue lo predominante en la mayoría de los casos (figura 1).

Todos los casos que presentaron monosomía del cromosoma 17, también presentaron una sola copia del gen *TP53*. Por otra parte, de los 14 casos que tenían dos copias del cromosoma 17 (sin aneuploidías), 10 mostraron delección del gen *TP53*. Por lo tanto, de las 38 muestras de tumores sólidos analizadas, sólo cuatro casos (10,5%) (11, 18, 29 y 37) fueron normales para el número de copias del cromosoma 17 y del gen *TP53*. Estos casos correspondieron a dos tumores benignos y dos carcinomas.

Por otro lado, 15 de las 38 muestras de tumores sólidos eran del sistema gastrointestinal (esófago, estómago, colon, recto y duodeno). Un análisis independiente de este grupo de tumores mostró que el porcentaje de aneuploidía del cromosoma 17 fue de 33,3% (5/15) y de 93,3% (14/15) para la delección del gen *TP53* (figura 1).

Discusión

La detección de alteraciones cromosómicas en los tumores sólidos mediante la técnica de FISH, se ha venido haciendo de forma intensa desde la última década, hasta el punto de convertirse en una técnica de rutina para el análisis citogenético del cáncer.

El estudio citogenético con FISH, similar a lo que ocurre con la citogenética convencional, presenta algunas dificultades técnicas, como la deficiente disociación celular que se tiene en algunos tumores sólidos, debido a la cantidad de tejido conjuntivo y adiposo; otros tumores, como los del sistema gastrointestinal, por su consistencia o viscosidad, se consideran dificultosos para el procesamiento y

obtención de núcleos interfásicos. Por esta razón, los núcleos no quedan expuestos y las sondas no se unen a la secuencia complementaria (2,13).

En este estudio, de acuerdo con el diagnóstico histopatológico, es importante resaltar que la mayoría de los tumores examinados fueron malignos. Asimismo, llama la atención que, al momento del estudio, el 37% de las muestras procedían de individuos menores de 40 años (especialmente, cuatro casos entre 23 y 25 años, todos con tumores malignos); en estos individuos podría suponerse que tendrían un mal pronóstico de la enfermedad. Este tipo de estudios podrían ser útiles en la epidemiología del cáncer en nuestras regiones, con el propósito de identificar factores de exposición ambiental asociados con el cáncer.

En este estudio se encontró una alta frecuencia (63%) de aneuploidías del cromosoma 17 en los diversos tumores sólidos, lo que concuerda con lo publicado en otros trabajos similares realizados con FISH (11,15-18). Sin embargo, debe mencionarse que los estudios muestran una amplia escala de porcentajes de aneuploidías para el cromosoma 17 (entre 10% y 80%). La aneuploidía del cromosoma 17 es muy frecuente en diversos tumores sólidos, tales como mama, sistema gastrointestinal, vejiga, próstata, riñón, cabeza y cuello (2,4,19,20). Estos hallazgos sugieren que esta alteración cromosómica numérica es clave en el origen de diferentes neoplasias.

En este trabajo, la monosomía fue la aneuploidía más frecuente (75%), mientras que la trisomía se presentó con menor frecuencia (17%). Estos resultados están dentro del rango de porcentajes informados en la literatura (18,21,22). Galluci *et al.* (23) y Gotte *et al.* (24) encontraron frecuencias de monosomía de 37,5% y 27%, respectivamente. Varios trabajos muestran que la pérdida del cromosoma 17 ocurre en las primeras etapas del desarrollo del tumor (17,18,20,22). Lo anterior ha permitido sugerir que la monosomía del cromosoma 17 es una alteración común en los tumores sólidos y que podría considerarse como un marcador cromosómico recurrente.

Por otro lado, en el grupo de tumores sólidos del aparato gastrointestinal se encontró una menor frecuencia de aneuploidía del cromosoma 17 (33,3%). Este porcentaje contrasta con el obtenido en todas las muestras evaluadas (63%), lo cual podría explicarse por el tamaño de la muestra. Sin embargo, es similar al encontrado por Risio *et al.* (25) en 20 muestras de carcinomas colorrectales,

mientras que Gomyo *et al.* (26) y Fringes *et al.* (20), en muestras de tumores gástricos, encontraron una alta frecuencia de trisomía del cromosoma 17. De esta manera, en la literatura se describen dos patrones de alteraciones cromosómicas (uno monosómico y otro trisómico) en tumores gastrointestinales. Estos trabajos también correlacionan la pérdida del cromosoma 17 con tumores malignos, similar a lo observado en los carcinomas de colon (15,16,26).

En resumen, nuestros resultados muestran que la monosomía del cromosoma 17 fue la alteración numérica más frecuente en todas las muestras de tumores analizadas.

En la década de 1900, Boveri (27) propuso la teoría de la aneuploidía como causa del cáncer y de la inestabilidad cromosómica. Dicha teoría ha sido corroborada en numerosos estudios citogenéticos de tumores sólidos. Los recientes trabajos de Duesberg *et al.* (28,29) reevalúan los postulados de Boveri, utilizando modelos *in vitro* con células transformadas, en los que se ratifica que el cáncer se origina por aneuploidías (pérdida o ganancia de cromosomas) y que la inestabilidad cromosómica es proporcional al grado de la aneuploidía y al número de cromosomas afectados (6,29). En conclusión, Duesberg confirma que las alteraciones cromosómicas juegan un papel fundamental en la iniciación y progresión del cáncer, y que, además, los cromosomas de las células cancerosas son inestables por causa de la aneuploidía.

La aneuploidía y la inestabilidad cromosómica afectan la expresión de diferentes genes responsables de la segregación cromosómica, control del ciclo celular, proliferación, síntesis y reparación del ADN (3,4,30-32). Debe anotarse que en el cromosoma 17 se localizan genes importantes implicados en múltiples mecanismos biológicos, como son protooncogenes, genes supresores de tumores, factores de crecimiento, receptores de hormonas, genes de reparación y de estabilidad genómica, entre muchos otros (1,2,4,7,8). Entre los genes que se encuentran en el cromosoma 17, están el *ERBB2*, *BRCA1*, *EGFR*, *NME1*, *THRA*, *HER2/neu*, *TP53*, *TOP2A* y *NF1* (1,7,9,17,33).

El caso 28 (carcinoma de mama) es interesante porque presentó monosomía del cromosoma 17, considerada una alteración cromosómica común durante el desarrollo de esta neoplasia (17,34). Es bien conocido que los genes *BRCA1*, *HER2/neu* y el *TP53* están asociados con la génesis del cáncer de mama (1,7,9,32). En este caso se

podría establecer una correlación entre la pérdida de estos genes y el desarrollo del tumor.

En conclusión, la aneuploidía del cromosoma 17 afecta notablemente la expresión de múltiples genes, estableciéndose una vía molecular relacionada con el origen de diversos tumores, como se ha observado en el de mama, colorrectal, ovario, vejiga, cabeza y cuello (4,8,9,10,20,22,26).

Por otra parte, en este estudio se demostró que 89,5% de los tumores sólidos examinados tenía delección del gen *TP53*. Este porcentaje es muy alto comparado con los publicados por otros autores en diferentes tumores sólidos (25,35-38); sin embargo, está dentro del rango informado y concuerda con lo descrito en la literatura en lo referente a que este gen se encuentra alterado en cerca de 50% de todos los cánceres en humanos (7,9,10,16,22).

Nuestros hallazgos demuestran que la delección del gen *TP53* fue predominante en muestras de tumores malignos. Los resultados también corroboran lo informado en cuanto a que la delección del locus 17p.13.1 ocurre con mayor frecuencia en carcinomas, especialmente en los colorrectales (25,26,35). Además, la delección se asocia con un mal pronóstico y con una respuesta ineficiente al tratamiento con ciertos medicamentos antineoplásicos (9,10,39). Por lo tanto, la delección del gen *TP53* se considera como una alteración de graves consecuencias para la célula, dada las múltiples funciones biológicas en que está involucrado este gen, específicamente en las del control del ciclo celular, reparación, apoptosis y estabilidad genómica. También se sugiere que la delección del *TP53* juega un papel clave durante la transición de una neoplasia benigna hacia una maligna. No obstante, la utilidad clínica de la delección del gen *TP53* en algunos tumores aún no está bien definida.

En el grupo de tumores del aparato gastrointestinal, la delección del gen *TP53* también presentó una gran frecuencia (93,3%), similar a la encontrada en todos los tumores sólidos evaluados. Esta frecuencia informada es notablemente mayor a las publicadas por Fahmy *et al.* (40) (40%), Gomyo *et al.* (26) (77%) y Risio *et al.* (25) (60%). De estos estudios se sugiere que la delección del gen *TP53* es una alteración muy frecuente en la carcinogénesis gástrica y colorrectal.

En este estudio se observó una correlación entre la monosomía del cromosoma 17 y la pérdida de una copia del gen *TP53*. Se ha observado en los

casos que presentan delección del *TP53* en uno de los dos cromosomas (delección monoalélica) que, con frecuencia, se presentan mutaciones en el gen *TP53* del cromosoma homólogo, lo que conduce a la inactivación del gen (7,8,26,35,37). Por tal razón, la monosomía de cromosoma 17 o la delección del locus 17p13.1 originarían un estado de "haploinsuficiencia" del gen *TP53* (7,8), mientras que, en las muestras que no tienen aneuploidías pero sí la pérdida de las dos copias de gen *TP53* (delección bialélica), no habría expresión del gen. Lo anterior podría explicarse por la teoría de los dos golpes propuesta por Knudson (41).

Por otro lado, en los casos normales de este estudio no podrían descartarse mutaciones en un sólo alelo o en los dos alelos del *TP53*, puesto que la FISH no detecta mutaciones puntuales. La delección del *TP53* no sólo conduce a la pérdida del control del ciclo celular, sino también, a la acumulación de otros tipos de alteraciones genéticas en las células neoplásicas.

En este estudio realizado con la técnica FISH en núcleos interfásicos, se demostró la presencia de diferentes patrones de señales de hibridación en un mismo tejido. Es decir, se detectaron clones con subpoblaciones de núcleos heterogéneos: monosómicos, disómicos, trisómicos y, en menor frecuencia, tetrasómicos. Estos hallazgos concuerdan con los publicados previamente en la literatura (16,25,26,35). Lo anterior podría explicarse porque en algunas ocasiones las muestras también tumorales incluyen tejido normal o por la heterogeneidad genética intratumoral que caracteriza al tejido neoplásico durante la carcinogénesis (32,42,43). Este mecanismo y la expansión clonal se originan por la inestabilidad cromosómica y por mutaciones en diversos genes como el *TP53* (44,45). La heterogeneidad genética se ha evidenciado ampliamente en la mayoría de tumores sólidos y se relaciona con el fenotipo tumoral, la metástasis y la resistencia a determinados medicamentos antineoplásicos. (32,42,46). Por lo tanto, otra de las ventajas que se tienen con la FISH es que permite evaluar la heterogeneidad genética en núcleos individuales, lo que no es posible con otras técnicas moleculares.

Por último, en las cuatro muestras con resultados normales para el número de copias del cromosoma 17 y del gen *TP53*, no se podría excluir la presencia de otro tipo de alteraciones (cromosómicas o génicas) no evaluadas. Muchos de los tumores sólidos evaluados también se asocian con

anomalías en los cromosomas 1, 5, 7, 8, 9, 13 y 18, entre otros, así como con mutaciones en los genes *p21*, *p16*, *RB*, *K-RAS*, *PTEN*, *MLH1*, *DCC*, *APC* y *C-MYC* (1,2,4,47-49). Por tal razón, se necesitan futuras investigaciones que empleen simultáneamente diversas técnicas moleculares, como también, otras técnicas variantes de la FISH, como la SKY-FISH o el CGH-array, para evaluar todos los cromosomas de las células tumorales.

El presente trabajo es el primero en nuestro medio que informa los hallazgos de aneuploidías del cromosoma 17 y delección del gen *TP53* en una variedad de tumores sólidos primarios, empleando la técnica de la FISH bicolor. Los resultados obtenidos aportan información básica sobre la genética de los tumores sólidos; sin embargo, es necesario realizar otros estudios con el propósito de corroborar los resultados informados. Asimismo, es importante ejecutar estudios de epidemiología genética para identificar factores de exposición ambiental a los que está sometida la población colombiana y su relación con la aparición del cáncer.

En conclusión, este estudio confirma que la delección del gen *TP53* y la aneuploidía del cromosoma 17 son alteraciones citogenéticas frecuentes en los tumores sólidos de pacientes colombianos.

Agradecimientos

Agradecemos la participación de los pacientes en este estudio. A los cirujanos, enfermeras y jefes de los Departamentos de Cirugía y Patología de la Universidad de Antioquia y del Hospital Universitario San Vicente de Paúl de Medellín por su valiosa colaboración. A Enoc Ahumada Rodríguez, por su asesoría en los diagnósticos histopatológicos.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos que no existe conflicto de intereses.

Financiación

Este trabajo fue financiado por la Universidad de Antioquia, proyecto CPT-0118.

Referencias

1. **Croce CM.** Oncogenes and cancer. *N Engl J Med.* 2008;358:502-11.
2. **Albertson DG, Collins C, McCormick F, Gray JW.** Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet.* 2003;34:369-76.
3. **Weaver BA, Cleveland DW.** Does aneuploidy cause cancer? *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18:658-67.

4. **Fröhling S, Döhner H.** Chromosomal abnormalities in cancer. *N Engl J Med.* 2008;359:722-34.
5. **Duesberg P, Li R, Fabarius A, Hehlmann R.** Aneuploidy and cancer: from correlation to causation. *Contrib Microbiol.* 2006;13:16-44.
6. **Duesberg P, Rausch C, Rasnick D, Hehlmann R.** Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:13692-7.
7. **Strano S, Dell'Orso S, Di Agostino S, Fontemaggi G, Sacchi A, Blandino G.** Mutant p53: an oncogenic transcription factor. *Oncogene.* 2007;26:2212-9.
8. **Herrera JC, Vásquez G, Ramírez JL, Muñetón CM.** Papel del gen TP53 en la oncogénesis. *Salud UIS.* 2004;26:88-99.
9. **Petitjean A, Marcel V, Pétré A, Mounawar M, Plymoth A, de Fromentel CC, et al.** Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. *Cancer Gene Ther.* 2009;16:1-12.
10. **Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M.** TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene.* 2007;26:2157-65.
11. **Ramírez GC, Herrera JC, Muñetón CM, Márquez JR, Isaza LF.** Análisis de las aneuploidías del cromosoma 17 y delección del gen TP53 en tumores gastrointestinales por FISH-bicolor. *Rev Col Gastroenterol.* 2008;23:333-42.
12. **Herrera JC, Ramírez GC, Muñetón CM.** Estudio de las aneuploidías del cromosoma 17 y la delección del gen TP53 en neoplasias hematológicas, por la técnica del FISH-bicolor. *Iatreia.* 2008;21:364-74.
13. **Levsky JM, Singer RH.** Fluorescence *in situ* hybridization: past, present and future. *J Cell Sci.* 2003;116:2833-8.
14. **James L, Varley J.** Advances in cytogenetic analysis of solid tumours. *Chromosome Res.* 1996;4:479-85.
15. **Rao PH, Mathew S, Lauwers G, Rodríguez E, Kelsen DP, Chaganti RS.** Interphase cytogenetics of gastric and esophageal adenocarcinomas. *Diagn Mol Pathol.* 1993;2:264-8.
16. **Kawai T, Hiroi S, Nakanishi K, Sakurai Y, Torikata C.** Abnormalities in chromosome 17 and p53 in lung carcinoma cells detected by fluorescence *in situ* hybridization. *Pathol Int.* 2004;54:413-9.
17. **Watters AD, Going JJ, Cooke TG, Bartlett JM.** Chromosome 17 aneusomy is associated with poor prognostic factors in invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 2003;77:109-14.
18. **Frau DV, Lai ML, Caria P, Dettori T, Coni P, Faa G, et al.** Trisomy 17 as a marker for a subset of noninvasive thyroid nodules with focal features of papillary carcinoma: cytogenetic and molecular analysis of 62 cases and correlation with histological findings. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:177-81.
19. **Bergamo NA, da Silva Veiga LC, dos Reis PP, Nishimoto IN, Magrin J, Kowalski LP, et al.** Classic and molecular cytogenetic analyses reveal chromosomal gains and losses correlated with survival in head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2005;11:621-31.
20. **Fringes B, Mayhew TM, Reith A, Gates J, Ward DC.** Numerical aberrations of chromosomes 1 and 17 correlate with tumor site in human gastric carcinoma of the diffuse and intestinal types. Fluorescence *in situ* hybridization analysis on gastric biopsies. *Lab Invest.* 2000;80:1501-8.
21. **Hes O, Síma R, Nemcová J, Hora M, Bulimbasic S, Kazakov DV, et al.** End-stage kidney disease: gains of chromosomes 7 and 17 and loss of Y chromosome in non-neoplastic tissue. *Virchows Arch.* 2008;453:313-9.
22. **Hardisson D, Álvarez-Marcos C, Salas-Bustamante A, Alonso-Guervós M, Sastre N, Sampedro A.** Numerical aberrations of chromosomes 8, 9, 11, and 17 in squamous cell carcinoma of the pharynx and larynx: a fluorescence *in situ* hybridization and DNA flow cytometric analysis of 50 cases. *Oral Oncol.* 2004;40:409-17.
23. **Gallucci M, Guadagni F, Marzano R, Leonardo C, Merola R, Sentinelli S, et al.** Status of the p53, p16, RB1 and HER-2 genes and chromosomes 3, 7, 9, and 17 in advanced bladder cancer: correlation with adjacent mucosa and pathological parameters. *J Clin Pathol.* 2005;58:367-71.
24. **Gotte K, Schafer C, Riedel F, Arens N, Hormann K.** Intratumoral genomic heterogeneity in primary head and neck cancer and corresponding metastases detected by dual-FISH. *Oncol Rep.* 2004;11:17-23.
25. **Risio M, Casorzo L, Chiecchio L, De Rosaa G, Rossini F.** Deletions of 17p are associated with transition from early to advanced colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2003;147:44-9.
26. **Gomyo Y, Osaki M, Kaibara N, Ito H.** Numerical aberrations and point mutation of p53 gene in human gastric intestinal metaplasia and well-differentiated adenocarcinoma: analysis by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and PCR-SSCP. *Int J Cancer.* 1996;66:594-9.
27. **Boveri T.** Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Jena: Gustav Fischer, Jena; 1914. p. 1-64.
28. **Duesberg P, Li R, Rasnick D, Rausch C, Willer A, Kraemer A, et al.** Aneuploidy precedes and segregates with chemical carcinogenesis. *Cancer Genet Cytogenet.* 2000;119:83-93.
29. **Li L, McCormack AA, Nicholson JM, Fabarius A, Hehlmann R, Sachs RK, et al.** Cancer-causing karyotypes: chromosomal equilibria between stabilizing aneuploidy and stabilizing selection for oncogenic function. *Cancer Genet Cytogenet.* 2009;188:1-25.
30. **Kops GJ, Weaver BA, Cleveland DW.** On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer.* 2005;5:773-85.
31. **Michor F.** Chromosomal instability and human cancer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2005;360:631-5.
32. **Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B.** Genetic instability in colorectal cancers. *Nature.* 1997;386:623-7.
33. **Liang Z, Zeng X, Gao J, Wu S, Wang P, Shi X, et al.** Analysis of EGFR, HER, and TOP2A gene status and chromosomal polysomy in gastric adenocarcinoma from Chinese patients. *BMC Cancer.* 2008;8:363-72.
34. **Reinholz MM, Bruzek AK, Visscher DW, Lingle WL, Schroeder MJ, Pérez EA, et al.** Breast cancer and aneusomy 17: implications for carcinogenesis and therapeutic response. *Lancet Oncol.* 2009;10:267-77.
35. **Takahasi Y, Nagata T, Asai S, Shintaku K, Eguchi T, Ishi Y, et al.** Detection aberrations on 17p and gene in

- gastrointestinal cancers by dual (two-color) fluorescence *in situ* hybridization and GeneChip *p53* assay. *Cancer Genet Cytogenet.* 2000;121:38-43.
36. **Pfister S, Remke M, Benner A, Mendrzyk F, Toedt G, Felsberg J.** Outcome prediction in pediatric medulloblastoma based on DNA copy-number aberrations of chromosomes 6q and 17q and the *MYC* and *MYCN* loci. *J Clin Oncol.* 2009;27:1627-36.
37. **Cesar AC, Borim AA, Caetano A, Cury PM, Silva AE.** Aneuploidies, deletion, and overexpression of *TP53* gene in intestinal metaplasia of patients without gastric cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004;153:127-32.
38. **Veiga L, Bérnago N, Kowalski L, Rogatto S.** Classical and molecular cytogenetic analysis in head and neck squamous cell carcinomas. *Genet Mol Biol.* 2003;26:121-8.
39. **Nahi H, Lehmann S, Bengtzen S, Jansson M, Möllgård L, Paul C, et al.** Chromosomal aberrations in 17p predict *in vitro* drug resistance and short overall survival in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2008;49:508-16.
40. **Fahmy M, Skacel M, Gramlich TL, Brainard JA, Rice TW, Goldblum JR, et al.** Chromosomal gains and genomic loss of *p53* and *p16* genes in Barrett's esophagus detected by fluorescence *in situ* hybridization of cytology specimens. *Mod Pathol.* 2004;17:588-96.
41. **Knudson AG.** Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer.* 2001;1:157-62.42. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature.* 1998;396:643-9.
43. **Soussi T, Lozano G.** *p53* mutation heterogeneity in cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;331:834-42.
44. **Nowak MA, Michor F, Iwasa Y.** Genetic instability and clonal expansion. *J Theor Biol.* 2006;241:26-32.
45. **Yoshimura A, Sugihara H, Ling ZQ, Peng DF, Mukaisho K, Fujiyama Y, et al.** How wild-type *TP53* is inactivated in undifferentiated-type gastric carcinomas: analyses of intratumoral heterogeneity in deletion and mutation of *TP53*. *Pathobiology.* 2006;73:40-9.
46. **Aguilera A, Gómez-González B.** Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet.* 2008;9:204-17.
47. **Panani AD.** Cytogenetic and molecular aspects of gastric cancer: clinical implications. *Cancer Lett.* 2008;266:99-115.
48. **Montenegro Y, Ramírez-Castro JL, Isaza LF, Bedoya G, Muñetón-Peña CM.** Análisis genético en pacientes con cáncer colorrectal. *Rev Med Chil.* 2006;134:1221-9.
49. **Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, Leggett BA.** Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J Gastroenterol.* 2007;13:3784-91.