

INESTABILIDAD CROMOSÓMICA Y DESEQUILIBRIOS GENÓMICOS EN CÁNCER DE VEJIGA

Memoria presentada por
Javier del Rey Azpiri

Para optar al título de
Doctor en Biología Celular

Tesis dirigida por
Dra. Rosa Miró Ametller

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología
Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Barcelona

Directora

Doctorando

Rosa Miró

Javier del Rey Azpiri

Bellaterra, diciembre del 2009

A mis padres

A mis hermanos

Este trabajo se ha realizado con la siguiente financiación:

- ISCIII : EPICUR-Red (FIS G03/174)
- SAF2007-64167
- PI020263
- 2009SGR
- RD06/0020/1020
- Generalitat de Catalunya, beca 2003FI-00262
- Generalitat de Catalunya, beca 2005BE

ÍNDICE

1. Introducción	1
1. 1. Aspectos fundamentales del cáncer	3
1.1.1. Características de la célula tumoral	4
1.2. Inestabilidad genómica	8
1.2.1. Inestabilidad de microsatélites	9
1.2.2. Inestabilidad cromosómica	9
1.3. Ciclo celular	22
1.4. Cáncer de vejiga	26
1.4.1. Clasificación histopatológica	27
1.4.2. Alteraciones genéticas en el cáncer urotelial de vejiga	29
1.5. Tecnologías que proporcionan información a gran escala	33
1.5.1. Arrays de genómica	34
1.5.2. Array de tejidos	35
2. Premisa y objetivos	39
3. Material y métodos	43
3.1. Muestras analizadas y diseño experimental	45
3.2. Técnicas experimentales	46
3.2.1. Extracción de DNA	46
3.2.2. Cultivo celular de sangre periférica para la obtención de metafases	49
3.2.3. Hibridación genómica comparada en cromosomas metafásicos (cCGH)	51
3.2.4. Hibridación genómica comparada en array de bacs (aCGH)	58
3.2.5. Cromosomas artificiales de bacterias (BACs)	63
3.2.6. Array de tejidos	71
3.2.7. FISH en array de tejidos y en tejidos parafinados	72
3.2.8. Tinción inmunofluorescente en tejido parafinado	77
3.3. Análisis estadístico	79
4. Resultados	81
4.1. Desequilibrios genómicos en cáncer de vejiga	83
4.1.1. Desequilibrios cromosómicos más frecuentes	84
4.1.2. Comparación entre los distintos grupos	93
4.2. Desequilibrios genómicos en cancer de vejiga muscular infiltrante:	100

importancia de los desequilibrios o amplificaciones en 5p, 6p, 1q y19	
4. 3. Inestabilidad cromosómica en el cáncer de vejiga	123
4.4. Estatus de los genes <i>CCND1</i> , <i>EGFR</i> , <i>C-MYC</i> y el locus 9p21 en el cancer de vejiga superficial. relación con la expresión de proteínas y parámetros clínicos	133
4.5. Incidencia de cáncer de pulmon en pacientes con cáncer de vejiga no músculo infiltrante	146
5. Discusión	151
5.1. Perfil de desequilibrios cromosómicos en el cáncer de vejiga.	153
5.2.Perfil de desequilibrios genómicos en tumores músculo infiltrantes y papel de E2F3, SKP2 y CKS1 en la progresión del cáncer de vejiga	164
5.3. Inestabilidad cromosómica en el cáncer de vejiga: la coalescencia de centrosomas y la amplificación del gen de la ciclina D1 son fenómenos comunes en tumores no músculo-infiltrantes	169
5.3. Genes implicados en el control de la proliferación celular y su papel pronóstico en los tumores de vejiga superficiales	174
5.4. ¿Representan los pacientes con cáncer de vejiga superficial un grupo a considerar para el screening de cáncer de pulmón?	180
6. Conclusiones	183
7. Bibliografía	187

Listado de abreviaturas

aCGH	Hibridación genómica comparada en array
BFB	Rotura-fusión-puente
cCGH	Hibridación genómica comparada convencional
CEP	Sonda centromérica
CIN	Inestabilidad cromosómica
Cy3	Cianina 3
Cy5	Cianina5
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DM	Diminutos dobles
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DSB	Rotura de doble cadena
FISH	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente
HSR	Región de tinción uniforme
Log2	Logaritmo en base 2
LOH	Pérdida de heterocigosidad
LSI	Sonda <i>locus</i> específica
Mb	Megabase
RNA	Ácido ribonucleico
TMA	Matriz de tejidos
TCC	Carcinoma de células transicionales

1. Introducción

1. 1. ASPECTOS FUNDAMENTALES DEL CÁNCER

El cáncer incluye más de 300 enfermedades genéticas independientes y se define como un proceso patológico causado por la acumulación de múltiples alteraciones genéticas, las cuales se van adquiriendo progresivamente a lo largo de la vida del individuo, haciendo que la probabilidad de desarrollar una neoplasia aumente exponencialmente con el tiempo. En los tejidos normales se mantiene un equilibrio entre la tasa de crecimiento de células nuevas y la muerte celular programada de células senescentes. Sin embargo, los daños acumulados en las células tumorales provocan la desregulación del ciclo celular, alterando este equilibrio como consecuencia de la pérdida por parte de las células de su capacidad apoptótica, o bien debido a un crecimiento descontrolado. Se estimula un crecimiento descontrolado cuyo origen es monoclonal, evitando los mecanismos de muerte celular programada, y pudiendo adquirir además, una capacidad invasora que permitiría la migración de células del tumor primario a otros tejidos más lejanos. Esta capacidad de colonizar y proliferar en otros órganos se conoce como metástasis.

En el organismo humano existen aproximadamente unos 200 tipos de células diferentes, cualquiera de ellas podría originar un tumor, sin embargo aproximadamente el 90% de los tumores tienen un origen epitelial. Esta predominancia, se piensa que podría ser debida a que las células epiteliales mantienen durante más tiempo la capacidad de división. Además, las células epiteliales recubren superficies internas y externas del organismo, lo que hace que su exposición a diferentes agentes carcinógenos sea mayor, que para otros tipos celulares.

Existen 3 factores primordiales a tener en cuenta en el cáncer:

Edad: La incidencia del cáncer aumenta con la edad. En los países desarrollados aproximadamente el 40% de la población desarrolla algún tipo de cáncer (Jemal, et al. 2004).

Ambiente: Los datos epidemiológicos muestran una clara asociación entre el desarrollo de cáncer y factores ambientales, como: dieta, tabaco, radiación, contacto con anilinas etc (Goldman and Shields 2003; Hecht 1999; Matsumura and Ananthaswamy 2004)

Herencia: El cáncer se caracteriza por la acumulación de mutaciones. Algunas de estas mutaciones presentan un patrón de herencia dominante y se heredan a través de la línea germinal, se ha observado por ejemplo en carcinomas renales, colon y mama. Además las mutaciones que aparecen de novo en las células somáticas, se heredan únicamente por las células del linaje neoplásico (Feinberg and Tycko 2004).

1.1.1. CARÁCTERÍSTICAS DE LA CÉLULA TUMORAL

Las células tumorales presentan siete alteraciones fisiológicas características: Autosuficiencia de señales de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitorias de crecimiento, evasión de la muerte celular programada, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, invasión de tejidos y metástasis e inestabilidad genómica.

Estas capacidades fisiológicas adquiridas durante el desarrollo tumoral, son características compartidas por la mayoría, si no todos los tipos tumorales en el hombre.



Figura 1.1.1. Capacidades adquiridas por la célula tumoral (adaptada de Hanahan & Weinberg 2000)

Autosuficiencia de señales de crecimiento

Las células normales necesitan de señales de crecimiento mitogénicas para pasar de un estado quiescente a un estado proliferativo. Estas señales se transmiten a la célula mediante receptores transmembrana. Ninguna célula humana normal puede dividirse en ausencia de estas señales estimuladoras. Muchos de los oncogenes que participan en la carcinogénesis actúan simulando el efecto de estas señales de

crecimiento. Las células normales en cultivo requieren la suplementación del medio con mitógenos, en el caso de las células tumorales esta dependencia de factores mitógenos externos es muy reducida. Las células tumorales son capaces de producir sus propias señales de crecimiento, rompiendo de esta manera la homeostasis necesaria para el correcto mantenimiento de los distintos tipos de células dentro de un tejido. Las células generalmente reciben las señales de crecimiento de otro tipo celular. Los tumores esquivan esta dependencia generando sus propias señales de crecimiento. Frecuentemente, presentan alteraciones ya sea en los receptores de factores de crecimiento o en la cascada de transducción de estas señales.

Sin embargo, se ha demostrado que las señales de crecimiento heterotípicas (de distinto tipo celular) son muy importantes para el tumor; estas señales son generadas por células normales del organismo que forman parte del estroma que rodea al tumor, células tales como, fibroblastos, células endoteliales etc.

Insensibilidad a las señales inhibitoras de crecimiento

En el tejido normal existen multitud de señales antiproliferativas que garantizan la homeostasis del tejido y mantienen la quiescencia de las células. Estas señales pueden ser solubles, o estar unidas a la matriz extracelular de las células vecinas. Como pasa con las señales de crecimiento, su acción se realiza mediante la unión a receptores transmembrana y transducción de señal al interior mediante una cascada. Esta cascada desemboca en la proteína del retinoblastoma (pRB). El retinoblastoma es un represor del paso de G1 del ciclo celular (Weinberg 1995). Las células tumorales evitan la quiescencia mediante la reducción del número de receptores o mutaciones de los mismos, pérdida o mutación de *RB1*, etc.

Evasión de la muerte celular programada

El crecimiento desmesurado de las células tumorales no depende sólo de la proliferación celular, también depende de una muerte programada o apoptosis reducida. Cuando la célula recibe una serie de señales fisiológicas, se activa un programa de muerte celular por el cual la membrana celular se deforma, el esqueleto nuclear y citoplasmático se rompe, el citosol se extrusiona, los cromosomas se degradan y el núcleo se fragmenta. La p53 es el sensor y regulador principal de la

apoptosis. Y esta proteína se ha visto que está inactiva hasta en un 50% de los cánceres humanos.

Potencial replicativo ilimitado

Las células normales tras un número limitado de divisiones entran en senescencia. En fibroblastos en cultivo esta senescencia puede evitarse mediante la disrupción de p53 o pRB, estas células continúan dividiéndose hasta alcanzar un estado denominado crisis.

En estado de crisis se da una muerte celular masiva, además aparecen reorganizaciones cromosómicas originadas por la fusión entre cromosomas y debidas principalmente a la erosión de los telómeros. Una de cada 10^7 células adquiere la capacidad de dividirse sin límite, esta capacidad se denomina inmortalización (Wright, et al. 1989). Esta inmortalización se logra mediante la activación de la telomerasa, que restaura los telómeros, evitando que se acorten en cada división (Bodnar, et al. 1998; Vaziri and Benchimol 1998).

Angiogénesis sostenida

Todas las células requieren para su correcto desarrollo oxígeno y nutrientes. Los tumores en desarrollo para progresar a un mayor tamaño necesitan de un sistema vascular desarrollado. Para ello los tumores en crecimiento adquieren capacidad angiogénica.

Los tumores presentan una expresión elevada de determinados factores de crecimiento: VEGF (del inglés *vascular endothelial growth factor*) y FGFs (del inglés *fibroblast growth factors*) en comparación a los tejidos normales.

Estas proteínas son moléculas inductoras de angiogénesis (Hanahan and Folkman 1996).

Invasión de tejidos y metástasis

Tarde o temprano en el desarrollo de la mayoría de tumores, algunas células adquieren la capacidad de invadir tejidos adyacentes o moverse a lugares más lejanos

y dar lugar a nuevas colonias de células tumorales. Estos nuevos tumores lejanos, las metástasis, son la causa de muerte de un 90% de los casos (Sporn 1996). La adquisición de esta capacidad por parte de las células tumorales viene dada principalmente por cambios en las moléculas de adhesión célula-célula, como las cadherinas e inmunoglobulinas, o moléculas de adhesión célula-matriz extracelular, como las integrinas (Aplin, et al. 1998).

Inestabilidad genómica

Las células tumorales presentan un índice de mutaciones muchísimo más elevado que las células normales. La inestabilidad genómica explicaría el alto número de mutaciones que se observan en los tumores y facilitaría la evolución tumoral en un entorno de presiones selectivas. La inestabilidad genómica se ha propuesto como motor de la tumorigénesis.

1.2. INESTABILIDAD GENÓMICA

Es bien conocido que para el desarrollo tumoral se requieren múltiples cambios genéticos. En las células tumorales existen dos tipos de inestabilidad genómica: La inestabilidad cromosómica (aneuploidías, translocaciones, inversiones, deleciones o amplificaciones) y la inestabilidad de microsatélites (mutaciones puntuales o inserciones/deleciones de secuencias microsatélite). La inestabilidad genómica se ha postulado como el motor de la carcinogénesis. El alto número de mutaciones observadas en los tumores, apoya la hipótesis de que uno de los primeros acontecimientos en el desarrollo tumoral podría ser la aparición de una mutación que acelerara la tasa de acumulación de mutaciones en la célula tumoral. Esta inestabilidad genómica favorecería la adaptación de las células tumorales al medio selectivo que les rodea.

El mantenimiento de la estabilidad genómica es primordial para la supervivencia celular y depende del correcto funcionamiento de los mecanismos de respuesta al daño genómico y de los sistemas de reparación.

Existen dos patrones de inestabilidad genómica, la inestabilidad de microsatélites y la inestabilidad cromosómica (Lengauer, et al. 1998).

1.2.1. INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

La inestabilidad de microsatélites se caracteriza por mutaciones, generalmente deleciones e inserciones, en secuencias repetitivas cortas (microsatélites) del genoma. Los microsatélites son debido a su secuencia y estructura regiones inestables, que tienden a formar bucles, por ello son secuencias diana para que se produzcan errores de replicación por parte de las DNA polimerasas. Estos errores provocan inserciones y deleciones en las secuencias repetitivas.

La inestabilidad de microsatélites es el reflejo de defectos en la reparación de bases desapareadas (MMR, del inglés *Mismatch repair*), lo que provoca la acumulación de mutaciones en las secuencias de microsatélites. De la misma manera que estos defectos de reparación afectan a los microsatélites, también tendrán efecto sobre aquellos genes que presenten regiones similares a estas secuencias, como consecuencia de todo ello se generan mutaciones, que provocan el cambio de la pauta de lectura, que dará lugar a una proteína truncada. Estas mutaciones pueden contribuir al desarrollo del tumor (Aaltonen, et al. 1993; Boyer, et al. 2002; Ionov, et al. 1993) (Woerner, et al. 2003).

1.2.2 INESTABILIDAD CROMOSÓMICA

Las células humanas presentan un cariotipo estable de 46 cromosomas. Sin embargo, la mayoría de tumores sólidos presentan un número de cromosomas alterado, y frecuentemente el número de cromosomas varía de una célula a otra dentro de un mismo tumor. Estas alteraciones numéricas pueden afectar a la ganancia o pérdida de cromosomas enteros (aneuploidía) o al set completo de cromosomas (poliploidía). Aparte de esta inestabilidad cromosómica numérica, en las células tumorales es habitual encontrar alteraciones o reorganizaciones estructurales, que raramente se dan en las células normales, como pueden ser las deleciones, duplicaciones, amplificaciones, inversiones o translocaciones.

La inestabilidad cromosómica (CIN, del inglés *Chromosome Instability*) clásicamente se ha definido como la tasa de ganancias y pérdidas completas de cromosoma (Lengauer, et al. 1998; Rajagopalan, et al. 2003) y ha sido muy útil para establecer la heterogeneidad genómica de los tumores. De acuerdo con los cambios genómicos que produce la CIN, podemos hablar de CIN numérica (N-CIN) y CIN estructural (S-CIN).

La elevada tasa de aneuploidías y la complejidad de las reorganizaciones están relacionadas con errores de reparación del DNA, errores de segregación mitótica y desregulación de los *Checkpoints* del ciclo celular.

Anomalías cromosómicas estructurales

Las anomalías cromosómicas estructurales tienen su origen en roturas cromosómicas seguidas una reconstitución en una combinación anómala. Son fenómenos menos frecuentes que la aneuploidía, y diversos agentes externos pueden inducirlos, factores clastogénicos tales como la radiación ionizante, gran variedad de productos químicos o incluso algunas infecciones víricas.

Las anomalías estructurales pueden ser equilibradas o desequilibradas. Son equilibradas aquellas reorganizaciones en las que se mantiene todo el material genético. Por el contrario, las desequilibradas dan lugar una pérdida o ganancia de material genético.

En condiciones normales, la célula es capaz de corregir la inmensa mayoría de las lesiones en el DNA. Sin embargo, si estos errores no son subsanados antes de que ocurra la replicación del DNA, darán lugar a una mutación o rotura de doble cadena (DSB, del inglés *double strand break*), que finalmente podría traducirse en una reorganización cromosómica.

En la mayoría de tumores sólidos, existen diversas alteraciones cromosómicas que no son específicas de la enfermedad, lo que dificulta la identificación de aquellas que son importantes (Johansson, et al. 1996). Podemos considerar, sin embargo, que pueden ser la manifestación citogenética de una inestabilidad cromosómica subyacente.

CIN estructural (S-CIN)

La inestabilidad cromosómica estructural se define como la tasa de generación de reorganizaciones cromosómicas como consecuencia de alteraciones en la reparación del daño genómico, pérdida de la integridad de los telómeros o defectos en los puntos de regulación del ciclo celular (Aguilera and Gomez-Gonzalez 2008).

Las reorganizaciones estructurales tienen su origen en errores de las vías de reparación del DNA, como resultado de reparar incorrectamente las roturas de doble cadena, ya sea por recombinación homóloga o por unión de los extremos no homóloga. En la aparición de las reorganizaciones estructurales los telómeros pueden también jugar un papel importante. Cuando los telómeros alcanzan un tamaño crítico, los sistemas de reparación de DNA no funcionan bien y la telomerasa esta activa, estos telómeros cortos son reconocidos como roturas de doble cadena capaces de recombinar de manera homóloga o no. A diferencia de las reorganizaciones estructurales, la aneuploidía se origina básicamente por la desregulación de los *checkpoints* del ciclo celular y errores de segregación durante la mitosis.

La amplificación juega un papel muy importante en la patogénesis tumoral. La amplificación es un mecanismo por el cual la célula tumoral adquiere múltiples copias de parte de su genoma, confiriendo a esta célula una ventaja de crecimiento o resistencia a algún agente quimioterapéutico. Citogenéticamente se han descrito dos tipos de amplificación: amplicones intra- y extracromosómicos (Schwab 1998). Los diminutos dobles (DM, dmin, del inglés *double minutes*) son amplificaciones extracromosómicas que pueden contener cientos de copias de un segmento genómico y forman minicromosomas de simetría invertida. Las regiones de tinción homogénea (HSR, del inglés *Homogeneously staining region*) son por el contrario amplificaciones intracromosómicas, y son copias en tándem de una secuencia, que puede estar orientada cabeza a cola o cola a cola (con simetría invertida) (Narayanan, et al. 2006).

Actualmente se propone que el proceso de amplificación ya sea intra o extracromosómico se inicia por un DSB. Estudios en levadura y células de mamífero utilizando nucleasas han demostrado que los DSB incrementan la frecuencia de amplificaciones extra e intracromosómicas. También, se ha observado que los agentes que dañan el DNA y producen roturas de doble cadena, ya sea de manera directa o indirecta, favorecen la amplificación. Además, en roedores y humano las regiones

cromosómicas cercanas a los sitios frágiles, son *hot spots* naturales altamente susceptibles de amplificación, ya que son muy susceptibles a roturas y recombinación (Lim, et al. 2005).

Los DSBs pueden dar lugar a una amplificación mediante diversos mecanismos, tales como: intercambio desigual entre cromátidas hermanas, replicación en círculo giratorio, replicación inducida por rotura, *foldback priming* y rotura-fusión-puente (BFB, del inglés *Break-Fusion-Bridge*).

El modelo más aceptado para explicar la amplificación intracromosómica es el ciclo de rotura-fusión-puente (Tanaka and Yao 2009). El origen de este fenómeno se encuentra en la formación de reorganizaciones inestables como cromosomas dicéntricos y cromosomas en anillo. Estas estructuras tienen su origen en una o varias roturas de doble cadena del DNA. La formación de un cromosoma dicéntrico puede tener lugar tras un DSB en al menos dos cromosomas, ya sean estos homólogos o no, y la fusión de ambos extremos. Un único DSB en fase G1 puede dar lugar a una cromátida dicéntrica, si tras la replicación los extremos rotos se fusionan. Los cromosomas en anillo pueden formarse cuando se dan dos DSBs en un mismo cromosoma, pero en brazos distintos. En todos los casos se genera uno o más fragmentos acéntricos, que corresponderán al extremo terminal del punto de rotura. En la siguiente división celular estos fragmentos sin centrómeros se pierden. Durante la anafase cada uno de los centrómeros del cromosoma en anillo o cromosoma dicéntrico pueden ser arrastrados hacia polos opuestos, formando un puente anafásico. Estos puentes acaban rompiéndose y los extremos generados vuelven a unirse, dando lugar a nuevas reorganizaciones estructurales (Figura 1.2.1). Todo esto puede conllevar a la amplificación o delección de determinadas regiones del genoma de la célula tumoral. Este ciclo de BFB implica que los cromosomas involucrados presentarán reorganizaciones distintas en las células hijas.

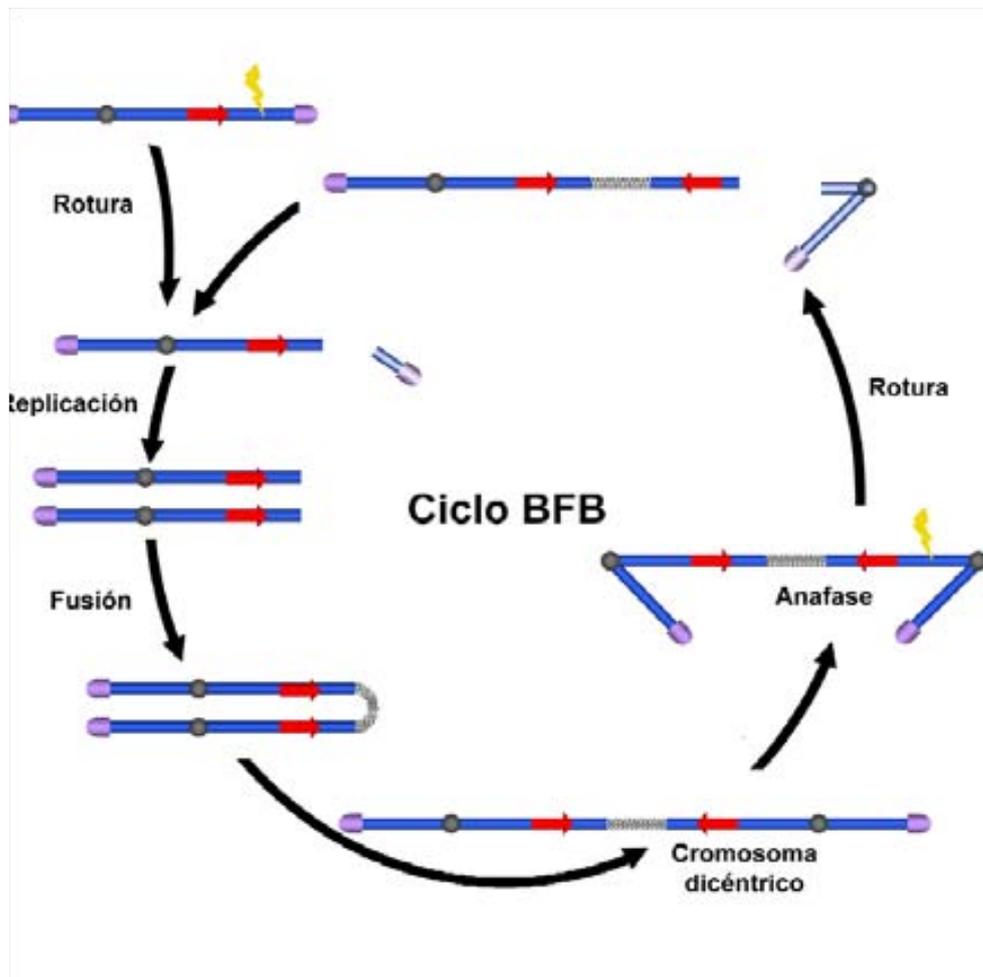


Figura 1.2.1: Ciclo de Rotura-fusión-puente (BFB). Adaptada de (Hastings, et al. 2009)

Se ha demostrado que el mecanismo de BFB se da frecuentemente en tumores que muestran abundantes reorganizaciones estructurales no específicas y que con frecuencia presentan una expresión alterada de p53, conllevando una menor eliminación de células aberrantes. Los ciclos BFB dan lugar a una formación continua de heterogeneidad en cuanto a las alteraciones estructurales se refiere. Además de alteraciones cromosómicas estructurales, un puente anafásico puede desencadenar el boqueo de la citocinesis, y por lo tanto la tetraploidización de la célula (Gisselsson and Hoglund 2005).

Aneuploidía y otras alteraciones cromosómicas numéricas

La aneuploidía es un estado en el que el número de cromosomas de una célula difiere de un múltiplo exacto del número haploide. Es común en cáncer pero también en otros procesos patológicos como abortos espontáneos y síndromes cromosómicos. Las aneuploidías más frecuentes son la trisomía (tres copias de un cromosoma en lugar de dos) o la monosomía (una sola copia del cromosoma en lugar de dos). Estudios citogenéticos han demostrado que las ganancias y pérdidas de cromosomas son fenómenos muy frecuentes en las células malignas humanas (Jin, et al. 1998).

La aneuploidía desestabiliza el número de cromosomas y es la principal causa de la inestabilidad en la células neoplásicas (Duesberg 2007).

La ganancia o pérdida de un cromosoma generalmente implica cambios de expresión en los genes que contiene. Estas aneusomías, aparte de afectar a la expresión de los genes que contienen, requieren un mecanismo adaptativo por parte de la célula que es independiente del cromosoma que se gana o pierde. Las aneuploidías generalmente son deletéreas y reducen la viabilidad de las células. En levaduras se ha demostrado que la aneuploidía genera un enlentecimiento de la fase G1 del ciclo celular, aumento de consumo de glucosa y un aumento de los requerimientos metabólicos. Tras corregir la sobreexpresión de los genes del cromosoma disómico, las levaduras sobreexpresan los genes de “respuesta a estrés ambiental” (Gasch, et al. 2000).

En levaduras, la aneuploidía aumenta la expresión los genes de biogénesis de ribosomas, reflejando un aumento de las necesidades biosintéticas de la célula (Torres, et al. 2007). Además, estas células son muy sensibles a los inhibidores del proteosoma, lo que se explicaría por la necesidad de corregir los desequilibrios en la estequiometría de proteínas como consecuencia de las aneuploidías (Chandhok and Pellman 2009). Estos mecanismos no han sido demostrados en células de mamíferos, pero experimentos realizados por Thompson y Compton (2008) son consistentes con esta posibilidad.

Otro factor que parece tener importancia a la hora de minimizar los efectos negativos de la aneuploidía sobre la viabilidad celular podría ser la ploidía. En levaduras haploides un cromosoma extra reduce drásticamente el crecimiento celular. Sin embargo en las células diploides este efecto negativo se ve disminuido. En las células tetraploides la tasa de pérdidas espontáneas puede incrementarse hasta 1000 veces

sin llegar a tener ningún efecto deletéreo en la división celular. El mismo efecto se ha observado en células animales, en las cuales la tetraploidía parece tener un papel promotor de la tumorigénesis (Fujiwara, et al. 2005; Roh, et al. 2008). La acción tamponadora sobre los efectos deletéreos de la aneuploidía podría ser el mecanismo por el cual la tetraploidía facilita la transformación. La tetraploidía permitiría la aparición de una combinación de aneusomias de cromosomas completos o reorganizaciones cromosómicas ventajosa para la célula. Estas aneuploidías aun de forma individual, podrían ser deletéreas en un genoma diploide, pero no así en uno poliploide.

CIN numérica (N-CIN)

La asociación entre la aneuploidía y el cáncer viene siendo tema de discusión desde hace mucho tiempo. Todavía hoy existe controversia respecto a que la aneuploidía sea causa de cáncer. Algunos autores defienden esta posibilidad incluso hasta el extremo de rechazar cualquier implicación de las mutaciones en genes supresores de tumores o oncogenes en el desarrollo del cáncer (Duesberg 2007). Por otro lado están los que defienden que la aneuploidía no es más que la consecuencia de errores en la división celular que se dan en un tipo de tejido que se divide rápidamente, como puede ser un tejido tumoral (Ricke, et al. 2008). Pese a que ambos puntos de vista tienen muchos partidarios y detractores, estos dos modelos no tienen porque ser mutuamente excluyentes. La aneuploidía podría tener un papel en el origen y desarrollo de algunos tumores, sin embargo en tumores avanzados, los cambios en el cariotipo podrían ser debidos a simples errores mitóticos. De la misma manera, las aneuploidías podrían ser meros acompañantes pasivos de las mutaciones causantes de la transformación tumoral inicial, pero jugar un papel más importante en la enfermedad avanzada generando un fenotipo metastático.

La inestabilidad cromosómica descrita por Lengauer como CIN, hace referencia a la elevada tasa de ganancias o pérdida de cromosómicas, ya sean totales o parciales, que presentan algunos tumores en comparación con las células normales (Lengauer, et al. 1998). El hecho de que un tumor presente una aneuploidía, no implica existencia de inestabilidad cromosómica, si esta se mantiene estable a lo largo de todas las células del tejido. Mediante las técnicas de fusión celular y transferencia cromosómica,

Lengauer concluyó que la aneuploidía no es la causa de CIN, sino las mutaciones a nivel génico que pueden generar aneuploidía.

En el estudio de las aneuploidías ha sido fundamental la distinción entre el “estado” del cariotipo y la tasa de cambios en el cariotipo (Cahill, et al. 1998)

La aneuploidía y la inestabilidad cromosómica son dos conceptos relacionados pero diferentes: Algunos tumores pueden ser aneuploides pero mantener un cariotipo altamente estable (Geigl, et al. 2008). Sin embargo, muchos otros tumores presentan una elevada inestabilidad cromosómica, generando una gran variabilidad de cariotipos entre las distintas células de un mismo tumor (Storchova and Pellman 2004).

La CIN generalmente correlaciona con la agresividad del tumor y con las anomalías mitóticas, tales como centrosomas supernumerarios (Nigg 2002; Rajagopalan and Lengauer 2004).

Hay dos fuentes de aneuploidía destacables, la no disyunción de cromosomas durante la anafase y la pérdida anafásica. En la no disyunción lo que ocurre es que las dos cromátidas de uno de los cromosomas va a parar a una de las células hijas, por lo tanto se originan dos células en las que una presenta trisomía y otra monosomía del cromosoma implicado. En la pérdida anafásica por el contrario, el cromosoma implicado forma un micronúcleo que puede perderse y dar origen a una pérdida cromosómica o puede volver a integrarse aleatoriamente en el núcleo de una de las células hijas. La formación de micronúcleos puede originarse por el retraso de alguno de los cromosomas en la mitosis o también por defectos en el huso mitótico, estos fenómenos implicarían la pérdida o ganancia completa de alguno de los cromosomas. Sin embargo, también pueden formar micronúcleos las secuencias de DNA carentes de centrómero. Durante la mitosis, los fragmentos acéntricos al no tener cinetocoro tienen dificultades para migrar hacia los polos, pudiendo dar lugar a micronúcleos. Se ha observado que, en determinadas circunstancias, las células tumorales pueden eliminar de manera activa mediante micronúcleos los diminutos dobles (DM o dmin), que no son más que fragmentos acéntricos y circulares producto de la amplificación de alguna secuencia del genoma.

Una de los primeros mecanismos que se sugirieron como posible origen de CIN numérica fue la desregulación del *checkpoint* de ensamblaje de microtúbulos (SAC, del inglés *Spindle Assembly Checkpoint*). El SAC garantiza la correcta unión de los

cinetocoros a los microtúbulos del huso antes de que la célula comience la anafase. Es decir, que los cinetocoros estén unidos a los microtúbulos del huso y que la tensión que los microtúbulos ejercen sobre los cinetocoros “hermanos” sea la correcta (Musacchio and Salmon 2007).

Aunque hay estudios sobre líneas celulares CIN positivas que encuentran defectos en el SAC, estudios recientes han demostrado que estos no son el mecanismo general por el cual se genera la N-CIN (Gascoigne and Taylor 2008; Thompson and Compton 2008; Tighe, et al. 2001). Aunque los defectos de SAC no sean la principal causa de CIN, podrían intervenir en su generación. En mamíferos el SAC es esencial, ya que las mutaciones nulas en homocigosis para los genes del SAC son letales (King 2008). Sin embargo, las mutaciones en heterocigosis de los genes SAC pueden provocar en ratones una predisposición a cáncer tras exposición a carcinógenos o tras una larga latencia (Baker, et al. 2005; Ricke, et al. 2008). En humanos se ha descubierto que mutaciones en *BUBR1*, que codifica una SAC quinasa; originan un síndrome de predisposición a cáncer denominado síndrome de aneuploidías variegadas en mosaico (Hanks, et al. 2004).

Trabajos recientes han identificado otros mecanismos que pudieran ser más importantes y comunes como causa de N-CIN. Normalmente los cinetocoros se unen a los microtúbulos de un único polo del huso, sin embargo en ocasiones los cinetocoros pueden unirse a microtúbulos de ambos polos de manera simultánea, lo que se conoce como unión merotélica (Figura 1.2.2). Un número importante de experimentos han demostrado que la mayoría, si no todos los casos de retraso anafásico se deben a uniones cromosómicas merotélicas (Cimini, et al. 2001). Las uniones merotélicas son especialmente peligrosas dado que no dan lugar al bloqueo del ciclo celular o apoptosis vía SAC (Cimini 2008) y los mecanismos de corrección de estos errores no son completamente eficientes (Cimini, et al. 2006; Knowlton, et al. 2006). Por lo tanto, a diferencia de los errores producidos durante la mitosis que activan SAC, las uniones merotélicas son más propensas a producir errores de segregación cromosómica y progeie aneuploide. Según un estudio de Thompson y Compton (2008), las uniones merotélicas serían cuantitativamente el principal origen de N-CIN. Además, estudios recientes han puesto en evidencia la importancia en la N-CIN de la unión cinetocoro-microtubulo, se ha demostrado que la sobreexpresión de quinesinas reduce el

fenómeno de retraso de los cromosomas en la anafase y errores de segregación en líneas celulares CIN positivas (Bakhoun and Compton 2009).

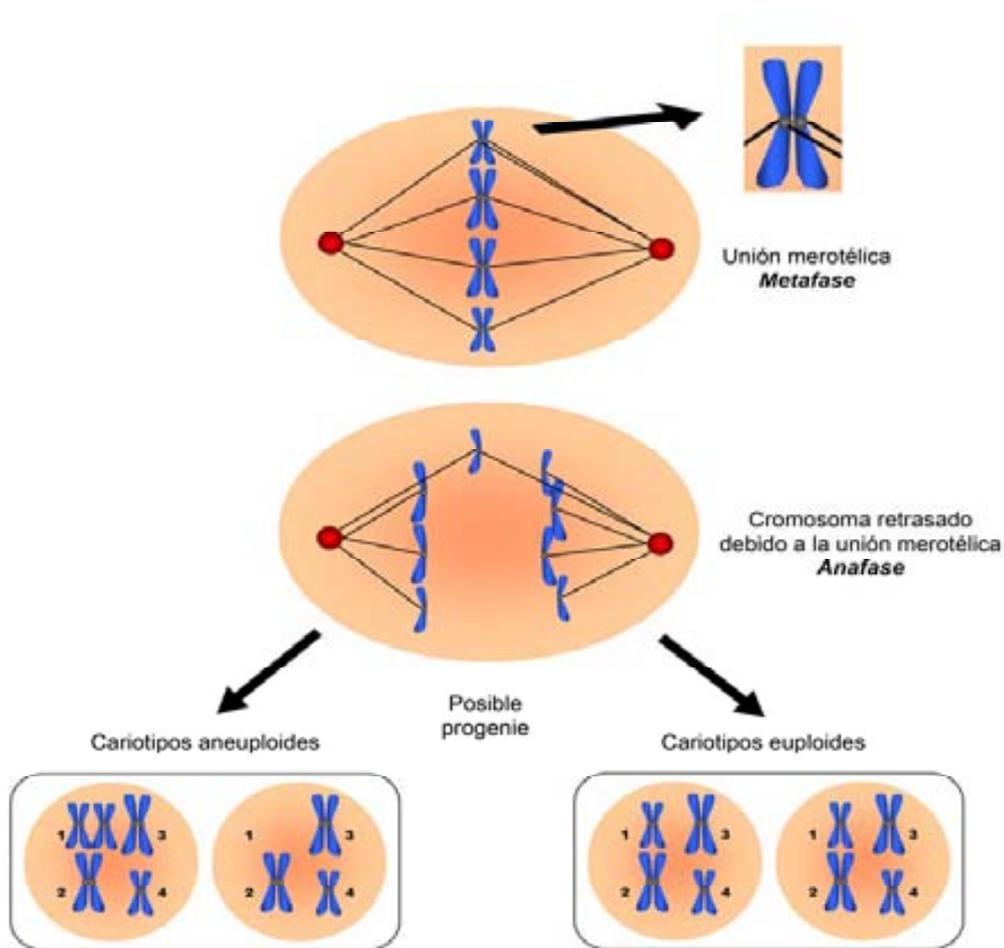


Figura 1.2.2. Generación de aneuploidías mediante uniones merotélicas. Adaptada de (Chandhok and Pellman 2009)

Otro factor a tener en cuenta como fuente del fenotipo N-CIN, sería la presencia de centrosomas extra también denominado: amplificación del centrosoma. El centrosoma es el centro organizador de microtúbulos más importante, para el ensamblaje de los mismos. El centrosoma se duplica antes de entrar en la mitosis (generalmente en la fase S). Con el comienzo de la profase los centrosomas se

separan y comienzan a migrar hacia polos opuestos de la célula. A medida que se dirigen hacia los polos, los centrosomas actúan como centro de nucleación para el ensamblaje de microtúbulos, dando lugar a que el espacio entre ambos centrosomas se llene de microtúbulos en crecimiento, para formar el huso mitótico. Es la estructura que más tarde en la anafase permitirá la distribución de los cromosomas entre las dos células hijas. Mientras todo esto ocurre los microtúbulos del citoesqueleto se despolimerizan, y las subunidades de tubulina, producto de la despolimerización pasan a formar parte del huso mitótico en crecimiento. Al mismo tiempo se organiza el áster, esta estructura está formada por una serie de microtúbulos radiales dispuestos alrededor de cada centrosoma.

El centrosoma de las células animales está compuesto por dos centriolos dispuestos de forma perpendicular el uno respecto al otro, los centriolos son estructuras pequeñas y cilíndricas formadas por microtúbulos.

Pese a que el centrosoma participa en la nucleación del huso mitótico en la mayoría de células animales, las células de vegetales superiores y también algunas células meióticas son capaces de formar el huso sin la participación de estas estructuras.

El centrosoma juega un papel esencial durante la mitosis formando el polo del huso y además es crucial para la correcta segregación de las cromátidas hermanas en las células hijas. La amplificación del centrosoma ha sido descrita en múltiples tumores, como pueden ser los de mama, próstata o vejiga (Pihan, et al. 1998; Yamamoto, et al. 2006). La amplificación del centrosoma, o lo que es lo mismo, la presencia de centrosomas supernumerarios, es frecuente en tumores sólidos y hematológicos aneuploides y guarda una estrecha correlación con la CIN, por lo que se ha propuesto como fuente de inestabilidad cromosómica (Nigg 2002; Pihan, et al. 2003). Además, la desregulación de múltiples genes ligados a la carcinogénesis humana da lugar a la amplificación de centrosoma (Fukasawa 2007). La amplificación del centrosoma puede generar la formación de metafases multipolares, dando lugar a más de dos células hijas con una dotación cromosómica alterada (Figura 1.2.3). En algunos casos, estas metafases multipolares pueden inducir el bloqueo de la mitosis, dando lugar a una célula poliploide. Sin embargo, en cáncer a menudo es difícil establecer si estas relaciones observadas son causa o efecto. De modo, que como sucede con la aneuploidía, las alteraciones en el centrosoma pudieran ser tanto causa como efecto de cáncer. Aun no está clara la dinámica de los centrosomas en los tumores, tampoco

se conoce con claridad como los centrosomas supernumerarios generan la CIN. Los centrosomas supernumerarios dan lugar a divisiones multipolares, que generan más de dos células hijas, que presentan grandes desequilibrios de segregación de los cromosomas. Sin embargo, no está del todo claro que la progenie generada a partir de las divisiones multipolares sea viable, y por lo tanto se desconoce la aportación cuantitativa a la CIN de este tipo de errores. Aunque es probable que los centrosomas supernumerarios promuevan el cáncer mediante la inducción de aneuploidías, hay que tener en cuenta que los centrosomas cumplen otras funciones aparte de la segregación de los cromosomas y que también pueden dar lugar a la tumorigénesis por otras vías. Por ejemplo, los centrosomas tienen un papel fundamental en la correcta colocación del huso mitótico durante las divisiones celulares asimétricas, este tipo de divisiones se observan por ejemplo en el sistema nervioso central de manera que se generan las neuronas maduras y las células madre neuronales (Bond, et al. 2005; Gonzalez 2008). En *Drosophila* también se ha demostrado que tanto defectos en el centrosoma como alteraciones en la polaridad de la célula dan lugar a un aumento de la proliferación de las células madres neuronales y promueven la formación de tumores (Castellanos, et al. 2008; Caussinus and Gonzalez 2005). Curiosamente sucede lo mismo con la amplificación del centrosoma. En moscas con centrosomas supernumerarios, a causa de la inducción de la quinasa Plk/SAK, son viables gracias a la capacidad de agrupar los centrosomas supernumerarios y formar un huso bipolar (Figura 1.2.3). Sin embargo, la presencia de centrosomas extras altera las divisiones asimétricas normales y pueden producir tumorigénesis (Basto, et al. 2008), generando al mismo tiempo una pequeña cantidad de aneuploidía (Chandhok and Pellman 2009).

Recientemente, se ha demostrado en líneas celulares tumorales que los centrosomas supernumerarios son capaces de promover errores en la segregación cromosómica durante una división bipolar. Estos errores de segregación aparecen como consecuencia del paso a través de una situación transitoria de metafase multipolar en la que los errores por uniones merotéticas se acumulan antes de que los centrosomas se agrupen y comience la anafase (Ganem, et al. 2009).

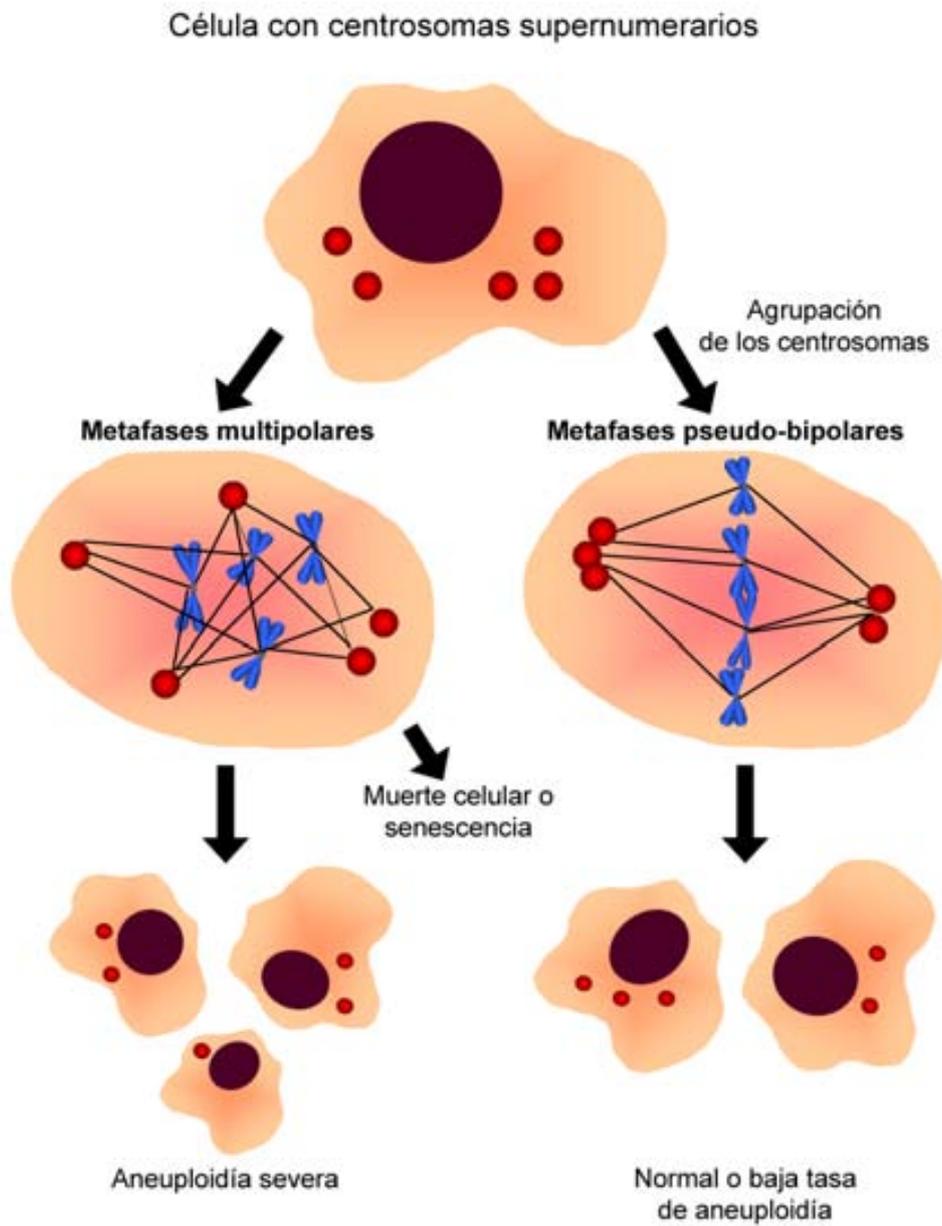


Figura 1.2.3. Anomalías de la segregación de cromosomas y generación de aneuploidía en células con centrosomas supernumerarios. Adaptada de (Chandhok and Pellman 2009).

1.3. CICLO CELULAR

La pérdida de la regulación del ciclo celular es uno de los puntos clave en el desarrollo y progresión de los tumores. El avance a lo largo del ciclo requiere de la actividad coordinada de las ciclinas, quinasas dependientes de ciclina (CDK, cyclin-dependent kinases) e inhibidores de CDKs (Grana and Reddy 1995). El gen del retinoblastoma (*RB1*) juega un papel central en el control del ciclo. Su producto es una fosfoproteína nuclear que ejerce una función reguladora en la fase de transición G1-S (Figura 1.3.1).

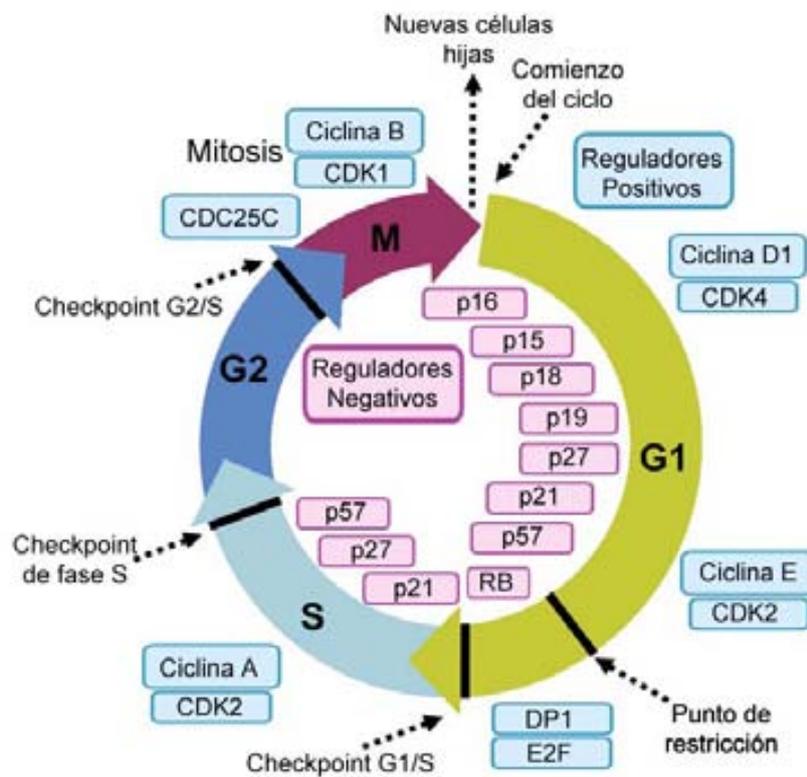


Figura 1.3.1. Control del ciclo celular

Las ciclinas son componentes del núcleo de la maquinaria del ciclo celular. Las ciclinas trabajan principalmente mediante su asociación a proteínas conocidas como quinasas dependientes de ciclina. Por ejemplo, CDK2 se une a la Ciclina E y CDK4 a

la Ciclina D1, y estos complejos fosforilan el producto del gen del retinoblastoma (pRB) promoviendo el paso de G1 a la fase S.

La Ciclina D1 regula positivamente la fase G1-S (Motokura and Arnold 1993). Esta ciclina junto con la quinasa dependiente de ciclina, es la responsable de la transición G1-S mediante la fosforilación de pRB que a su vez libera el factor de transcripción E2F promoviendo el inicio de la replicación del DNA.

E2F3 (*E2F transcription factor 3*) pertenece a la familia de factores de transcripción denominada E2F, formada por ocho miembros (E2F 1-8) y dos proteínas acompañantes de dimerización (DP, del inglés dimerization partners) (Frolov, et al. 2001; Stevens and La Thangue 2004; Trimarchi and Lees 2002). *E2F3* codifica dos productos proteicos (E2F3a y E2F3b) mediante la utilización de dos promotores alternativos y dos exones 5' distintos. (Leone, et al. 2000). E2F3a y E2F3b comparten dominios de unión al DNA, heterodimerización y unión a proteínas de bolsillo y únicamente difieren en el extremo N-terminal. Ambas proteínas tienen funciones parcialmente opuestas. E2F3a se considera como un E2F activador, expresándose en células proliferativas, logrando un pico máximo en G1 tardío (Leone 2001) y está relacionado con la transactivación de genes implicados en la síntesis del DNA y progresión en el ciclo celular. La activación de estos genes diana se reprime durante G1 cuando E2F3 se une a pRB (Lees 1993). Durante G1/S, pRB se hiperfosforila, provocando la liberación de E2F3a que activa los genes diana (Blais and Dynlacht 2004; Dimova and Dyson 2005; Trimarchi and Lees 2002). La sobreexpresión de E2F3a estimula las células quiescentes a retomar el ciclo celular.

E2F3b se ha clasificado como un E2F represor, y se expresa de manera constitutiva durante el ciclo celular, incluyendo la fase de quiescencia (He, et al. 2000; Leone, et al. 2000). Se ha observado que es el compañero predominante de pRB en G0, controlando especialmente la expresión de los genes específicamente reprimidos por pRB en las células quiescentes (He, et al. 2000; Leone, et al. 1998; Leone, et al. 2000).

La proliferación incontrolada es característica del cáncer y es debida a múltiples alteraciones, como la sobreexpresión de la Ciclina E, Ciclina D1, CDK4 y CDK6, pérdida de función de genes supresores tumorales, como *TP53*; y por subexpresión de *INK4*, *KIP1* y *RB1* (Ioachim 2008).

La sobreexpresión de la ciclina D1 se ha observado en numerosos tumores incluyendo adenoma paratiroideo, linfomas de células del manto, melanoma maligno de piel así como en carcinomas de mama, pulmón, hígado, esófago, vejiga urinaria, cabeza y cuello, vulva y cervix uterino. (revisado por Coupland, et al. 1998).

La amplificación del gen de la ciclina E se ha observado en cáncer de vejiga, colon, esófago, gástrico y de ovario. Más recientemente se ha detectado la sobreexpresión de Ciclina E en tumores de mama, cervix, endometrio, ovario, esófago, estómago, colon, vesícula biliar, hígado, próstata, testículos, vejiga urinaria, cabeza y cuello, pulmón, hueso, piel, tiroides y sistema linfático (Schraml, et al. 2003).

La progresión de las células eucariotas a lo largo del ciclo celular se controla de manera precisa mediante la activación temporal de quinasas dependientes de ciclinas (CKDs) y de la acumulación y renovación de sus inhibidores (Morgan 1995).

En las células de mamífero, la transición de G1 a S esta controlada por los inhibidores de CDK (CKIs, del inglés cyclin kinase inhibitors) como p27 y p21, entre otros (Sherr and Roberts 1999). Ambos CKIs funcionan como reguladores negativos del ciclo celular, bloqueando la entrada en fase S mediante la inhibición de la actividad CDK2/Ciclina E, CDK2/Ciclina A. Por lo tanto, la entrada en fase S requiere de la eliminación previa de estas proteínas inhibitoras que son degradadas en el proteosoma.

Durante la fase de transición G1 a S, p27 es fosforilada en el residuo Thr187 por el complejo CDK2/ciclina E. La maquinaria implicada en marcar p27 para su degradación en el proteosoma es un complejo ubiquitin ligasa SCF (Skp1, Cul1, proteína F box) que contiene SKP2 (S-phase kinase-associated proteína 2) como subunidad que reconoce específicamente p27 fosforilada para su ubiquitinación y posterior degradación (Bornstein, et al. 2003; Montagnoli, et al. 1999). SKP2 es por tanto el principal regulador de p27. El reconocimiento y la eficiente ubiquitinación de p27 y también de p21 requieren de la interacción con la pequeña proteína accesoria CKS1 (Cyclin-dependent Kinase Subunit 1), como factor indispensable del complejo SCFskp2 (figura 1.3.2) (Bornstein, et al. 2003). (Ganoth, et al. 2001; Spruck, et al. 2001). Mediante su interacción con SKP2, CKS1 funcionaría como efector alostérico que induciría cambios conformacionales de la proteína F box (SKP2), aumentando en ésta la afinidad por el

sustrato, contribuyendo a su unión a la proteína p27 fosforilada (Seeliger, et al. 2003; Sitry, et al. 2002).

UHMK1 (U2AF Homology Motif Kinase 1) codifica una Serina/Treonina quinasa (KIS) que inicialmente se identificó en ratón y rata. Se trata de una proteína con una estructura primaria muy interesante con un núcleo quinasa en el extremo NH₂-terminal y un motivo de reconocimiento de RNA en el dominio COOH-terminal (Maucuer, et al. 1997).

KIS fosforila *in vivo* el inhibidor de ciclinas dependientes de quinasas de G₁, p27 en la Serina 10, siendo este un residuo situado en una secuencia consenso para la fosforilación por parte de KIS (Boehm, et al. 2002). Además, los autores muestran evidencias de que la actividad quinasa de KIS regula de manera positiva la exportación de p27 del núcleo al citoplasma, permitiendo de esta forma la progresión de G₁ (Ishida, et al. 2002; Ishida, et al. 2000).

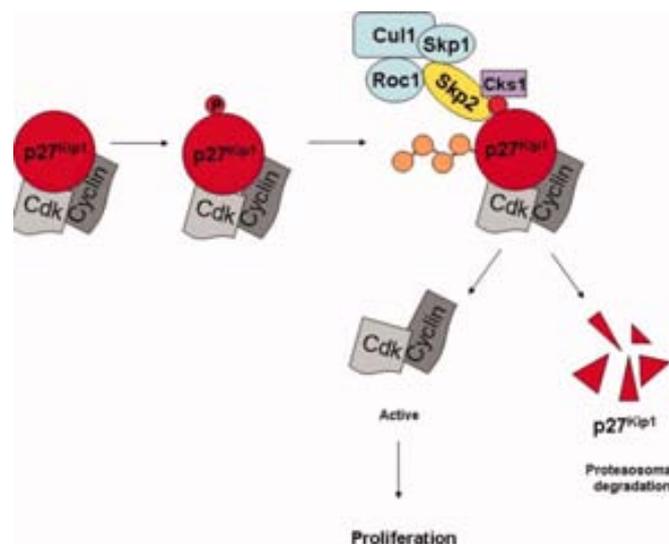


Figura 1.3.2. Degradación de p27 dependiente de Skp2. Extraída de Hershko (2008)

1.4. CÁNCER DE VEJIGA

El cáncer de vejiga es la cuarta neoplasia maligna más común en el hombre y la octava en la mujer, esta patología del epitelio vesical afecta a millones de pacientes cada año, pese a que la etiología del carcinoma vesical varía de continente a continente (Jemal, et al. 2004). El cáncer de vejiga está asociado con el consumo de tabaco, infecciones por *Schistosoma haematobium* y exposición a productos químicos tales como tintes y drogas antineoplásicas. Aproximadamente el 90% de los casos diagnosticados son Carcinomas uroteliales o de Células Transicionales (TCC, del inglés *Transitional Cell Carcinoma*) y un 5% son Carcinomas de Células Escamosas (SCC, del inglés, *Scamous Cell Carcinoma*).

Los TCC de vejiga pueden presentar distintos patrones de crecimiento, siendo la presentación más común el crecimiento papilar (70%), estos tumores presentan un buen pronóstico. Los tumores de crecimiento sólido representan un 10% de los casos y su pronóstico es desfavorable. El patrón mixto aparece en un 20% de los casos.

El comportamiento clínico de los tumores de vejiga de bajo riesgo comporta un control de los pacientes durante periodos de tiempo prolongados, que en algunos casos, conduce a la aparición de un segundo tumor primario. Diversos estudios epidemiológicos han mostrado que alrededor de 8 años después del diagnóstico, los pacientes con cáncer de vejiga muestran un incremento del riesgo a padecer una segunda neoplasia en relación con la población general (Mydlo, et al. 2001; Mydlo and Gerstein 2001).

1.4.1 CLASIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA

La clasificación histopatológica de los tumores se basa fundamentalmente en dos aspectos, el estadio de invasión del tumor y el grado de diferenciación tumoral.

Estadio: Para el estadiaje se utiliza el sistema TNM (Tumor Node Metastasis). La T nos indica el grado de infiltración del tumor, es decir hasta que capa de tejido llega el tumor. La N informa sobre el grado de afectación a nivel ganglionar. La M indica si existe metástasis o no (tabla 1.4.1.1).

Tabla 1.4.1.1. Sistema TNM de clasificación de tumores

T	Tumor Primario
TX	Tumor primario no evaluable
T0	No existe evidencia de tumor
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
Ta	Carcinoma papilar no infiltrante
T1	Invasión de tejido conectivo subepitelial
T2a	Invasión de capa muscular superficial (mitad interna)
T2b	Invasión de de capa muscular profunda (mitad externar)
T3a	Invasión de grasa perivesical: microscópicamente
T3b	Invasión de grasa perivesical: macroscópicamente
T4a	Invasión de órganos adyacentes: próstata, útero o vagina
T4b	Invasión de órganos adyacentes: pared pélvica o abdominal
N	Ganglios linfáticos regionales
Nx	Los ganglios linfáticos no se pueden evaluar
N0	No hay evidencia de metástasis en los ganglios regionales
N1	Metástasis que afecta a un único ganglio, tamaño inferior a 2cm
N2	Metástasis que afecta a un único ganglio de un tamaño superior a 2 cm o múltiples ganglios afectados cuyo tamaño conjunto no supera los 5 cm
N3	Metástasis en ganglios de un tamaño superior a 5cm
M	Distancia de la metástasis
MX	No puede evaluarse la presencia de metástasis lejanas
M0	No hay metástasis a distancia
M1	Hay metástasis a distancia

Grado: El grado es un factor pronóstico muy importante en cualquier patología tumoral. En cuanto a los tumores de vejiga, se considera un factor de gran importancia de cara al pronóstico de progresión y mortalidad. Los posibles grados de diferenciación celular, de acuerdo a la clasificación de la OMS de 1973 (Mostofi, et al. 1973), son:

- Grado X: cuando no se puede evaluar la diferenciación.
- Grado 1 o bajo: células bien diferenciadas, células con anaplasia ligera.
- Grado 2 o medio: células moderadamente diferenciadas, con anaplasia moderada.
- Grado 3 o alto: células pobremente diferenciadas o indiferenciadas.

Actualmente los tumores se clasifican en alto grado (Ga), bajo grado (Gb), y como grado X cuando no es posible la evaluación (OMS, 1998).

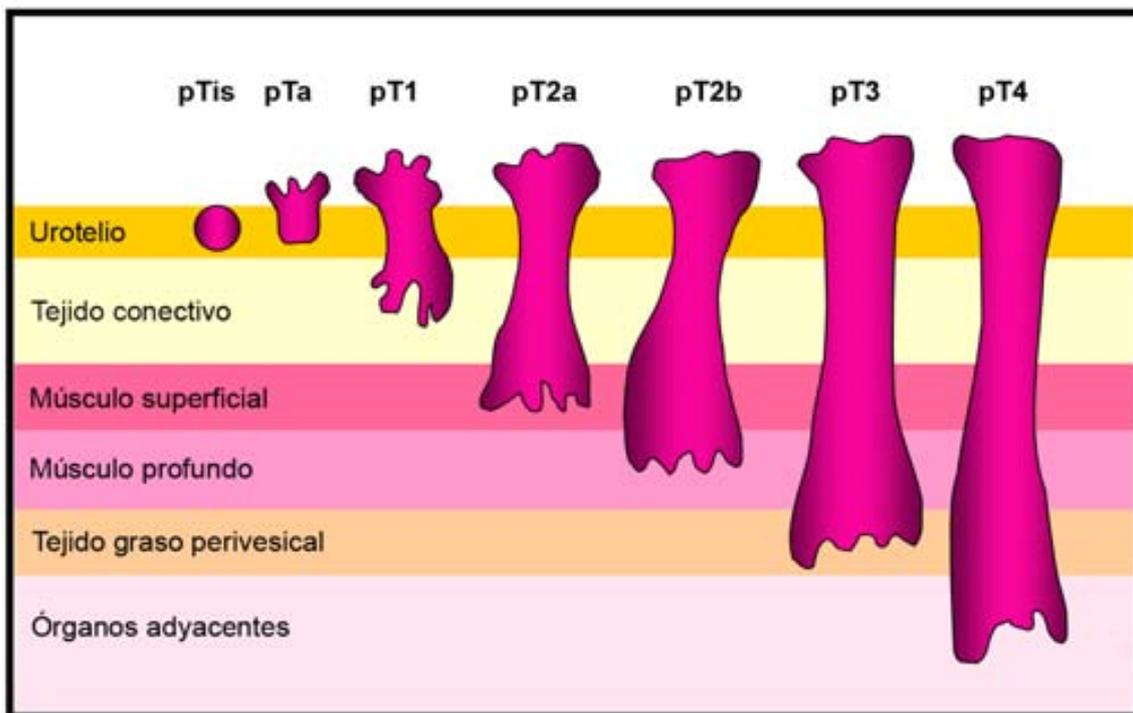


Figura 1.4.1. Estadios del Carcinoma urotelial de vejiga

En el momento del diagnóstico el 70-80% de los tumores se muestran como papilares superficiales (pTa) o de invasión mínima (pT1) y se interpretan como las primeras etapas del proceso tumoral (Figura 1.4.1). Aproximadamente un 70% de los tumores

superficiales recurre tras la resección inicial y en un 10-15% de los pacientes el tumor progresa a una forma más invasiva. La alta tasa de recurrencia (70%) y la tendencia de la enfermedad a la progresión hace necesario un meticuloso seguimiento de los pacientes con cáncer de vejiga superficial.

1.4.2. ALTERACIONES GENÉTICAS EN EL CÁNCER UROTELIAL DE VEJIGA

Existen numerosos estudios citogenéticos y moleculares que han aportado datos interesantes sobre las alteraciones genéticas y epigenéticas que contribuyen al desarrollo de los carcinomas de vejiga (revisado por Cordon-Cardo 2008; Knowles 2008; Mhawech-Fauceglia, et al. 2006; Wu 2005).

La citogenética de los tumores uroteliales es muy compleja. Los cariotipos diploides con una o varias anomalías pertenecen a estadios iniciales, y pueden evolucionar hacia cariotipos complejos pseudotriploides con un gran número de marcadores en estadios avanzados. Las anomalías más frecuentes son +7, -9, -11 o del (11p), del (13q), del(17p) y reorganizaciones de los cromosomas 1, 5 y 10 (Fadi-Elmula 2005). La técnica de hibridación genómica comparada (CGH) ha incrementado de forma considerable la información sobre alteraciones genómicas desequilibradas en los carcinomas de vejiga. Las alteraciones más frecuentes corresponden a ganancias de 1q, 8q, 20q, 11q así como pérdidas en 9q, 9p, 8p y 11p (Kallioniemi, et al. 1995; Koo, et al. 1999; Richter, et al. 1997; Richter, et al. 1999), (Prat, et al. 2001; Prat, et al. 2008; Simon, et al. 2000) (Tabla 1.4.1). Las pérdidas repetidas de heterocigosidad (LOH, del inglés *Loss of Heterocigosity*) indican la posible presencia de genes candidatos a supresores tumorales en: 3p, 4p, 4q, 8p, 9q, 11p y 14q (Czerniak, et al. 2000; Knowles 2001).

Los estudios mediante arrays de CGH han confirmado la implicación de las regiones previamente identificadas por CGH convencional y por estudios de LOH (Blaveri, et al. 2005a; Heidenblad, et al. 2008; Hurst, et al. 2004; Veltman, et al. 2003). Además, los perfiles de alteraciones en el número de copias de alta resolución han permitido la identificación de alteraciones en regiones genómicas muy pequeñas que mostraban amplificaciones o deleciones en homocigosis (Veltman, et al. 2003), lo cual ha permitido la identificación de nuevos genes candidatos en la tumorigénesis urotelial

(Kim and Bae 2008; Mhawech-Fauceglia, et al. 2006; Sanchez-Carbayo and Cordon-Cardo 2007)

Es importante destacar que los estudios de perfiles de expresión génica (Blaveri, et al. 2005b; Dyrskjot, et al. 2003; Sanchez-Carbayo, et al. 2003) y los de expresión proteica (Orenes-Pinero, et al.; Sanchez-Carbayo, et al. 2006) han proporcionado información relevante relacionada con estadio y recurrencia así como de los genes asociados a la carcinogénesis urotelial.

Los genes alterados en el cáncer de vejiga son principalmente aquellos involucrados en el ciclo celular, así como genes implicados en la transducción de señales, moléculas de adhesión y angiogénesis. De especial relevancia son las mutaciones en el gen *FGFR3* (fibroblast growth factor receptor 3) detectadas en un 50% de los tumores uroteliales. En estos tumores, un 70% de los Ta de bajo grado presentan el gen *FGFR3* mutado mientras que esta alteración aparece en únicamente un 10-20% de los tumores invasivos (Rieger-Christ, et al. 2003). Estudios realizados por Junker et al. (2008) relacionan las mutaciones en *FGFR3* con un bajo nivel de alteraciones cromosómicas y un genoma estable. Además de *FGFR3* otros genes de la vía tirosina-quinasa están alterados y a menudo sobreexpresados (*EGFR*, *ERBB2*, entre otros).

RAS y *FGFR3* participan en la misma vía de señalización celular. Se conoce desde hace tiempo que las mutaciones activadoras en los genes *RAS* están relacionadas con los carcinomas uroteliales, siendo las de *KRAS* las más frecuentes (Jebar, et al. 2005). La inactivación del gen supresor *PTEN*, ya sea por mutación o pérdida, es también frecuente en tumores uroteliales. El producto de este gen regula negativamente la vía fosfatidilinositol 3-quinasa que interacciona a su vez con la vía de señalización *RAS* (Wang, et al. 2000).

La pérdida del cromosoma 9p y 9q es un evento frecuente en los tumores de vejiga. En 9p21 se localiza el gen *CDKN2A* que codifica dos productos con splicing alternativo *INK4A* y *ARF* que controlan el ciclo celular a través de las vías del RB y de la p53. Las deleciones y pérdida de actividad por metilación del gen *CDKN2A* son frecuentes en los carcinomas uroteliales (Gonzalvo, et al. 1998; Orlov, et al. 1995). El gen *DBCCR1* (*deleted in bladder cancer chromosome region*) localizado en 9q32-33 ha sido propuesto como un posible gen supresor relacionado con los tumores de células transicionales de urotelio (Nishiyama, et al. 1999). Otros genes posiblemente

relacionados son *PTCH* (Patched) localizado en 9q22 y *TSC1* (tuberous sclerosis 1) en 9q34 (Knowles 2008).

El gen del retinoblastoma (*RB1*) se inactiva por mutación o deleción en más de un 50% de los tumores infiltrantes de vejiga. Otros genes de control del ciclo celular que intervienen en la vía del retinoblastoma tales como *CCND1*, *CCNE1*, también se han encontrado alterados en los carcinomas uroteliales.

La vía P53 y MDM2 también se encuentra mayoritariamente afectada en tumores músculo invasivos (Knowles 2008). Las mutaciones en *TP53* se han relacionado con pronóstico (George, et al. 2007) y con inestabilidad cromosómica.

Los datos clínicos y patológicos indican que los tumores uroteliales presentan comportamientos biológicos diferentes que pueden ser resultado de distintos patrones de alteraciones genéticas.

Dentro de los tumores de vejiga superficiales se ha visto que los tumores Ta de bajo grado se caracterizan por mutaciones de ganancia de función, afectando principalmente a oncogenes tales como *FGFR3* y *HRAS*. Se ha sugerido que estas dos mutaciones son mutuamente excluyentes en estos tumores. También son frecuentes las pérdidas del cromosoma 9, especialmente las pérdidas de 9q (revisado por Wu 2005).

Los tumores Ta y T1 representan un grupo heterogéneo que puede diferir en su patogénesis molecular y en sus vías de progresión. Atendiendo a su perfil de expresión génica, estos tumores se han dividido en dos grupos: uno compuesto por tumores Ta de bajo grado y el otro por tumores T1 (grados alto y bajo) y un subgrupo de tumores Ta incluyendo, también, bajo y alto grado.(Blaveri, et al. 2005b)

En un estudio reciente (Prat, et al. 2009), nuestro grupo ha clasificado los tumores no músculo infiltrantes en tres grupos de acuerdo con su perfil de ganancias y pérdidas cromosómicas: un grupo mayoritario caracterizado por pocos desequilibrios comprendía un 65% de los tumores Ta analizados. Otro grupo caracterizado por ganancias, especialmente en 1q y 17q, estaba compuesto por tumores Ta y T1. Finalmente, un grupo minoritario, compuesto por tumores T1 en su gran mayoría, se caracterizaba por pérdidas especialmente en 5q, 6q y 11q.

En los tumores músculo infiltrantes se han encontrado toda una serie de alteraciones cromosómicas, más allá de la pérdida del cromosoma 9. Son frecuentes las pérdidas

en 2q, 5q, 8p, 9p, 9q, 10q, 11p y 18q y las ganancias de 1q, 5p, 8q y 17q. De acuerdo con los datos citogenéticos la ganancia de 5p y pérdida de 5q podría ser una de las alteraciones más características de los tumores de vejiga avanzados (Fadl-Elmula 2005; Mitelman 2008).

La discriminación molecular entre tumores uroteliales superficiales e invasivos se ha descrito también mediante técnicas de arrays de genómica y de expresión (Blaveri, et al. 2005a; Blaveri, et al. 2005b; Dyrskjot, et al. 2003; Sanchez-Carbayo, et al. 2003).

En relación a la inestabilidad genómica, se han encontrado diferencias significativas en cuanto a la fracción del genoma alterado en tumores con diferentes estadios y grados, siendo los tumores Ta los de menor nivel de alteraciones mientras que los tumores T1 presentaban niveles superiores a los T2-T4 (Blaveri, et al. 2005a).

Tabla 1.4.1. Alteraciones frecuentemente detectadas mediante CGH en tumores uroteliales

Estadio	Pérdidas	Ganancias	Amplificaciones
Ta	9p, 9q, 10q, 11p, Y	1q, 17q, 20q	11q
T1	2q, 4p, 4q, 5q, 6q, 8p, 9p, 9q, 10q, 11p, 11q, 13q, 17p, 18p, 18q, Y	1q, 3p, 3q, 5p, 6p 8q, 10p, 17q, 19p, 19q, 20p, 20q	6p22, 8p12, 8q22, 10p12p14, 10q22q23, 11q13, 12q12q21, 17q21, 20q13
T2-T4	Las alteraciones de T1 + 15q	Las alteraciones de T1 + 7p, Xq	Las mismas alteraciones de T1

1.5. TECNOLOGÍAS QUE PROPORCIONAN INFORMACIÓN A GRAN ESCALA

En los últimos años, los avances en el conocimiento y disponibilidad de información sobre el genoma así como el desarrollo de robótica han permitido diseñar tecnologías que proporcionan información a gran escala basadas en dos conceptos: análisis de una muestra para obtener información de un gran número de genes (CGH, *arrays* de expresión etc) o el análisis de muchas muestras para obtener información de una molécula de interés (*arrays* de tejidos).

Estas tecnologías son complementarias. Los arrays de CGH (aCGH) permiten la localización e identificación de aquellas aberraciones genéticas que tienen lugar durante la carcinogénesis e implican ganancia o pérdida de material genético. El array de tejido es una poderosa herramienta para verificar resultados obtenidos por CGH convencional (cCGH) o CGH en microarrays. (Kristiansen et al. 2001).

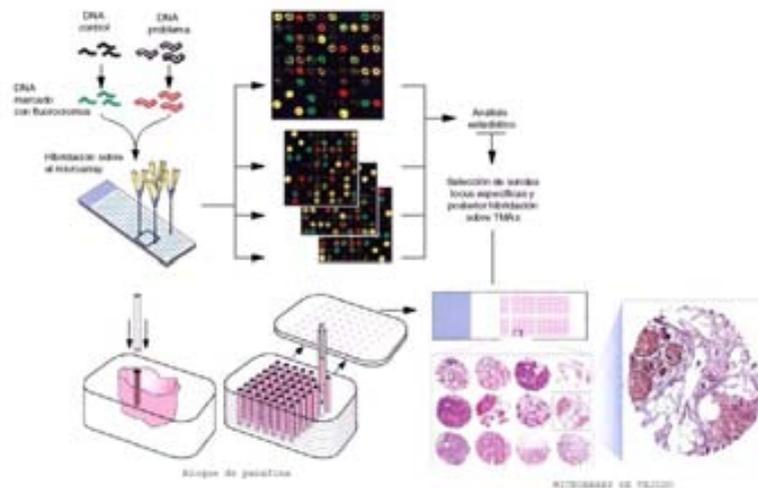


Figura 1.5.1. Técnicas de información masiva; validación de resultados de aCGH sobre array de tejidos

1.5.1. ARRAYS DE GENÓMICA

Los ensayos de hibridación en microarrays se basan en la disposición de material genético sobre un sustrato en posiciones conocidas y que se utiliza como plataforma para hibridar las muestras problema.

Las técnicas de hibridación en microarrays descritas a finales de los años 80 se han utilizado mayoritariamente en estudios sobre el análisis masivo o global de la expresión genética. Estos microarrays representan una foto global de la actividad transcripcional de las células y permiten obtener patrones de expresión génica en los tumores. Estos patrones pueden ser útiles en la búsqueda de marcadores de pronóstico, predicción y respuesta al tratamiento. Los microarrays de DNA genómico, utilizados en la presente tesis, permiten el análisis de la variación en la dosis génica y proporcionan una información sobre gran cantidad de genes alterados en el tumor con una resolución mayor que la CGH en metafase (Pinkel and Albertson 2005; Pinkel, et al. 1998).

Se dispone de mucha información sobre los perfiles de expresión génica en un gran número de tumores (Shih le and Wang 2005), sin embargo el reto está en distinguir aquellos genes cuya sobreexpresión o infraexpresión está relacionada directamente con el desarrollo del tumor de aquellos que son simples acompañantes y cuyos cambios son irrelevantes en el proceso tumoral. Ello se debe a que la expresión genética es dinámica y depende de programas genéticos y epigenéticos de las células tumorales. Por el contrario, las alteraciones genéticas se transmiten durante la división celular y son el resultado de su selección debido a la ventaja que confieren a las células tumorales (Kinzler and Vogelstein 2002). En estos casos también es crítico distinguir entre aquellas alteraciones genéticas con importancia biológica de las que son irrelevantes.

Los aCGH se han utilizado ampliamente para el estudio de alteraciones en el genoma del tumor y se han aplicado también al estudio de pacientes con alteraciones constitucionales (Speicher and Carter 2005). También se han aplicado al estudio de la variabilidad genómica normal (Sebat, et al. 2004) y a la participación de las variables en el número de copias en reorganizaciones presentes en el cáncer (Camps, et al. 2008).

La implementación de los arrays de CGH ha proporcionado información relevante sobre los desequilibrios genómicos de una gran cantidad de tumores entre los que se incluye el cáncer de vejiga (Blaveri, et al. 2005a; Hurst, et al. 2004; Shih le and Wang 2005; Veltman, et al. 2003). Los genomas tumorales revelan una gran variedad de alteraciones en el número de copias que definen un fenotipo característico para cada tipo de tumor. Esta gran variabilidad se pone en evidencia a partir de los estudios mediante aCGH (Camps, et al. 2006; Pinkel and Albertson 2005). El conocimiento de las alteraciones en el número de copias puede tener una repercusión en el diagnóstico y pronóstico tal y como se ha observado en distintos tumores tales como próstata, mama, gástrico y linfomas (Pinkel and Albertson 2005; Shih le and Wang 2005). Los aCGH permiten también la localización precisa en el genoma de las deleciones y amplificaciones que es vital para la identificación de nuevos oncogenes y genes supresores de tumor.

Además de las alteraciones en el número de copias, las pérdidas de heterocigosidad son un fenómeno común en el cáncer. Los arrays de SNPs (del inglés, *single nucleotide polymorphisms*) ofrecen la posibilidad de definir simultáneamente los cambios en el número de copias y las pérdidas de heterocigosidad a lo largo del genoma del tumor (Bignell, et al. 2004; Zhao, et al. 2004). El estudio de carcinomas de vejiga mediante esta técnica ha confirmado las alteraciones detectadas por otros métodos y ha identificado nuevos desequilibrios alélicos en 12q, 16p 1p y 2q (Hoque, et al. 2003; Primdahl, et al. 2006).

1.5.2. ARRAY DE TEJIDOS

En los departamentos de patología de los hospitales a diario se procesan y analizan cientos de muestras de pacientes buscando posibles anomalías citogenéticas, morfológicas o de expresión de proteína u otros marcadores fenotípicos o genotípicos. Esto requiere un procesamiento y análisis individual para cada paciente.

La tecnología del *array* de tejidos (TMA, *Tissue Microarray*) es una metodología que permite a los investigadores analizar de manera simultánea hasta 1000 muestras en un solo experimento. Además se pueden realizar hasta 300 cortes del TMA lo que permite realizar hasta 300 experimentos aproximadamente. Cada 50 cortes se realiza una nueva tinción con hematoxilina-eosina para garantizar que la morfología del tumor

se mantiene. A diferencia de los *arrays* de DNA donde se estudian simultáneamente miles de genes en una sola muestra, en los TMA se estudia uno o pocos genes en cientos de muestras.

Las ventajas del TMA son que permite la utilización de muestras de archivo parafinadas, se pueden utilizar sobre él las técnicas de patología clásica. Maximiza el aprovechamiento de la muestra. Facilita la búsqueda y validación de nuevos marcadores de tumor.

La limitación principal de la técnica es la imposibilidad de estudiar de manera simultánea múltiples genes o proteínas. No es útil para el diagnóstico, es una herramienta para el estudio a nivel poblacional. La recolección de las muestras y construcción del TMA es un proceso laborioso.

En cuanto a las aplicaciones principales permite la validación de potenciales marcadores tumorales descubiertos por cCGH o aCGH.

Las propiedades biológicas y clínicas de los tumores, tales como la invasión, crecimiento, metástasis y respuesta a terapia, son influenciadas por la expresión alterada de un gran número de genes. Antes de seleccionar un gen o proteína candidatos para diagnóstico y desarrollo terapéutico, estos deben ser validados sobre un gran número de muestras tumorales (Nocito, et al. 2001).

La tecnología del *array* de tejidos tiene un gran potencial puesto que acelera enormemente el estudio *in situ* de los especímenes, además permite estudios de asociación entre cambios moleculares y características clinicopatológicas y asegura la preservación de materiales de investigación que son únicos y valiosos.

La tecnología de *array* de tejidos maximiza el número de parámetros que pueden ser analizados de cada paciente y minimiza el daño ocasionado en el bloque de parafina donador. Prácticamente toda clase de tejidos o células pueden ser convertidos a formato microarray. Los TMAs pueden utilizarse para el estudio de alteraciones moleculares en diferentes estadios de la progresión tumoral. Los *arrays* de progresión han revelado conjuntos de alteraciones genéticas y patrones de expresión génica característicos de determinados estadios de la progresión tumoral (Nocito, et al. 2001).

El *array* de tejidos permite el análisis simultáneo del número de copias de DNA, RNA y proteína mediante el uso de la hibridación *in situ* e inmunohistoquímica. Esta técnica nos proporciona un eficiente método de evaluación de expresión proteica en

estudios de grandes cohortes usando tejidos archivados fijados en formalina e incluidos en parafina (Chen, et al. 2003).

2. Premisa y objetivos

2.1. PREMISA

Los tumores se desarrollan a partir de la combinación de los procesos de inestabilidad genómica y selección resultando en la expansión clonal de células que han acumulado el patrón más favorable de desequilibrios y alteraciones genéticas. Los carcinomas uroteliales de vejiga, al igual que la mayoría de tumores sólidos de origen epitelial, se caracterizan por la acumulación de múltiples desequilibrios genéticos que pueden detectarse mediante técnicas tales como cCGH y aCGH que permiten un análisis global del genoma.

La inestabilidad genómica da como resultado una heterogeneidad que no puede detectarse mediante el análisis global del genoma y que debe ser analizada mediante aquellas técnicas que examinan las células individualmente. La técnica de FISH se perfila como ideal para este tipo de estudio y permite, además, la validación de las alteraciones detectadas mediante CGH. El potencial pronóstico de estas regiones o genes de interés, como de sus productos de expresión, puede ser evaluado de forma rápida sobre un número de muestras elevado gracias a la tecnología de los TMAs.

2.2. OBJETIVOS

- 1.-Determinar los desequilibrios genómicos más frecuentes en los tumores uroteliales mediante CGH en metafase y CGH arrays para establecer una relación entre algunos de estos desequilibrios y características histopatológicas del tumor.
- 2.- Estudiar la inestabilidad cromosómica numérica mediante el análisis de los centrosomas y de la evolución *in vivo* de la amplificación del oncogén *CCND1*.
- 3.- Determinar mediante FISH la dosis génica de distintos genes implicados en la carcinogénesis vesical y evaluar su efecto en la expresión de la proteína y prognosis.
- 4.-Estudiar la susceptibilidad de los pacientes con cáncer de vejiga a otras neoplasias con etiopatología común.

3. Material y métodos

3.1. MUESTRAS ANALIZADAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Se han analizado tumores uroteliales de vejiga ya sea a partir de muestras incluidas en parafina o bien congeladas inmediatamente después de su extracción quirúrgica.

Las muestras analizadas procedían de la Fundación Puigvert y del Hospital del Mar de Barcelona.

1. Para definir los desequilibrios genómicos del cáncer de vejiga (apartado 4.1) se han analizado 180 tumores de distintos estadios y grados mediante la técnica de CGH en cromosomas metafásicos. Las muestras tumorales fueron obtenidas mediante cirugía en el Departamento de Urología de la Fundación Puigvert de Barcelona. Tras la extracción quirúrgica, las muestras se congelaron de inmediato a -80°C hasta el momento del análisis. Las características de estos tumores se indican en la tabla 4.1.1 del apartado 4.1

2. Para estudiar los desequilibrios genómicos en tumores músculo infiltrantes y el papel de los genes diana de algunas amplificaciones (apartado 4.2), se han seleccionado 13 tumores, del apartado anterior. Se han seleccionado, además, 11 tumores de un estudio anterior y que procedían del Departamento de Urología del Hospital del Mar de Barcelona. De todos estos tumores se disponía de la información obtenida mediante CGH en cromosomas metafásicos. Estos 24 tumores se han analizado mediante CGH en arrays de DNA. Para validar las regiones de amplificación se han utilizado dos arrays de tumores, se han construido sondas específicas a partir de BACs y se han aplicado las técnicas de FISH e inmunofluorescencia. Las características histopatológicas de los tumores y las técnicas aplicadas se indican en la tabla 4.2.1 del apartado 4.2.

3. El estudio de la inestabilidad cromosómica (apartado 4.3) se ha llevado a cabo en 22 muestras incluidas en parafina. Los tumores procedían de los departamentos de patología de la Fundación Puigvert y del Hospital del Mar de Barcelona. La heterogeneidad intratumoral y el comportamiento del amplicón *CCND1* se han analizado mediante FISH dual para el centrómero del cromosoma 11 y el gen *CCND1*. Para el estudio del centrosoma se ha utilizado el marcaje inmunofluorescente de las α , β y γ tubulinas. Las características de los pacientes y tumores analizados se indican en la tabla 4.3.1 del apartado 4.3.

4. Para el estudio del status de los genes *CCNE1*, *EGFR*, *CMYC* y locus 9p21 (apartado 4.4) se ha construido un array de 152 tumores uroteliales superficiales (Ta y T1) procedentes del archivo de tumores del Hospital del Mar de Barcelona. Las características de los tumores y su evolución clínica se indican en la tabla 4.4.1 del apartado 4.4. Con el fin de analizar las alteraciones de la dosis génica se ha aplicado la técnica de FISH con sondas duales para los genes analizados y los centrómeros de sus respectivos cromosomas. Se ha analizado la expresión de proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular y el papel pronóstico de las alteraciones detectadas.

5. Para el estudio de la incidencia de cáncer de pulmón como segunda neoplásia en pacientes con cáncer de vejiga no músculo infiltrante (apartado 4.5) se utilizó la base de datos de pacientes con cáncer de vejiga del Hospital del Mar de Barcelona entre los años 1995 a 2003. En el estudio se incluyeron 231 pacientes y en la tabla 4.5.1 del apartado 4.5 se indican las características clínicas e histopatológicas de los mismos.

3.2. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

3.2.1. EXTRACCIÓN DE DNA

EXTRACCIÓN DE DNA DE SANGRE PERIFÉRICA

- 1- Colocar de 1 a 5 ml de sangre periférica en un tubo de 50 ml.
- 2- Enrasar hasta 50 ml con solución salina fisiológica (NaCl 0,9M).
- 3- Centrifugar 2.750 rpm a 4°C durante 10 min.
- 4- Descartar el sobrenadante con una pipeta Pasteur de plástico, con cuidado de no resuspender la capa blanca de leucocitos, que se encuentran justo por encima del botón de eritrocitos y otros componentes sanguíneos.
- 5- Resuspender por agitación (posible punto de parada de protocolo, se puede guardar la muestra a -20°C).
- 6- Enrasar el tubo hasta 50 ml con solución de lisis de eritrocitos, que se prepara el mismo día.
- 7- Mezclar por inversión y dejar en hielo 30 min.
- 8- Centrifugar durante 15 min a 3000 rpm a 4°C.

- 9- Decantar el sobrenadante.
- 10- Resuspender el botón celular en 25 ml de tampón de lisis de eritrocitos.
- 11- Dejar la mezcla en hielo durante 30 min y centrifugar y descartar el sobrenadante. Este paso se puede repetir hasta un máximo de 4 lavados, hasta obtener un botón blanco (En este paso se puede detener el protocolo guardando el botón a -20°C).
- 12- Añadir 3 ml de tampón de lisis de leucocitos, 500 µl de proteinasa K (30ng/ml) y 200 µl de SDS 10% e incubar en agitación a 37°C *overnight*.
- 13- Añadir 1 ml de NaCl 5,5M y agitar vigorosamente de 15 a 20 seg hasta obtener una emulsión completa.
- 14- Centrifugar a 3400 rpm a 4°C durante 15 min.
- 15- Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo de 50ml.
- 16- Centrifugar a 3500 rpm a 4°C durante 15 min.
- 17- Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo (repetir estos dos últimos pasos hasta que desaparezcan todas las partículas flotantes)
- 18- Añadir 2 volúmenes de etanol frío absoluto.
- 19- Pescar la medusa de DNA con una pipeta pasteur doblada en su extremo.
- 20- Lavar la medusa en EtOH 70% y luego dejar escurrir el exceso de EtOH.
- 21- Disolver la medusa en aproximadamente 500µl de H₂O (el volumen puede variar dependiendo de el tamaño de la medusa de DNA).

Soluciones

Tampón de lisis de eritrocitos

5 ml Tris 2M pH 7,5

2,5 ml MgCl₂ 1M

Enrasar a un volumen final de 500 ml con H₂O miliQ.

Tampón de lisis de leucocitos

2,5 ml Tris 2M pH 8,2

40 ml NaCl 5M

4 ml EDTA (titriplex) 0,25M

Enrasar a 500ml con H₂O miliQ

EXTRACCIÓN DE DNA DE TEJIDO CONGELADO

- 1- Picar la muestra hasta pulverizarla en un recipiente metálico en el centro del cual, hay una base donde se deposita la muestra. Sobre la muestra se pone una pieza metálica que se golpea con ayuda de un martillo. Toda la estructura se encuentra refrigerada por nitrógeno líquido.
- 2- Poner la muestra pulverizada en un tubo de 50 ml.
- 3- Añadir 5 ml de tampón de homogenización.
- 4- Agitar manualmente.
- 5- Añadir 33,3 ml de Proteinasa K (30 ng/ml).
- 6- Agitar suavemente con el vortex.
- 7- Tapar el tubo y sellarlo con parafilm.
- 8- Incubar en agitación *overnight* a 56 °C.
- 9- Añadir 1 volumen de fenol-cloroformo.
- 10- Agitar vigorosamente con *vortex*.
- 11- Centrifugar durante 10 min a 3.000 rpm.
- 12- Pasar la fase superior a un nuevo tubo
- 13- Añadir 400 µl de NaCl 5M por cada 5 ml de solución.
- 14- Agitar cuidadosamente.
- 15- Añadir 2 volúmenes de etanol absoluto.
- 16- Agitar con cuidado hasta observar la medusa de DNA.

- 17- Pescar la medusa de DNA con una pipeta pasteur doblada en su extremo.
- 18- Lavar la medusa en EtOH 70% y luego dejar escurrir el exceso de EtOH.
- 19- Disolver la medusa en aproximadamente 500µl de H₂O (el volumen puede variar dependiendo del tamaño de la medusa de DNA).

Soluciones

Tampón de homogenización, pH 8

100 mM NaCl

10mM Tris HCl

25mM EDTA 0,5%SDS

3.2.2. CULTIVO CELULAR DE SANGRE PERIFÉRICA PARA LA OBTENCIÓN DE METAFASES

Se parte de un volumen de sangre periférica de 1-3 ml. La extracción se realiza con una jeringa estéril y heparina sódica como anticoagulante. La muestra se conserva a temperatura ambiente o a 4°C hasta el momento de la siembra. Es aconsejable realizar la siembra en las 24h posteriores a la extracción, aunque puede sembrarse en días posteriores si se guarda en nevera. Obtenemos una suspensión celular enriquecida en células metafásicas. Permitiendo realizar técnicas como la tinción uniforme, bandas G o FISH , entre otras.

Esta metodología se ha utilizado para validar los BACs y confirmar que hibridaban en las regiones cromosómicas correspondientes.

Preparación del medio

- 1- Preparar en condiciones estériles un medio que contiene:
 - 100 ml RPMI-1640 con glutamina y 25mM de Hepes
 - 20 ml suero fetal bovino (FCS) inactivado (mediante calor a 57°C durante 30 min.)
 - 2 ml penicilina/estreptomina

-2 ml Heparina sódica al 1%

2- Homogeneizar y alicuotar en tubos de 5 ml. Conservar a -20°C.

Siembra de la muestra

3- Descongelar los tubos con 5 ml de medio.

4- Suplementar cada tubo con:

-50 µl de L-glutamina 200 mM

-100 µl de Fitohemaglutinina

(Ambos son productos liofilizados. La glutamina y la fitohemaglutinina se resuspenden en 20 ml y 10 ml de ddH₂O, respectivamente. Las alícuotas se guardan congeladas a -20°C.)

5- Se siembran entorno a 250-500µl de sangre por tubo.

Incubación del cultivo

6- Incubar los tubos inclinados durante 72 h a 37°C al 5% de CO₂ (Mezclar suavemente 2 veces al día durante la incubación).

7- Añadir colcemid (Irvine Scientific) a una concentración final de 0,04µg/ml e incubar 15 min a 37°C para bloquear las células en metafase

Extracción del cultivo

8- Centrifugar los tubos a 650 g durante 8 min.

9- Descartar el sobrenadante.

10- Realizar tratamiento hipotónico con KCl 0,075M, aplicar gota a gota hasta un volumen aproximado de 7-10ml y dejar actuar 30 min a 37°C.

11- Centrifugar a 400 g durante 8 min.

12- Decantar sobrenadante.

13- Realizar 3 lavados en solución carnoy, aplicar 7-10ml gota a gota y agitando con el vortex, para fijar la cromatina y eliminar las membranas y estructuras celulares.

- 14- Tras cada aplicación de carnoy centrifugar la muestra a 300 g durante 6 min, decantar el carnoy y aplicar un volumen de solución nueva. (Este material puede conservarse durante años a -20°C)

Extensión de la suspensión celular sobre el porta

- 15- Extraer los portas almacenados a -20°C y sumergidos en metanol al 70°C.
- 16- Eliminar los posibles restos de suciedad y de grasa con un pañuelo de papel.
- 17- Realizar la extensión celular sobre el porta, dejando caer 2-3 gotas de suspensión celular sobre el porta desde cierta altura.

Soluciones

Solución Carnoy

3 volúmenes de metanol

1 volumen de ácido acético

3.2.3. HIBRIDACIÓN GENOMICA COMPARADA EN CROMOSOMAS METAFÁSICOS (cCGH)

Esta técnica se basa en la hibridación competitiva de un DNA problema (tumor) y un DNA control, marcados fluorescentemente con dos fluorocromos distintos, sobre cromosomas metafásicos normales. Esta técnica, descrita por (Kallioniemi, et al. 1992), permite detectar de manera global desequilibrios del genoma de la muestra analizada en un solo experimento. El software de CGH interpreta la señal de ambos fluorocromos a lo largo de cada uno de los cromosomas y se establece un ratio entre ambos fluorocromos (muestra/control). Los valores superiores a 1.25 son considerados ganancia y valores inferiores a 0.80 son considerados pérdida.

De las ventajas que presenta esta técnica cabe destacar, que no es preciso tener información previa de los desequilibrios genómicos presentes en la muestra, puesto que se estudia todo el genoma. No es preciso hacer cultivo, sólo se precisa de DNA ya sea procedente de material fresco, congelado o parafinado. En cuanto a la cantidad de DNA necesaria, se precisan únicamente entre 700 y 1000 ng para realizar la técnica. En el caso de realizar un paso previo de amplificación por DOP-PCR se puede partir incluso del material obtenido de una única célula.

Esta técnica presenta ciertas desventajas: la imposibilidad de detectar alteraciones equilibradas, no permite tampoco conocer la ploidía de la muestra. En el caso de muestras heterogéneas, solo permite detectar alteraciones presentes en al menos un 30% de las células. Algunas regiones del genoma son susceptibles de dar lugar a falsos positivos (regiones centroméricas y teloméricas, y algunas zonas heterocromáticas como las del 1q, 9q y 16q). El límite de resolución es de 7-10 Mb para las pérdidas y de 3 Mb para las ganancias.

Reacción de *Nick Translation*

Se realizan dos reacciones por separado para la muestra y el control usando fluorocromos distintos, en nuestro caso *Spectrum Red* para la muestra problema y *Spectrum Green* para el control.

- 1- Preparar en un tubo eppendorf la mezcla de la reacción de *Nick Translation* consistente en:
 - 5 μ l 0,1mM dTTP
 - 5 μ l 10x*Nick Translation Buffer*
 - 10 μ l 0,1mM dNTP Mix
 - (22,5-x) μ l *Nuclease free water*
 - x μ l DNA (x =700-1000 ng totales)
 - 2,5 μ l *Spectrum Green* dUTP (control)/*Spectrum Red* (muestra)
 - 5 μ l *Nick translation Enzyme*
- 2- *Vortex* breve y *Spin*
- 3- La reacción se realiza a 15-18°C durante 1 hora y 30 minutos.
- 4- Parar reacción a 70°C durante 10 min.

Precipitación de la sonda

- 5- Se mezclan el producto de la reacción de la muestra control y tumoral junto con 10 μ l de DNA Cot-1 humano (10ng).
- 6- Añadir 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M pH 5,5.
- 7- Añadir 2,5 volúmenes de EtOH 100% frío.

- 8- Mezclar por inversión.
- 9- Precipitar en congelador un mínimo de 30 min.
- 10- Centrifugar durante 30 min a 13.000 rpm.
- 11- Decantar el sobrenadante y secar los restos de EtOH con la punta de un pañuelo de papel, sin tocar el botón.
- 12- Dejar secar el botón en una estufa a 37°C durante aproximadamente 8 min.
- 13- Dejar resuspender el botón en 12 µl de solución de hibridación, se realizan varios vortex seguidos de un *spin* en la centrifuga, hasta resuspender totalmente.
- 14- Guardar la solución (sonda) a oscuras hasta el momento de la desnaturalización de la misma.

Desnaturalización e Hibridación

- 15- Desnaturalizar el porta a 74°C en una solución de formamida 70% durante 5min
- 16- Deshidratar el porta en una serie creciente de etanol:
 - En etanol 70% 1 min.
 - En etanol 85% 1 min.
 - En etanol 100% 1 min.
- 17- Secar el porta al aire.
- 18- Desnaturalizar la sonda durante 8 min a 74°C.
- 19- Aplicar la sonda sobre el porta.
- 20- Poner el cubre y sellar los bordes con cola para evitar la evaporación de la sonda.
- 21- Hibridar en cámara húmeda a 37°C de 36 a 72 horas.

Lavados Post-Hibridación

- 22- Retirar el cubre y restos de cola del porta

23- Lavar el porta en una solución de 0,4xSSC/0,3%NP-40 a 74% durante 2 min, agitando el porta los primeros segundos.

24- Lavar el porta en una solución de 2xSSC/0,1%NP-40 a TA (temperatura ambiente) durante 2 min, agitando unos segundos.

Contratinción

25- Secar el porta al aire.

26- Aplicar 12µl de solución DAPI 125ng/µl diluido en Vectashield.

27- Colocar el cubre.

28- Guardar en nevera hasta el análisis.

Captura y análisis

Para la captura se ha utilizado un microscopio de epifluorescencia Olympus AX-70 (Olympus Optical CO, Hamburg, Germany) equipado con los filtros: U-MNIBA (*SpectrumGreen*), U-MWIY (*SpectrumRed*) y U-MNU (DAPI), acoplados a una cámara digital CCD de alta sensibilidad (Photometrics Sensys/Olympus U-SPT) conectado a un sistema automatizado de análisis de imágenes dotado de un software específico para CGH (Isi, Metasystems). Se han analizado de 10 a 15 metafases por caso. Para un resultado óptimo se han capturado metafases de condensación cromosómica similar (cercana a las 400-500 bandas), con el menor número posible de solapamientos entre cromosomas, con una hibridación uniforme, sin granularidad y sin ruido de fondo. Se capturan de manera secuencial DAPI, fluorocromo verde y fluorocromo rojo (figura3.2.1.). La contratinción con DAPI nos proporciona un patrón de bandas similar al obtenido mediante la técnica de bandas G, que nos permitirá identificar cada uno de los cromosomas.

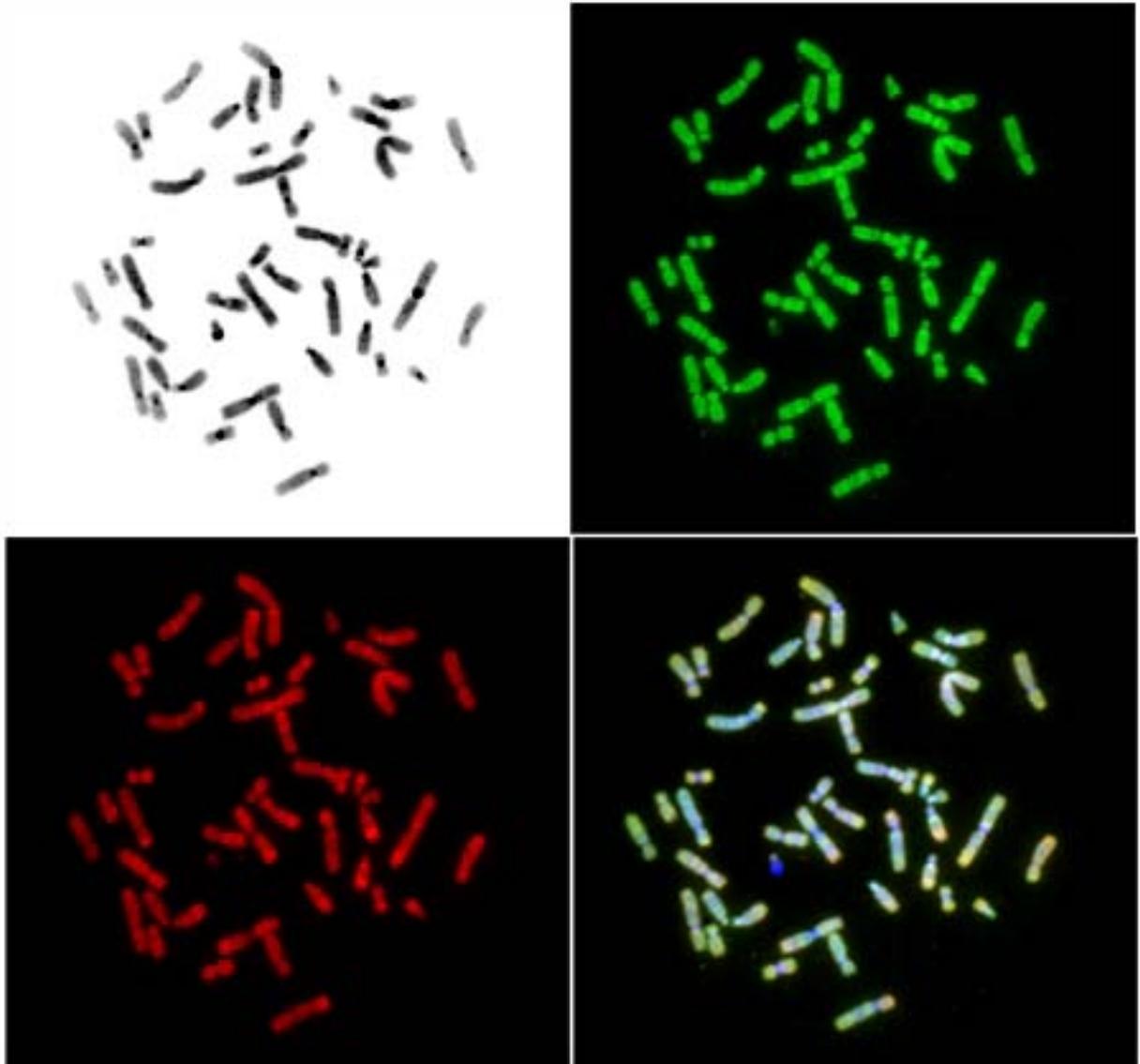


Figura 3.2.1. Captura secuencial de los fluorocromos en la CGH. Se muestran las imágenes de contatincion con DAPI, fluorocromos verde, rojo e imagen compuesta por los tres fluorocromos

El sistema de análisis reduce al máximo el ruido de fondo e integra las intensidades de los fluorocromos verde y rojo. La relación de fluorescencia roja/verde (ratio) se calcula a lo largo del eje de cada cromosoma. Las regiones equilibradas presentan un ratio cercano al 1, mientras que el ratio de las regiones de pérdida es inferior a 0,8. Un ratio superior al 1,25 se considerará ganancia y a partir de 1,5 amplificación. El programa nos permite visualizar cada cariotipo estudiado en el que las regiones equilibradas se observan de un color amarillento, las ganancias aparecen de color rojo y las pérdidas

verdes, a partir de los ratios obtenidos el software calcula el promedio de todas las metafases estudiadas e interpreta un perfil de CGH (figura 3.2.2).

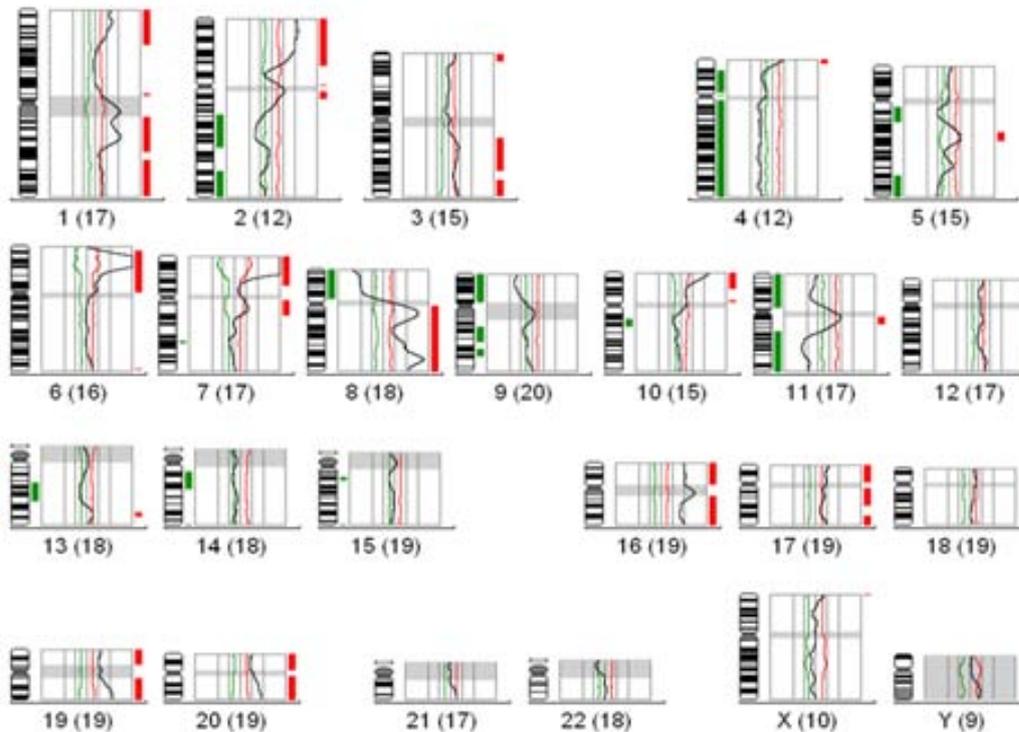


Figura 3.2.2. Perfil de CGH en un carcinoma urotelial de vejiga.

Reactivos y soluciones

Kit de CGH (Vysis)

Solución dTTP

10 μ l 0,3 mM dTTP

20 μ l *Nuclease Free water*

Proporción 1:2

Solución dNTP Mix

10 μ l 0,3 mM dATP

10 μ l 0,3 mM dCTP

10 μ l 0,3 mM dGTP

Proporción 1:1:1

Spectrum Green (Vysis)

10 μ l 1mM dUTP

40 μ l *Nuclease Free water*

Proporción 1:4

Spectrum Red (Vysis)

10 μ l 1mM dUTP

80 μ l *Nuclease Free water*

Proporción 1:8

20xSSC, pH 5,3

175,32 g NaCl

88,22 g Citrato sódico

Añadir ddH₂O hasta un litro.

0,4xSSC/0,3% NP-40, pH 7

20 ml 20xSSC

950 ml ddH₂O

3 ml NP-40

2xSSC/0,1% NP-40, pH 7

100 ml 20xSSC

850 ml ddH₂O

1 ml NP-40

DAPI 125ng/ μ l

Realizar una dilución secuencial a 1/10 y 1/40 en H₂O miliQ a partir de la dilución madre (DAPI 1mg/ml). De esta última solución se toman 50 μ l, que junto con 50 μ l de

H₂O miliQ y 900µl de solución antifade (vectashield), conforman la dilución de trabajo de DAPI.

3.2.4. HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA EN ARRAY DE BACs (aCGH)

Los fundamentos de la CGH convencional y CGH en arrays son básicamente los mismos. Sin embargo en la cCGH la hibridación se realiza sobre cromosomas metafásicos normales, y en la aCGH se realiza sobre una matriz que contiene clones BACs y P1, que cubren parcial o totalmente el genoma humano. Las ventajas y limitaciones vienen siendo las mismas, exceptuando en lo que se refiere a la resolución que es mucho mayor pudiéndose alcanzar una resolución de 1Mb (figura 3.2.3).

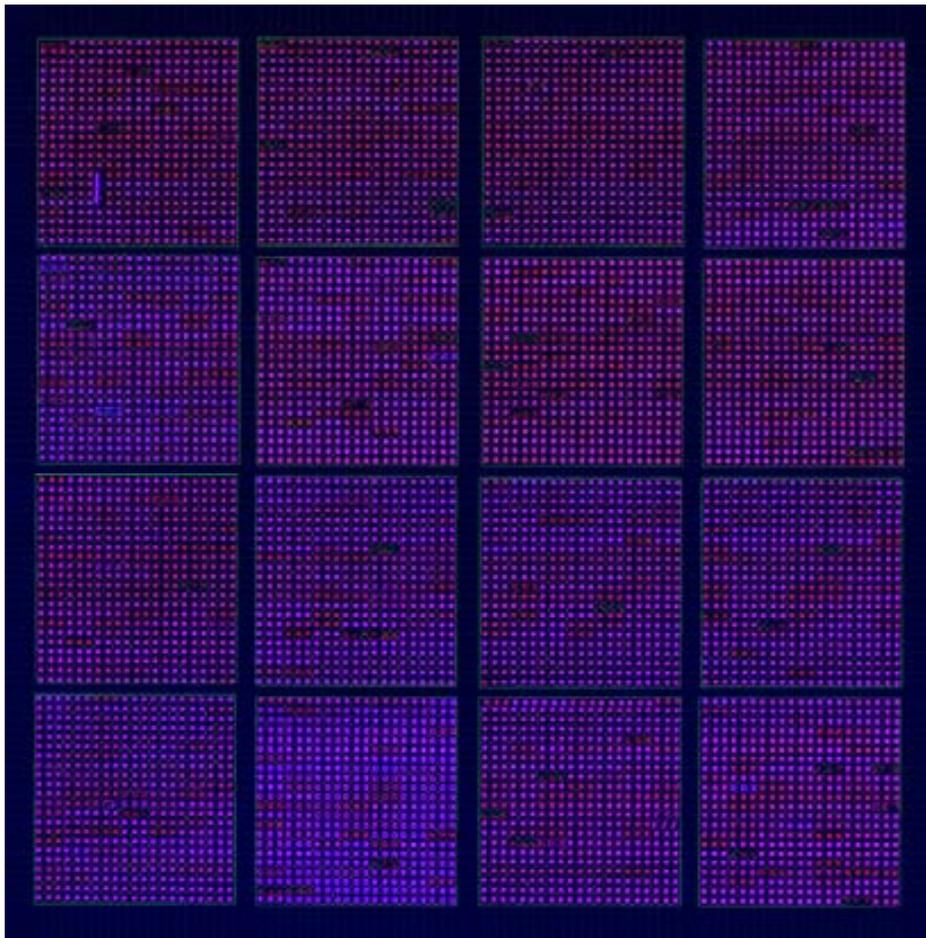


Figura 3.2.3. Imagen de hibridación de una de las muestras sobre un array de BACs

Array de BACs

Los arrays HUM3.1 se obtuvieron del University of California San Francisco Cancer Center Array Core facility. Los arrays consisten en 2.464 clones de cromosomas artificiales de bacteria (BAC) o P1 impresos por triplicado, que cubren el genoma humano con una resolución de 1Mb. Una mezcla de DNA de linfocitos procedentes de individuos normales se utilizó como control para las hibridaciones. (Promega, Madison, WI).

Reacción de amplificación mediante *Random Priming*

- 1- Preparar en un tubo eppendorf de 200 μ l de la mezcla de la reacción de amplificación consistente en:
 - (22 -x) μ l *Nuclease free water*
 - x μ l DNA (x =50-100ng totales)
 - 10 μ l 2.5x RP Mix
- 2- Hacer vortex y *spin*.
- 3- Mantener 10 min a 100 °C en la maquina de PCR.
- 4- Mantener en Hielo durante 10 min.
- 5- Añadir
 - 2,5 μ l de RPA dNTPs (2mM)
 - 0,5 μ l Enzima Klenow
- 6- Hacer *vortex* y *spin*.
- 7- Incubar 2 horas a 37°C
- 8- Dejar enfriar las muestras y hacer *spin*.

Reacción de purificación MinElute Qiagen

- 1- Añadir 125 μ l de buffer PB a la reacción de PCR (5 volúmenes)
- 2- Pasar la reacción a la columna y centrifugar un minuto a 10.000 rcf, descartar el eluido.

- 3- Añadir 750 μ l de Buffer PE a la columna MinElute y centrifugar a 10.000 xg, descartar el eluido.
- 4- Centrifugar nuevamente 1 min a 10.000 rcf
- 5- Colocar la columna en un nuevo tubo.
- 6- Añadir 12 μ l de buffer de elución, y dejar la columna reposar durante 4min.
- 7- Centrifugar 1 min a 10.000 g.

Reacción de marcaje mediante *Random priming*

Se realizan dos reacciones por separado para la muestra y el control usando fluorocromos distintos, en nuestro caso Cy3 para la muestra problema y Cy5 para el control.

- 1- Preparar en un tubo eppendorf de 200 μ l la de la reacción de amplificación consistente en:
 - 11 μ l de producto de amplificación de *Random priming*
 - 10 μ l 2.5x RP Mix
- 2- Hacer vortex y *spin*.
- 3- Mantener 10min a 100 °C en la maquina de PCR.
- 4- Mantener en hielo durante10min.
- 5- Añadir
 - 2,5 μ l de RPA dNTPs (2mM)
 - 0,5 μ l Enzima Klenow Añadir
 - 1 μ l Cy3 dCTP (muestra) / Cy5 dCTP (control)
- 6- Hacer vortex y *spin*.
- 7- Incubar 3 horas a 37°C.
- 8- Dejar enfriar las muestras y hacer *spin*.

Preparación del *array*

- 1- Irradiación ultravioleta de los *arrays* (*auto-crosslink*).
- 2- Aplicar un marco de pegatina azul sobre los *arrays* para delimitarlos.

Purificación de los productos de marcaje de *random priming* en columnas de sephadex

- 1- Dejar que la muestra marcada se atempere.
- 2- Mezclar la columna mediante agitación, eliminar el tapón inferior e introducir la columna en un tubo de 1,5ml.
- 3- Centrifugar 1min a 735 g a temperatura ambiente.
- 4- Poner la columna en un nuevo tubo, añadir 25 µl de la sonda (la columna admite un máximo aproximado de 50 µl).
- 5- Centrifugar 2 min a 735 g a temperatura ambiente.
- 6- El eluido recuperado, será nuestra sonda ya purificada (guardar 1 µl para el nanodrop)

Precipitación de la sonda e hibridación

- 1- Descongelar el DNA Cot-1 y centrifugar en la picocentrífuga durante 1 min, encender placa calefactora de portas, baño a 70 °C y centrifuga a 4 °C.
- 2- Se mezclan el producto de las columnas de Sephadex (DNA control y tumoral) y con 100 µl de DNA Cot-1 humano y se mezclan con pipeta.
- 3- Añadir 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M pH 5,5.
- 4- Añadir 2,5 volúmenes de EtOH 100% frío.
- 5- Mezclar por inversión.
- 6- Centrifugar durante 30 min a 14.000 rpm a 4 °C.
- 7- Decantar el sobrenadante y dejar secar durante 5min. Secar los restos de EtOH con la punta de un pañuelo de papel sin tocar el botón y dejar secar 5 min más.
- 8- Atemperar la solución Master Mix 1 a temperatura ambiente.
- 9- Preparar la mix conteniendo 6 µl de tRNA de levadura, 8 µl 20%SDS y 4 µl de H₂O.
- 10- Añadir 18 µl de Mix a cada muestra, no resuspender, dejar reposar 5 min.
- 11- Vortex y *spin*, dejar reposar 5 min.
- 12- Repetir el paso anterior.

- 13- Añadir 42 μ l de solución Master Mix 1.
- 14- Vortex y *spin*, dejar reposar 5 min.
- 15- Repetir el paso anterior.
- 16- Desnaturalizar la mezcla de la sonda en un baño a 70 °C durante 15min, dejar prehibridar 30-60 min a 37 °C, poner el array en la placa calefactora durante 30 min.
- 17- Hacer un *spin* de las sondas, resuspender mediante pipeteo, depositar la sonda en el array y mover hasta cubrirlo completamente.
- 18- Incubar en cámara húmeda a 37°C durante 2-3 noches en balanceo continuo sobre una plataforma móvil, cambiando los portas de posición cada aproximadamente 12 horas.

Análisis de datos

Las imágenes fueron analizadas utilizando los *Softwares Spot y Sproc* de la Universidad de California San Francisco. El programa *Sproc* elimina de forma automática los puntos que presentan baja intensidad de 4'-6 diamidino-2-phenylindole, baja correlación entre Cy3 y Cy5 y baja señal control/4'-6 diamidino-2-phenylindole. Para cada clon, se calcula el ratio medio de control/muestra de las tres réplicas de cada clon. Los resultados son filtrados, eliminándose todos aquellos clones polimórficos, no-mapados, también se eliminan los clones para los cuales sólo se dispone información de una las tres réplicas, aquellos cuya desviación estándar (SD) es superior a 0,2 y los clones que estaban presentes en menos de un 75% de las muestras analizadas. También se eliminó un grupo de clones *outlier*.

Se utilizó el borrador de la secuencia del DNA humano de Julio del 2003 de <http://genome.ucsc.edu/> para mapear los clones. Los Ratios Log₂ de cada caso fueron normalizados a cero.

Los resultados del array se analizaron mediante segmentación circular binaria para traducir las mediciones del ruido de fondo en regiones de igual número de copias. A cada sonda se le asignó un valor de segmento en referencia a su valor suavizado. La desviación de la media absoluta escalada de la diferencia entre los valores observados y suavizados se usó para estimar la variación experimental tumor específica. Las ganancias y pérdidas de cada clon fueron definidas usando el procedimiento de fusión

de nivel. La amplificación de un clon se determinó teniendo en consideración el tamaño del segmento al que el clon pertenece y el valor suavizado del clon y las medias de los segmentos vecinos. Los clones se consideraron amplificados si presentaban un \log_2 ratio superior a 0,9 y pertenecían a un segmento menor de 10 Mb, siendo la diferencia de \log_2 ratio superior a 0,5 respecto a los segmentos flanqueantes. Los clones con ratios \log_2 menores a 0,75 se consideraron pérdidas de bajo nivel.

3.2.5. CROMOSOMAS ARTIFICIALES DE BACTERIAS (BACs)

Esta técnica se basa en la clonación y amplificación selectiva de un fragmento o secuencia de DNA de interés (inserto), mediante la utilización de una secuencia de DNA con capacidad autorreplicativa (vector) dentro de una célula huésped.

El vector que contiene nuestra secuencia de interés se introduce en la célula huésped, que mediante división celular también dará lugar a la amplificación del inserto.

Los vectores han de presentar los siguientes elementos útiles para la clonación: Gen de resistencia a antibiótico y lugar múltiple de clonación. El gen de resistencia a antibiótico ofrece resistencia a las bacterias transformadas por el vector, además únicamente los vectores recombinantes pierden la actividad β -galactosidasa. Lo que permite seleccionar los clones bacterianos transformados por el vector con inserto.

El fragmento amplificado puede marcarse directamente con un fluorocromo y ser utilizado como sonda de FISH. La técnica de FISH en interfase con sondas de BAC/PACs permite detectar ganancias o pérdidas de zonas del genoma previamente identificadas mediante CGH. Además, la FISH con BACs ha demostrado ser más sensible que la CGH para detectar pequeñas deleciones del tamaño de las sondas de BAC (aproximadamente 150Kb), mientras que la CGH tiene una resolución de 10Mb. Otra ventaja de la FISH, es la posibilidad de detectar las alteraciones presentes en una pequeña fracción de células (Andersen, et al. 2004).

Los genes analizados y los clones utilizados como sonda para ello, se muestran en la tabla 3.2.1.

Tabla 3.2.1. Clones utilizados, localización y genes contenidos

Gen	Banda	Clon
<i>CKS1B</i>	1q21.2	RP11-624P09
<i>UHMK1 (KIS)</i>	1q23.3	RP11-130F05
<i>CDKN1B</i>	12p13.1	RP11-113I21
<i>TRIO</i>	5p15.2	RP11-121K01
<i>SKP2</i>	5p13	RP11-612J21
<i>FGF10</i>	5p12	RP11-760E04
<i>CCNE</i>	19q12	CTD-3087O4
<i>E2F3</i>	6p22.3	RP11-159C08

Además, como referencia del número de copias de los cromosomas donde se hallan estos genes, se han utilizado como sonda los clones RP11-91L5 (19p13.1) y RP4-646P11 (1q21.1) y DNA alfoide de los cromosomas 6 y 12.

Cultivo de BACs

Hemos de trabajar siempre en ambiente estéril dentro de una campana y junto a una llama. Podemos iniciar nuestro cultivo a partir de un *stock* de células en glicerol almacenadas a -80°C, un cultivo líquido o un cultivo sólido.

- 1- Añadir 10 ml de cultivo 2YT en un tubo de 50 ml, junto con el antibiótico correspondiente a la concentración final adecuada (Ampicilina [50 µg/ml], Cloramfenicol [20 µg/ml] o Kanamicina [25µg/ml]). La resistencia al antibiótico puede variar de un vector a otro.
- 2- Inocular la bacteria con una asa y cultivar a 37°C en agitación a 250 rpm *overnight*.

Extracción y purificación

- 3- Centrifugar el tubo a 4000 rpm durante 10 min y decantar el sobrenadante.
- 4- Resuspender el botón celular en 200 µl de GTE.
- 5- Transferir la suspensión a un tubo de 2 ml.
- 6- Añadir 400 µl de solución de desnaturalización recién hecha a TA.
- 7- Mezclar por inversión y mantener en hielo hasta un máximo de 5 min (ir invirtiendo varias veces a lo largo de este tiempo).

- 8- Añadir 300 μ l de acetato sódico 3M pH 5-5,2.
- 9- Mezclar por inversión y mantener en hielo hasta un máximo de 10 min (ir invirtiendo varias veces a lo largo de este tiempo).
- 10- Centrifugar 10 min a 14000 rpm y recuperar el sobrenadante en un nuevo eppendorf de 2ml.
- 11- Aplicar 1 volumen de fenol y centrifugar a 12500 rpm, para eliminar proteínas.
- 12- Recuperar en un nuevo tubo de 2 ml solamente la fase líquida superior, sin recoger nada de la fase blanca, que contiene las proteínas.
- 13- Añadir 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M y 2,5 volúmenes de EtOH 100% frío.
- 14- Precipitar: *Overnight* a -20°C o 1h a -80°C .
- 15- Centrifugar a -4°C durante 30 min a 14000rpm.
- 16- Descartar el sobrenadante.
- 17- Lavar el botón con 500 μ l de EtOH 70% frío.
- 18- Centrifugar a -4°C durante 5 min a 14000 rpm.
- 19- Descartar el sobrenadante.
- 20- Secar los restos de EtOH con la punta de un pañuelo de papel sin tocar el botón e introducir el tubo abierto en una estufa a 37°C durante 5 min para evaporar el EtOH.
- 21- Resuspender en 50-100 μ l de agua estéril, dependiendo del tamaño del botón.
- 22- Añadir 5 μ l de RNasa a 100 μ g/ml e incubar durante 15 min a 65°C .
- 23- La solución de DNA obtenida se almacena a -20°C .

Marcaje de la sonda mediante *Nick Translation*

- 24- Preparar en un tubo eppendorf la mezcla de la reacción de *Nick Translation* consistente en:
 - 5 μ l 0,1mM dTTP
 - 5 μ l 10x*Nick Translation Buffer*

- 10 μ l 0,1mM dNTP Mix
- (22,5-x) μ l *Nuclease free water*
- x μ l DNA del BAC (x =700-1000ng totales)
- 2,5 μ l *Spectrum Green* dUTP o *Spectrum Red* (uno o otro según necesidad)
- 5 μ l *Nick translation Enzyme*

25- Vortex breve y *spin*

26- La reacción se realiza a 15-18°C durante 1 hora y 30 minutos.

27- Parar reacción a 70°C durante 10 min.

Precipitación de la sonda

28- Se mezclan el producto de la reacción junto con 5 μ l de DNA Cot-1 humano (10ng) y 6 μ l de DNA de esperma de Salmón (Sonicated Salmon Sperm DNA Phenol Extracted, Amersham Biosciences), para bloquear las secuencias repetitivas del genoma y evitar falsos positivos en la FISH.

29- Añadir 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M pH 5,5.

30- Añadir 2,5 volúmenes de EtOH 100% frío.

31- Mezclar por inversión.

32- Precipitar en congelador un mínimo de 30 min.

33- Centrifugar durante 30 min a 13.000 rpm.

34- Decantar el sobrenadante y secar los restos de EtOH con la punta de un pañuelo de papel, sin tocar el botón.

35- Dejar secar el botón en una estufa a 37°C durante aproximadamente 8 min.

36- Dejar resuspender el botón en 6 μ l de solución de hibridación, se realizan varios vortex seguidos de un *spin* en la centrifuga, hasta resuspender totalmente.

37- Guardar la sonda a -20°C hasta el momento de su utilización.

Validación de las sondas de BACs sobre metafases normales

Con el objetivo de descartar posibles errores en la manipulación de los BACs, como problemas de contaminación y para descartar posibles problemas de hibridación inespecífica, todos los BACs han sido validados mediante la hibridación de los mismos sobre extensiones metafásicas de individuos controles (figura 3.2.4).

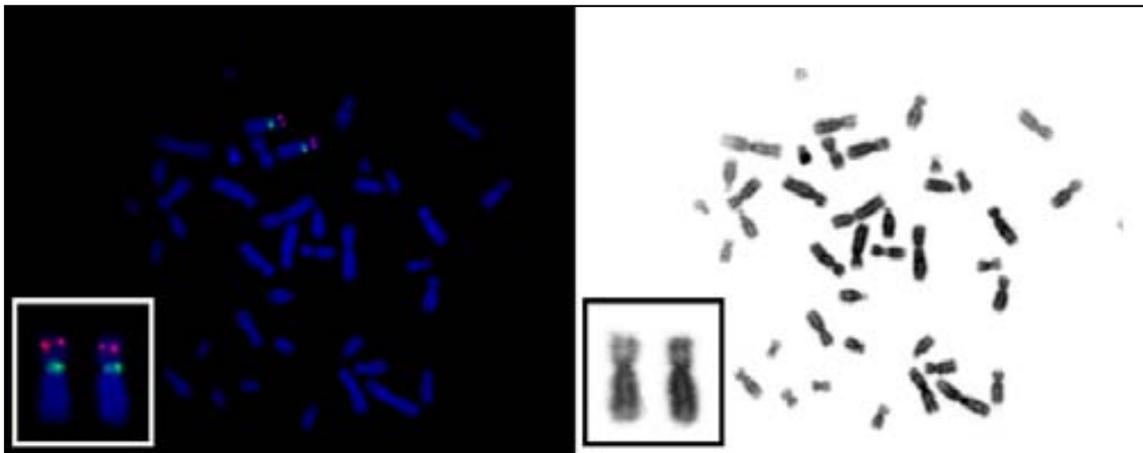


Figura 3.2.4. Imagen de FISH de validación de los BACs sobre metafases normales, y contratiñción con DAPI. En rojo se muestra el clon RP11-159C08 y en verde DNA alfoide del cromosoma 6.

Envejecimiento

38- El envejecimiento de los portas de linfocitos puede realizarse de 3 formas:

- En estufa overnight a 65°C
- 3 días a temperatura ambiente
- 30 min en solución 2xSSC pH7 a 37°C

Postfijación

39- Realizar lavado de 5 min en PBS1x a TA.

40- Deshidratar el porta en una serie creciente de etanoles:

- En etanol 70% 1 min.
- En etanol 85% 1 min.

- En etanol 100% 1 min
- 41- Secar el porta al aire
- 42- Tratamiento de 5 min con pepsina a 37°C (Introducir la pepsina justo antes de la muestra, el tiempo puede adaptarse a la cantidad de citoplasma de la muestra).
- 43- Lavar 2 veces el porta durante 5 min en 2xSSC
- 44- Fijar el material en formaldehído 1% durante 2 min a TA.
- 45- Realizar 2 lavados de 5 min en PBS1x a TA.
- 46- Deshidratar el porta en una serie creciente de etanoles:
 - En etanol 70% 1 min.
 - En etanol 85% 1 min.
 - En etanol 100% 1 min

Desnaturalización e Hibridación

- 47- Desnaturalizar el porta a 74°C en una solución de formamida 70% durante 2-3 min
- 48- Deshidratar el porta en una serie creciente de etanol:
 - En etanol 70% 1 min.
 - En etanol 85% 1 min.
 - En etanol 100% 1 min.
- 49- Secar el porta al aire.
- 50- Desnaturalizar la sonda durante 5 min a 74°C.
- 51- Aplicar la sonda sobre el porta.
- 52- Poner el cubre y sellar los bordes con cola para evitar la evaporación de la sonda.
- 53- Hibridar en cámara húmeda a 37°C *overnight*.

Lavados Post-Hibridación

- 54- Retirar el cubre y restos de cola del porta

55- Lavar el porta en una solución de 0.4xSSC/0.3%NP-40 a 74% durante 2 min, agitando el porta los primeros segundos.

56- Lavar el porta en una solución de 2xSSC/0.1%NP-40 a TA durante 2 min, agitando unos segundos.

Contratinción

57- Secar el porta al aire.

58- Aplicar 12µl de solución DAPI 125ng/µl diluido en Vectashield.

59- Colocar el cubre.

60- Guardar en nevera hasta el análisis.

Soluciones

Medio 2YT, pH 7

1,6 g de Bacto-triptona

1 g de Extracto de levadura

0,5 g NaCl

Añadir ddH₂O hasta 100ml

Solución GTE

Glucosa 50mM

Tris pH8 24mM

EDTA 10mM

Solución de desnaturalización

0,2N NaOH

1% SDS

PBS1x, pH 7.0

8 g NaCl

0,2 g HCl

1,15 g Na₂HPO₄

0,2 g KH_2PO_4

Añadir ddH₂O hasta un litro.

Solución de formaldehído 1%

41.14 ml ddH₂O

2.5 ml MgCl_2 1M

5 ml 10xPBS

1.35 ml Formaldehído 37%

Solución de pepsina

49,5 ml de H₂O

0.5 ml HCl 1N

25 μl de pepsina (100mg/ml)

20xSSC, pH 5.3

175,32 g NaCl

88,22 g Citrato sódico

Añadir ddH₂O hasta un litro.

2xSSC, pH7

100 ml 20xSSC

Añadir ddH₂O hasta un litro.

0,4xSSC/0,3% NP-40, pH 7

20 ml 20xSSC

950 ml ddH₂O

3 ml NP-40

2xSSC/0,1% NP-40, pH 7

100 ml 20xSSC

850 ml ddH₂O

1 ml NP-40

3.2.6. ARRAY DE TEJIDOS

El array de tejidos permite el análisis simultáneo del número de copias de DNA, RNA y proteína mediante el uso de la hibridación *in situ* e inmunohistoquímica. Esta técnica nos proporciona un eficiente método de evaluación alteraciones genómicas, de expresión de RNA y proteína en estudios de grandes cohortes usando tejidos archivados fijados en formalina e incluidos en parafina (Chen, et al. 2003).

Los TMAs se construyen mediante la colocación en alta densidad de cilindros de tejido o núcleos de 0,6mm de diametro procedentes de tejido parafinado en un nuevo bloque de parafina. Centenares de cilindros pueden ser depositados en el bloque del TMA y se pueden realizar de 100 a 400 secciones consecutivas por bloque (Figura 3.6.1). Cada portaobjetos individual puede ser analizado con la misma metodología que el bloque de parafina original. Esto implica que podemos analizar cada tumor incluido en el array, tantas veces como secciones del array se realicen. En cada corte la posición relativa de cada tumor permanece inalterada, de este modo se agiliza enormemente el análisis de las muestras. El análisis sobre el array se realiza a nivel celular.

En el presente trabajo se han construido tres arrays de tejidos uno en el departamento de Urología del Hospital del Mar de Barcelona y dos en el departamento de Anatomía Patológica de la Fundación Puigvert de Barcelona. De cada bloque de parafina se han seleccionado las áreas más representativas del tumor y se han tomado de uno a tres cilindros por cada caso. Cilindros de otros tejidos se incluyeron al azar en el array como controles.

Para el estudio del papel pronóstico de los genes *EGFR*, *CMYC*, *CCND1* y locus 9p21 se construyó un array de 210 cilindros, incluyendo 152 tumores de vejiga distintos (apartado 4.4).

Para el estudio y validación de las regiones de amplificación detectadas mediante aCGH (apartado 4.2) se construirán 2 arrays de tejido: un array que contenía 27 tumores por triplicado y dos controles de amígdala y un segundo array que contenía 24 cilindros correspondientes a 13 tumores distintos (6 de los cuales, estaban incluidos en el primer array).

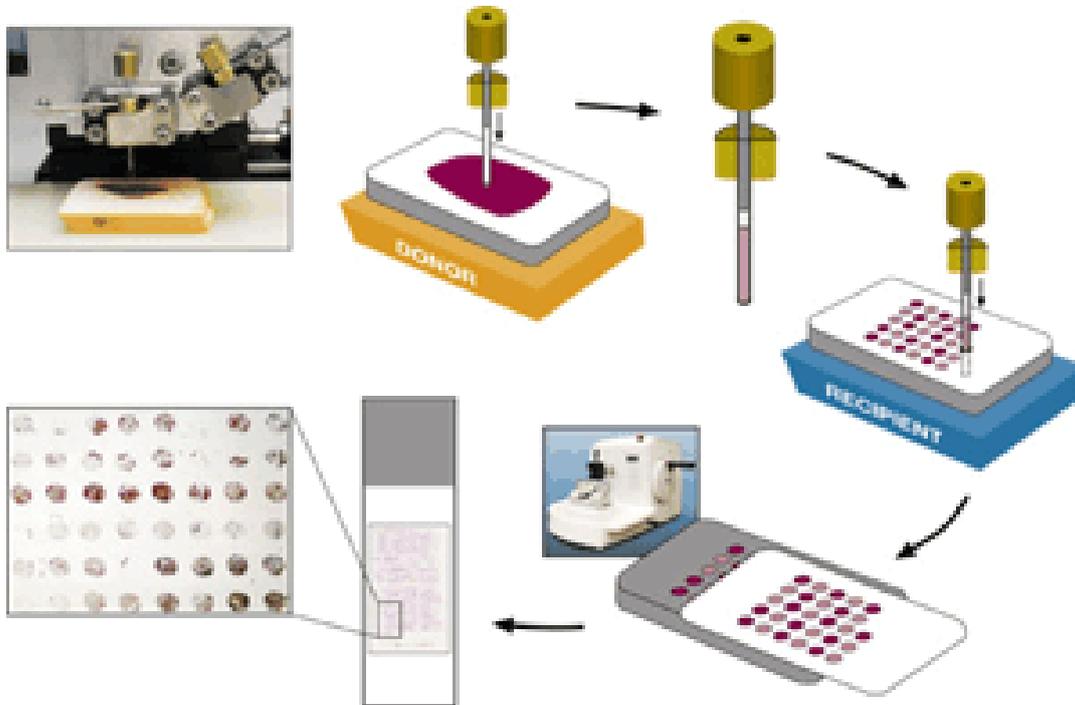


Figura 3.2.5. Construcción de un TMA, a partir de tejidos parafinados

3.2.7. FISH EN ARRAY DE TEJIDOS Y EN TEJIDOS PARAFINADOS

La técnica de hibridación in situ fluorescente (FISH, del inglés *fluorescence in situ hybridization*), a diferencia de las técnicas de hibridación genómica comparada, no proporciona información global del genoma. Entre sus ventajas podemos destacar que permite analizar las células individualmente y tiene una alta resolución cuando se trata de analizar genes concretos. Esta técnica se ha utilizado para el análisis de la inestabilidad cromosómica (apartado 4.3), para la validación de regiones de amplificación detectadas por aCGH (apartado 4.2) y para estudiar el papel pronóstico de los genes *CCND1*, *EGFR*, *CMYC* y el locus 9p21 en una amplia serie de tumores (apartado 4.4).

Como sondas para la FISH se han utilizado los BACs indicados en el apartado 3.2.5 y las siguientes sondas comerciales (Vysis Inc., Downers Grove, IL):

LSI cyclin D1 SpectrumOrange/ CEP 11 SpectrumGreen;

LSI EGFR SpectrumOrange / CEP 7 SpectrumGreen;

LSI LPL SpectrumOrange / LSI CMYC SpectrumGreen / CEP 8 SpectrumAqua;

CEP 9 Spectrum Green / locus specific 9p21 Spectrum Orange. La sonda 9p21 locus-specifica cubre los genes CDKN2A/p16, CDKN2B/p15INK4B y ARF/p14 ARF.

Esta técnica se ha aplicado a muestras incluidas en parafina en preparaciones individuales y en TMA según el procedimiento que se describe a continuación:

Desparafinización y preparación del TMA

- 1- Introducir el porta de media hora a toda la noche en una estufa a 65°C.
- 2- Dejar enfriar el porta
- 3- Se realizan 3 incubaciones consecutivas de 10 min en Xilol.
- 4- Introducir el porta en EtOH 100% durante 5 min, dos veces.
- 5- Rehidratar el porta en una serie de etanoles de concentración decreciente (5 min en EtOH 80% y 5 min en EtOH 70%).
- 6- Introducir el porta en H₂O tridestilada y mantenerlo hasta el siguiente paso.
- 7- Incubación en EDTA1mM. Se realizan 3 tandas de incubación de 15 min en microondas a 300 W
- 8- Tratamiento de 20-30 min con pepsina a 37°C.
- 9- Parar la reacción introduciendo el porta 5 min en solución STOP preparada el mismo día.
- 10- Lavado del porta en H₂O y secado al aire (Se valora la digestión del citoplasma, en caso de quedar restos se repite el proceso desde el paso de la pepsina).
- 11- Fijar el material en solución de formaldehído 1% durante 10 min.
- 12- Realizar 2 lavados de 5min en 2xSSC
- 13- Secar el porta al aire.

Hibridación en Hybrite

- 14- Preparar una mezcla de sonda-buffer de hibridación en una proporción 1/7 o 2/8 y se aplica sobre la muestra.

15- Sellar el porta con cola, para evitar la evaporación de la sonda.

16- Humedecer unos pañuelos de papel y ponerlos en los laterales del Hybrite para mantener la cámara húmeda. Poner el porta en el interior, rellenar todos los espacios vacíos de la maquina con portaobjetos (sin muestra), con el objetivo de garantizar una distribución homogénea del calor.

17- Programar el aparato a 5 min a 78°C y después *ON* a 37°C.

Lavados Post-Hibridación

18- Retirar el cubre y restos de cola del porta

19- Lavar el porta en una solución de 0.4xSSC/0.3%NP-40 a 74% durante 2 min, agitando el porta los primeros segundos.

20- Lavar el porta en una solución de 2xSSC/0.3%NP-40 a TA durante 2 min, agitando unos segundos.

Contratinción

21- Secar el porta al aire.

22- Aplicar 12µl de solución DAPI 125ng/µl diluido en Vectashield.

23- Colocar el cubre.

24- Guardar en nevera hasta el análisis.

Soluciones

PBS1x, pH 7.0

8 g NaCl

0,2 g HCl

1,15 g Na₂HPO₄

0,2 g KH₂PO₄

Añadir ddH₂O hasta un litro.

20xSSC, pH 5.3

175,32 g NaCl

88,22 g Citrato sódico

Añadir ddH₂O hasta un litro.

2xSSC, pH7

100 ml 20xSSC

Añadir ddH₂O hasta un litro.

Solución de EDTA 1mM, pH 8

0.292 g EDTA en un litro de agua

Solución de pepsina

49,5 ml de H₂O

0.5 ml HCl 1N

25 µl de pepsina (100mg/ml)

Solución STOP

50 ml PBS1x

2,5 ml Mg₂Cl 1M

Solución de formaldehído 1%

41.14 ml ddH₂O

2.5 ml MgCl₂ 1M

5 ml 10xPBS

1.35 ml 37% Formaldehído

0,4xSSC/0,3% NP-40, pH 7

20 ml 20xSSC

950 ml ddH₂O

3 ml NP-40

2xSSC/0,3% NP-40, pH 7

100 ml 20xSSC

850 ml ddH₂O

3 ml NP-40

Criterios de análisis

En cada caso se ha analizado un mínimo de 200 núcleos sin superposiciones.

Se ha considerado ganancia cuando el número de señales era superior a 2 en más de un 10% de las células. Se ha considerado alta ganancia cuando era igual o superior a 5.

La amplificación se ha considerado cuando se observaban numerosas señales (más de 10) separadas (como sucede con los diminutos dobles) o un cluster de señales compacto o en forma de cadena (HSR).

La pérdida se ha considerado cuando una única señal o ausencia de señal (pérdida en homocigosis) se observaba en al menos un 50% de los núcleos analizados.

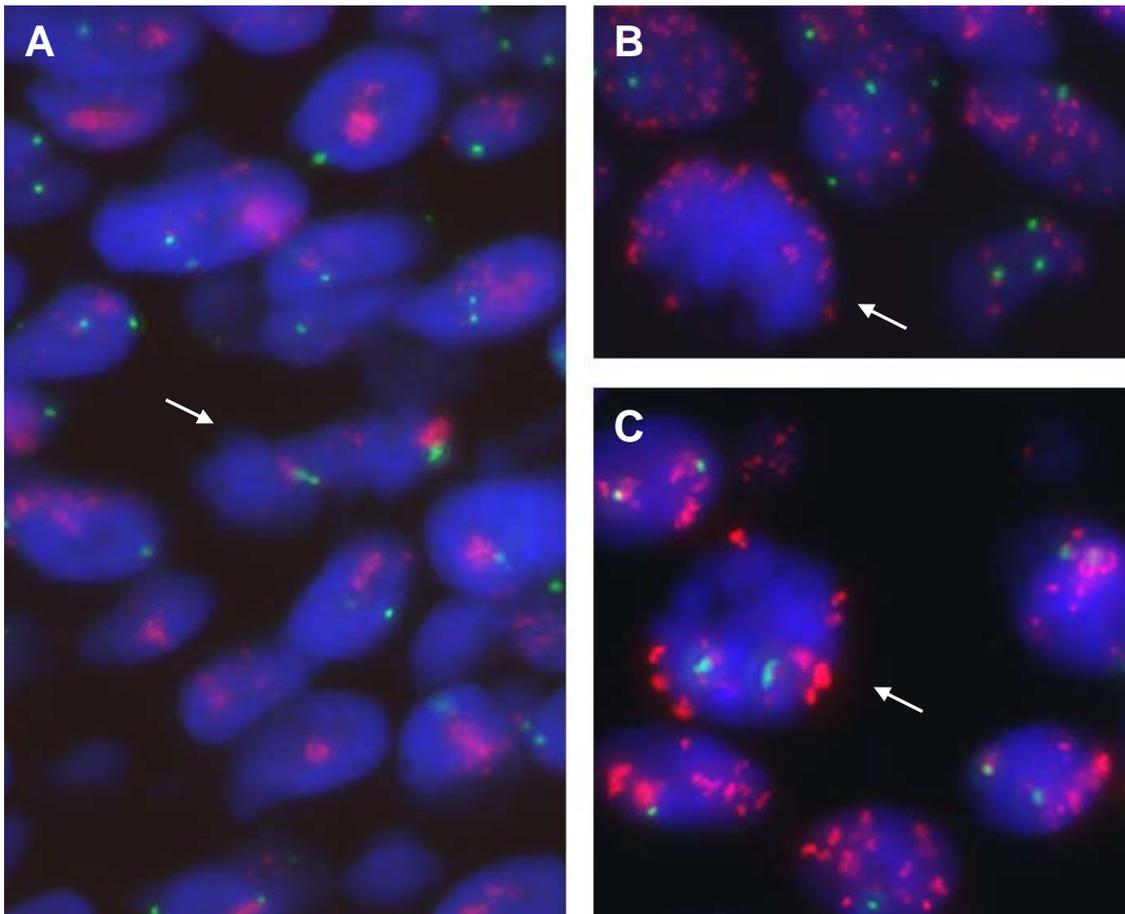


Figura 3.2.5. Imágenes de células con amplificación de *CCND1* en forma de HSR (A) y DM (B-C). Las flechas muestran las células metafásicas.

3.2.8. TINCIÓN INMUNOFUORESCENTE EN TEJIDO PARAFINADO

Mediante esta técnica se ha analizado el centrosoma en el apartado de inestabilidad cromosómica (4.3) y se ha estudiado la expresión de las proteínas SKP2, CKS1B, p27 y pRB en el apartado 4.2.

Para el análisis del centrosoma se han utilizado: el anticuerpo γ -tubulina (T3559, Sigma-Aldrich, dil 1: 100), anti α -tubulina (T 5168, Sigma-Aldrich, dil 1: 200) anti β -tubulina (T 4026, Sigma-Aldrich, dil 1: 200).

Para el análisis de las proteínas SKP2, CKS1, p27, pRB se han utilizado los siguientes anticuerpos: Cks1(anti-Cks1, C-term; Zyme, dil 1:100), Skp2 (H-435; Santa Cruz biotechnology, dil 1: 100), p27 (F-8; Santa Cruz biotechnology, dil 1: 50), pRb (IF8; Santa Cruz biotechnology, 1: dil 100) y p-Rb (Ser807/811; Santa Cruz biotechnology, dil 1: 100).

Esta técnica se ha aplicado a muestras incluidas en parafina en preparaciones individuales y en TMA según el procedimiento que se describe a continuación:

- 1- Introducir el porta de media hora a toda la noche en una estufa a 65°C.
- 2- Dejar enfriar el porta
- 3- Se realizan 3 incubaciones consecutivas de 10 min en Xilol.
- 4- Introducir el porta en EtOH 100% durante 10min, dos veces.
- 5- Rehidratar el porta en una serie de etanoles de concentración decreciente (5min en EtOH 80% y 5min en EtOH 70%).
- 6- Introducir el porta en ddH₂O y mantenerlo hasta el siguiente paso.
- 7- Incubación en solución de EDTA 1mM en microondas a 900 W durante 5 min, seguido de 10min a 300 W.
- 8- Lavar el porta en H₂O tridestilada.
- 9- Introducir el PBS1x pH 7,4.
- 10- Permeabilizar las membranas al anticuerpo durante 30 min en solución 1xPBS/0,05%Triton.

- 11- Bloquear el porta en solución PBTG durante 15min en agitación.
- 12- Aplicar el anticuerpo diluido en 100µl de PBTG a la concentración adecuada y cubrir el porta con un pedazo de parafilm.
- 13- Incubar a 4°C *overnight* en cámara húmeda.
- 14- Retirar el parafilm y realizar 3 lavados de 10 min en solución PBTG a 37°C en agitación
- 15- Aplicar el anticuerpo secundario conjugado a un fluorocromo FITC y Cy3 en una dilución 1/100 en PBTG para detectar la señal.
- 16- Hibridar 30 min a 37°C en cámara húmeda.
- 17- Se realizan 3 lavados de 10 min en PBS1x o PBTG a TA. (opcionalmente, se puede fijar la señal mediante la incubación en formaldehído 1% durante 10 min seguido de un lavado de 10 min en PBS1x)
- 25- Aplicar de solución DAPI 125ng/µl diluido en Vectashield.
- 26- Colocar el cubre.
- 18- Guardar en nevera hasta el análisis

Soluciones

PBS1x, pH 7.4

8 g NaCl

0,2 g HCl

1,15 g Na₂HPO₄

0,2 g KH₂PO₄

Añadir ddH₂O hasta un litro.

Solución de EDTA 1mM, pH 8

0.292 g EDTA en un litro de agua

Solución de formaldehído 1%

41.14 ml ddH₂O

2.5 ml MgCl₂ 1M

5 ml 10xPBS

1.35 ml 37% Formaldehído

PBTG

50 ml PBS1x, pH7,4

25 µl Tween20

0,1 g albúmina

1 punta de gelatina

Criterios de análisis

Para la medición de la longitud del centrómero se utilizó el *software MicroMeasure v3.3* (de: <http://www.biology.colostate.edu/micromeasure>). Se consideró la presencia de centrosomas supernumerarios siempre y cuando su número fuera ≥ 3 en al menos un 5% de las células. Los centrosomas se consideraron de un tamaño anormalmente grande cuando su diámetro era $\geq 2\mu\text{m}$.

Para el estudio de la expresión de las proteínas CKS1, SKP2, p27 y pRB se analizó un mínimo de 500 células en al menos tres campos distintos.

La expresión de SKP2 y CKS1 se consideró negativa cuando no se observó tinción nuclear o ésta se observó en alrededor de un 5% de las células concentradas en un foco. La expresión se consideró positiva cuando se observó tinción nuclear superior a un 5% y altamente positiva cuando la tinción superaba el 25% de núcleos marcados. La expresión de p27 se consideró alta cuando se detectaba en más de un 50% de las células y baja cuando se detectaba en menos de un 50%. Como control de la expresión de p27 se utilizaron los linfocitos presentes en la misma muestra.

Para el análisis de la expresión de pRB, se utilizaron dos anticuerpos: uno para el reconocimiento de la proteína y el otro para el reconocimiento del residuo fosforilado.

3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó el software SPSS (SPSS Inc; Chicago, IL, USA; Version 15.0). Se aplicó el test exacto de Fisher y Chi cuadrado para encontrar

asociaciones entre los distintas variables estudiadas (alteraciones encontradas mediante FISH, CGH , etc) con las características clinicopatológicas del tumor (Estadio, grado, multifocalidad etc).Se realizaron las curvas Kaplan-Meier y test de log rank para encontrar asociaciones entre los parámetros estudiados mediante FISH y tiempo libre de recurrencia, progresión tumoral y supervivencia de los pacientes. Se aplicó la regression de Cox para revelar cuales de las variables eran factores pronóstico independientes de recurrencia, progresión y supervivencia. Para el estudio de asociación entre las alteraciones halladas mediante CGH y los distintos grupos clínicos se ha aplicado un análisis de regresión logística. Todas aquellas asociaciones con un valor $P \leq 0,05$ se consideraron estadísticamente significativas.

Se ha calculado el ratio de incidencia estandarizada (SIR) para el cáncer de pulmón en una cohorte de pacientes aquejados de cáncer de vejiga no músculo infiltrante, respecto a la población general de Cataluña (Borras, et al. 2008), el SIR se define como el ratio entre casos observados y esperados (en este caso, pacientes con cáncer de pulmón), con un intervalo de confianza (IC) del 95% (Sahai and Khurshid 1993).

4. Resultados

4.1. DESEQUILIBRIOS GENÓMICOS EN CÁNCER DE VEJIGA

Los datos procedentes de la literatura (Blaveri, et al. 2005a; Simon, et al. 2000) y de estudios realizados en nuestro laboratorio (Prat, et al. 2001; Prat, et al. 2008) indican que los carcinomas uroteliales de vejiga son heterogéneos, presentan numerosos desequilibrios genómicos y muestran diferentes vías o patrones de progresión. La mayoría de estos datos se han obtenido a partir de estudios retrospectivos, por ello nos propusimos realizar un estudio prospectivo de una amplia serie de tumores con el fin de aportar nuevos datos de interés en el proceso de la carcinogénesis urotelial.

Con este objetivo, se analizaron 180 tumores de vejiga mediante la técnica de hibridación genómica comparada en cromosomas metafásicos (cCGH). Las muestras tumorales fueron obtenidas mediante cirugía (resección transuretral o cistectomía). De los 180 tumores, 99 eran Ta (70 TaGb y 29 TaGa), 35 T1 (10 T1Gb y 25 T1Ga) y 46 T2-T4, todas las muestras fueron obtenidas de forma consecutiva del Departamento de Urología de la Fundación Puigvert de Barcelona. Los tumores se clasificaron en cinco grupos de acuerdo con sus características histopatológicas y clínicas: Ta-T1 bajo grado, Ta alto grado, T1 alto grado, músculo infiltrante no-anaplásico y músculo infiltrante anaplásico. Dentro de los tumores Ta y T1 se consideró la presencia o no de CIS acompañante.

Las características clinicopatológicas de los pacientes y tumores se muestran en la tabla 4.1.1.

Tras la extracción quirúrgica, las muestras se congelaron de inmediato, y se almacenaron a -80°C hasta el momento del análisis. El patólogo examinó porciones de cada una de las muestras para confirmar la presencia de tumor, evaluar la morfología del tejido y el estadio. Los tumores se clasificaron de acuerdo a la clasificación WHO 2004 (Eble J.N. 2004). La técnica de cCGH se aplicó tal y como se ha descrito en el apartado 3.2.3.

Tabla 4.1.1. Características clínico-patológicas

	n	%
Estadio-grado		
pTaGb	70	38,9
pTaGa	29	16,1
pT1Gb	10	5,6
pT1Ga	25	13,9
pT2-T4	46	25,6
Sexo		
Hombre	149	82,8
Mujer	31	17,2
Seguimiento clínico		
Vivo	147	81,7
Muerto por tumor	23	12,8
Casos perdidos	10	5,5

4.1.1. DESEQUILIBRIOS CROMOSÓMICOS MÁS FRECUENTES

El 95% de los casos estudiados (172 de los 180 tumores) presentó algún tipo de desequilibrio genómico.

El número total de alteraciones por tumor varió de 0 a 33. De media se encontraron 8,85 alteraciones por tumor, de las cuales 6,11 eran ganancias (rango 0 a 24) y 2,73 pérdidas (rango de 0 a 14).

Se observó que la frecuencia de desequilibrios cromosómicos aumentaba al pasar de tumores no músculo infiltrantes a tumores músculo infiltrantes. Teniendo únicamente en cuenta los tumores no músculo infiltrantes se observó un promedio de alteraciones por tumor de 7,71, de las cuales 5,4 correspondían a ganancias y 2,31 a pérdidas. Por el contrario, los tumores músculo infiltrantes mostraron un promedio de 11,68 alteraciones por tumor, correspondiendo 7,88 a ganancias y 3,8 a pérdidas.

Exceptuando los tumores T1 de bajo grado, se observó un incremento de desequilibrios cromosómicos con el aumento de estadio y grado tumoral.

La distribución del número total de desequilibrios por estadio y grado del tumor se indica a continuación:

Ta bajo grado (n=70): 7,34 alteraciones por tumor: 5,47 ganancias y 1,87 pérdidas.

Ta alto grado (n=29): 8,75 alteraciones por tumor: 5,55 ganancias y 3,20 pérdidas.

T1 bajo grado (n=10): 5,3 alteraciones por tumor: 3,5 ganancias y 1,8 pérdidas.

T1 alto grado (n=25): 9,72 alteraciones por tumor: 6,48 ganancias y 3,24 pérdidas.

T2-T4 alto grado (n=46): 11,68 alteraciones por tumor: 7,88 ganancias y 3,8 pérdidas.

En general, se observó un predominio de las ganancias sobre las pérdidas en todos los estadios y grados.

Un 33% de los tumores presentaba un bajo número de alteraciones (≤ 5). Estos tumores correspondían a un 52% de los Ta de bajo grado, a un 36% de los Ta Ga, a un 60% de los T1Gb, a un 32% de los T1Ga y a un 32% de los tumores T2-T4.

Dentro de los tumores TaGb, un 30% presentaba ≥ 10 desequilibrios. El predominio de pérdidas sobre ganancias se observó únicamente en un 5% de los tumores analizados.

En el grupo de tumores TaGa, un 35% presentaba ≥ 10 desequilibrios. El predominio de pérdidas sobre ganancias se observó únicamente en un 6% de las muestras analizadas.

Dentro de los tumores T1, un 30% de los T1Gb y un 56% de los T1Ga presentaban ≥ 10 desequilibrios. El porcentaje de tumores con predominio de pérdidas era del 10% y 8% respectivamente. Un 68% de los tumores T2-T4 presentaba ≥ 10 desequilibrios, siendo el número ≥ 20 en una tercera parte de los mismos.

Un 25% (45/180) de los tumores presentaba amplificación de una o varias regiones cromosómicas. Dentro de los tumores no músculo infiltrantes un 14% (14/99) de los Ta y un 31% (11/35) de los T1 presentaban algún tipo de amplificación. Un 43% (20/46) de los tumores músculo infiltrantes presentaba amplificaciones.

Las alteraciones más frecuentes fueron las ganancias de 19p y 19q (presentes en más de un 40% de los casos), seguidas de las alteraciones +1q, -9p, +22q, +16p, +Y, -Y (más de 30% de los casos), +1p, -9q, +17q, +18p (más de un 20% de los casos)

Las bandas cromosómicas más frecuentemente implicadas en ganancias o pérdidas se indican en las tablas 4.1.2 y 4.1.3 respectivamente y en la figura 4.1.1.

Desequilibrios cromosómicos en tumores no músculo infiltrantes

Las alteraciones cromosómicas más frecuentes fueron las ganancias de 19p, 19q, (>50%), 1q, 16p, 22q, Xq, (>30%), 1p, 7q, 15p, 17q, 18p, 20q, (>20%) y las pérdidas de 9p, Yq (>30%), 9q, (>20%).

Las bandas cromosómicas más frecuentemente implicadas en ganancias y pérdidas se indican en las tablas 4.1.2 y 4.1.3 respectivamente y en la figura 4.1.2.

Desequilibrios cromosómicos en tumores músculo infiltrantes

Las alteraciones cromosómicas más frecuentes en los tumores $\geq T2$ fueron las ganancias de 19p, 19q (>50%), 1q, 16p, 20q, 22q (>40%), 1p, 10p, 11q, 17q, Xq, (>30%), 6p, 7p, 8q, 18p, 21q (>20%) y las pérdidas de Yq (>30%), 4q, 5q, 8p, 9p, 11q, 13q, 15q (>20%).

Las bandas cromosómicas más frecuentemente implicadas en ganancias y pérdidas se indican en las tablas 4.1.2 y 4.1.3 respectivamente y en la figura 4.1.3.

Tabla 4.1.2 Regiones y bandas cromosómicas frecuentemente ganadas en los tumores analizados

180 TUMORES			SUPERFICIALES			INFILTRANTES			INFILTRANTES			
Región cromosómica	Banda	% Ganancia	Región cromosómica	Banda	% ganancia	Región cromosómica	Banda	% ganancia	Región cromosómica	Banda	% ganancia	
1p36p34.2	1p36.3	41.67	1p36p34.3	1p36.3	42.54	1pterp33	1p36.3	39.13	19	19q13.1	69.57	
	1p36.2	36.67		1p36.2	35.07		1p36.2	41.30		19q13.2	69.57	
	1p36.1	33.33		1p36.1	32.84		1p36.1	34.78		19q13.3	58.70	
	1p35	27.78		1p35	25.37		1p35	34.78		19q13.4	47.83	
	1p34.3	22.78		1p34.3	20.90		1p34.3	28.26		20p11.2	26.09	
1p13.1q22	1p34.2	21.11	1p13.1q21.3	1p13.1	23.88	1p13.1q23	1p34.2	32.61	20p11.2q13.3	20q11.2	39.13	
	1p34.1	25.00		1p12	44.78		1p34.1	28.26		20q12	43.48	
	1p12	45.56		1q21.1	38.81		1p33	26.09		20q13.1	43.48	
	1q21.1	39.44		1q21.2	30.60		1p13.1	28.26		20q13.2	39.13	
	1q21.2	32.78		1q21.3	25.37		1p12	47.83		20q13.3	36.96	
7q11.2	1q21.3	28.89	7q11.2	7q11.2	20.90	1q21.1	1q21.1	41.30	21q22.2	21q22.2	23.91	
	1q22	22.78		9q13	29.85		1q21.2	39.13		22q	22q11.2	32.61
	7q11.2	21.11		15p	20.90		1q21.3	39.13		22q12.1	39.13	
	16p13q12.2	25.00		15p12	20.15		1q22	32.61		22q12.2	43.48	
	16p13.2	25.00		16p13.3	22.39		1q23	30.43		22q12.3	43.48	
17q11.1q21.2	16p13.1	26.11	16p13q12.2	16p13.2	22.39	6p24q22.1	6p24	21.74	Xp11.2q12	22q13.1	36.96	
	16p12	27.22		16p13.1	23.88		6p23	28.26		22q13.2	34.78	
	16p11.2	35.00		16p12	24.63		6p22.2	26.09		22q13.3	23.91	
	16q12.1	41.67		16p11.2	32.84		6p22.1	23.91		Xp11.2	32.61	
	16q12.2	22.78		16q12.1	44.03		7p22	23.91		Xq11.1	34.78	
17q11.1q21.2	17q11.2	21.67	17q11.2q21.2	16q12.2	23.13	7p22	7p22	21.74	Yq11.2	Xq11.2	26.09	
	17q12	21.67		17q11.1	21.64		7q11.2	21.74		Yq11.2	23.91	
	17q21.1	26.11		17q21.1	23.88		8q24.2	26.09				
	17q21.2	23.33		17q21.2	20.15		8q24.2q24.3	28.26				
	17q25	27.22		17q25	23.88		9q13q21.1	34.78				
18p11.2	18p11.2	25.00	17q25	18p11.2	23.88	10p15p13	9q21.1	21.74	Xp11.2q12	22q13.3	23.91	
	19p13.3	58.33		18p11.2	23.88		10p15	30.43		Xp11.2	32.61	
	19p13.2	55.00		19p13.3	59.70		10p14	26.09		Xq11.1	34.78	
	19p13.1	52.78		19p13.2	53.73		10p13	21.74		Xq11.2	26.09	
	19p12	58.33		19p13.1	52.24		11q13.1q13.3	34.78		Yq11.2	23.91	
20q	19p12	56.11	20q11.2	19p12	60.45	11q13.1q13.3	11q13.1	28.26	Yq11.2	Yq11.2	23.91	
	19q12	56.11		19q12	52.99		11q13.2	34.78				
	19q13.1	52.78		19q13.1	47.01		12q24.2	26.09				
	19q13.2	51.67		19q13.2	45.52		12q24.2	26.09				
	19q13.3	51.67		19q13.3	49.25		16p13.3q12.2	32.61				
22q	19q13.4	30.56	20q11.2	19q13.4	24.63	16p13.3q12.2	16p13.2	32.61	Yq11.2	Xq12	26.09	
	20q11.2	26.67		20q11.2	22.39		16p13.1	32.61		Xq12	26.09	
	20q12	24.44		22p13	21.64		16p12	34.78		Yq11.2	23.91	
	20q13.1	23.33		22p12	20.90		16p11.2	41.30				
	20q13.2	24.44		22q11.2	20.15		16q12.1	34.78				
Xq11.1q12	20q13.3	23.33	Xq11.1q12	22q11.2	20.15	17q11.2q21.3	16q12.2	21.74	Yq11.2	19q13.3	58.70	
	22q11.2	25.00		22q12.1	26.87		17q11.2	21.74		19p13.2	58.70	
	22q12.2	25.00		22q13.1	26.87		17q12	34.78		19p13.1	54.35	
	22q12.3	23.89		22q13.2	37.31		17q21.1	32.61		19p12	52.17	
	22q13.1	29.44		22q13.3	29.10		17q21.2	32.61		18q12	65.22	
Yq11.2	22q13.2	27.78	Yq11.2	22q13.3	29.10	17q24q25	17q21.3	26.09	Yq11.2	19q13.3	54.35	
	Xq11.1	34.44		Xq11.1	35.07		17q24	23.91		19p13.2	58.70	
	Xq11.2	33.89		Xq11.2	33.58		17q25	36.96		19p13.1	54.35	
	Xq12	27.78		Xq12	28.36		18p11.2	28.26		19p12	52.17	
	Yq11.2	25.00		Yq11.2	25.37		18p11.2	28.26		18q12	65.22	

Tabla 4.1.3. Regiones y bandas cromosómicas frecuentemente perdidas en los tumores analizados

180 TUMORES			SUPERFICIALES			INFILTRANTES			
Región cromosómica	banda	% Pérdida	Región cromosómica	banda	%perdidas	Región cromosómica	banda	% perdida	
9p24p21	9p24	31.67	9p24p13	9p24	34.33	4q23	4q23	26.09	
	9p23	29.44		9p23	32.09		5q15q23.2	5q15	28.26
	9p22	27.22		9p22	31.34			5q21	28.26
	9p21	22.78		9p21	27.61			5q22	28.26
	9q21.3q22.1	9q21.3		21.67	9p13			20.15	5q23.1
9q22.1		20.56	9q21.2q33	9q21.2	20.15	5q23.2		21.74	
Y		Yp11.3		20.56	9q21.3	26.87	9p24	23.91	
	Yp11.2	22.22		9q22.1	26.12	9p23	21.74		
	Yq11.2	27.78	9q22.2	22.39	11q25	11q25	28.26		
	Yq12	31.11	9q22.3	22.39	13q21.2	13q21.2	23.91		
			9q31	23.88	14p	14p13	21.74		
			9q32	23.13	15p	15p13	23.91		
			9q33	23.13		15p12	26.09		
			Yp11.2q12	Yp11.2	20.15	15q26,3	15q26.3	28.26	
				Yq11.2	26.87	22p	22p13	23.91	
				Yq12	30.60		22p12	26.09	
						Y	Yp11.3	26.09	
							Yp11.2	28.26	
							Yq11.2	30.43	
							Yq12	32.61	

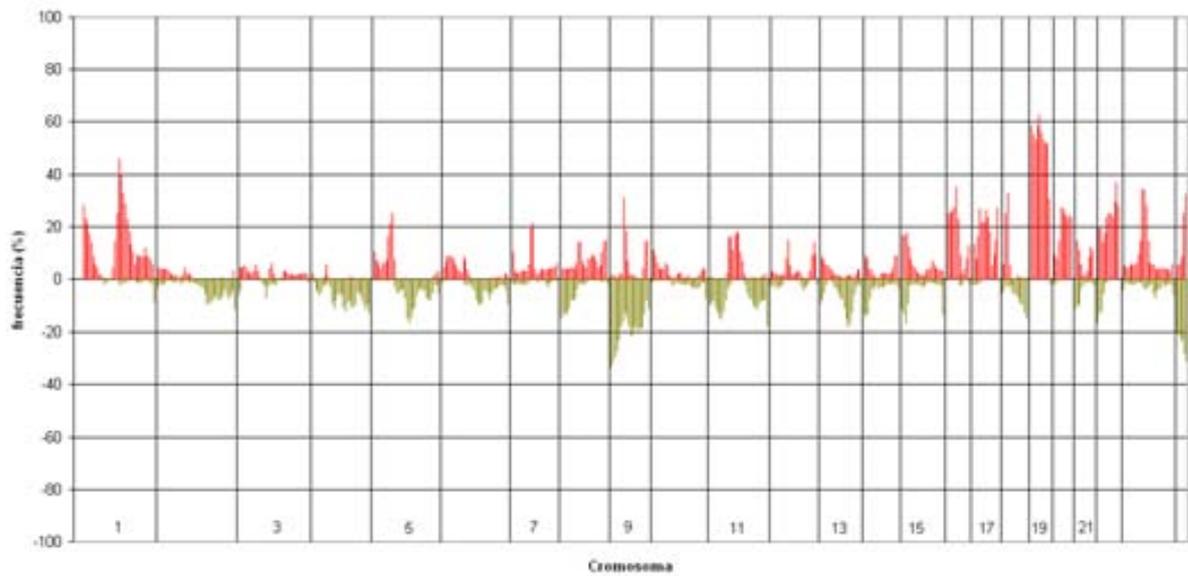


Figura 4.1.1. Frecuencia de alteraciones por banda en 180 tumores. En verde se indican las pérdidas y en rojo las ganancias

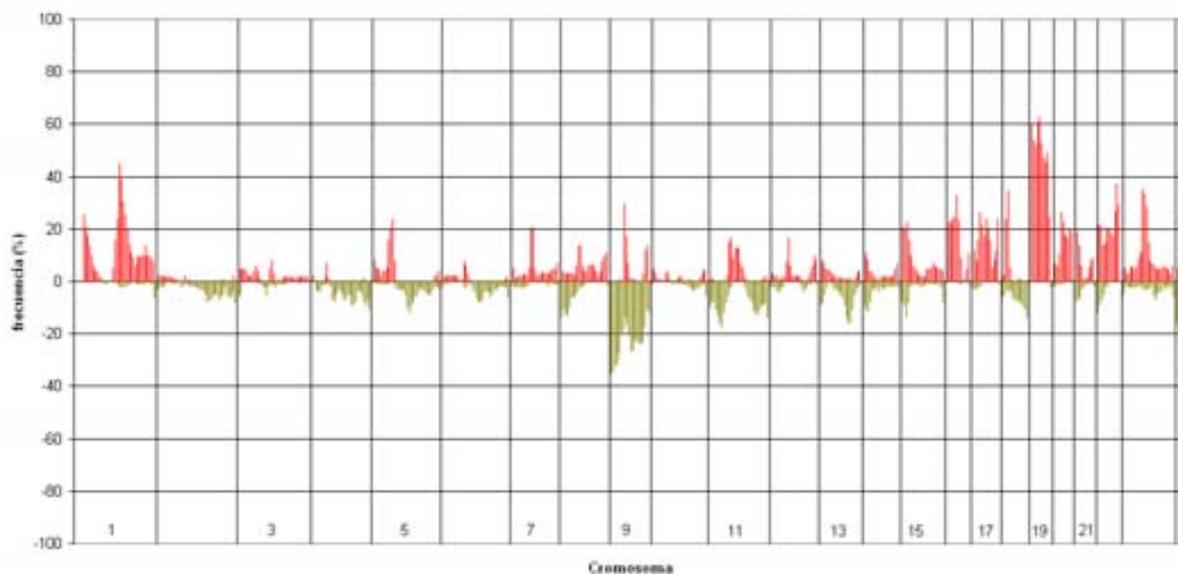


Figura 4.1.2. Frecuencia de alteraciones por banda en 134 tumores no músculo infiltrantes. En verde se indican las pérdidas y en rojo las ganancias

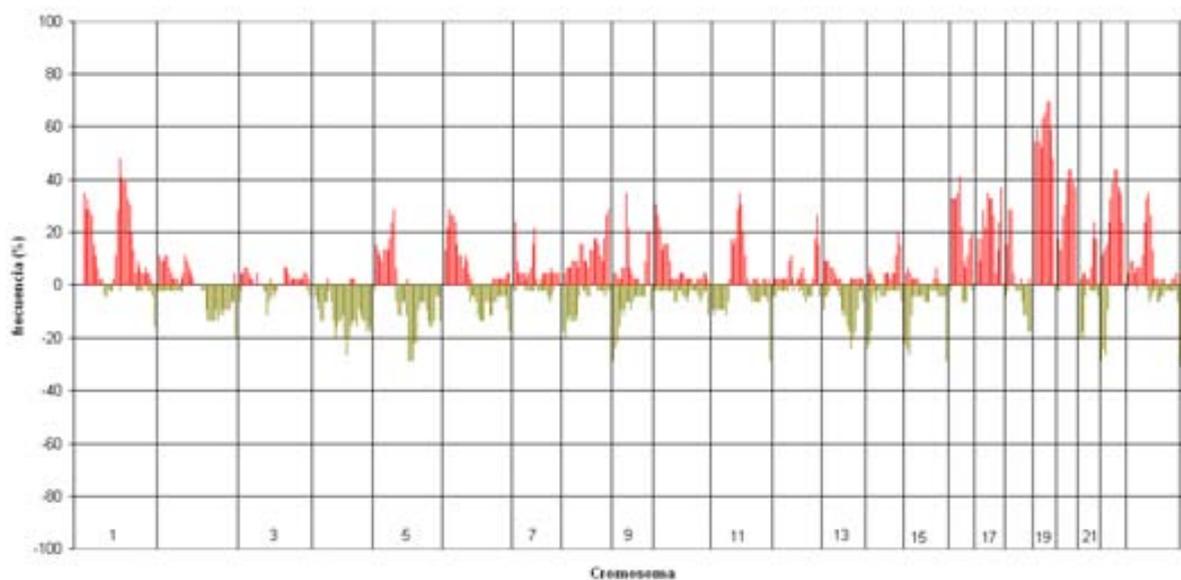


Figura 4.1.3. Frecuencia de alteraciones por banda en 46 tumores músculo infiltrantes. En verde se indican las pérdidas y en rojo las ganancias.

Amplificaciones génicas

Las regiones cromosómicas implicadas en amplificaciones dentro del total de tumores analizados se indican en la tabla 4.1.4. Las amplificaciones detectadas en

tumores no músculo infiltrantes y músculo infiltrantes se indican en las tablas 4.1.5 y 4.1.6 respectivamente.

Tabla 4.1.4. Amplificaciones detectadas en los 180 tumores

Cromosoma	Región cromosómica	frecuencia (%)	ratio	Cromosoma	Región cromosómica	frecuencia (%)	ratio			
CR 1	1p11q22	10	10/100	CR 14	14q32.3	1	1/100			
	1p36p35									
	1p36									
	1p36.3p36.2									
	1p36.3									
	1q21									
	1q21									
	1q21q23									
	1q23q24									
	1q24									
CR 2	2p24p25	2	2/100	CR 16	16p11.1q12.1	6	6/100			
	2q11.2q11.2									
CR 3	3p21.3p26	1	1/100		16p11.2p12					
CR 4	4q26q26	1	1/100		16p11p13					
	4q26q26									
CR 5	5p12q11.1	7	7/100		16p11p13					
	5p13.3q11.1				16p11.2p13					
	5p11p14				16q24					
	5p12p15.3				CR 17			17q24q25	6	6/100
	5p15.2p15.3							17q25		
	5p15.3			17q25						
	5p15.3			17q25						
CR 6	6p22.1p23	5	5/100	17q25						
	6p22.3p23			CR 18	18p	5	5/100			
	6p22.3p23				18p					
	6p21.3p24				18p11.1q11.2					
	6p22.3p25				18p11.3q11.2					
	CR 7				7p11.1q21.1			4	4/100	18p11.3q11.2
7p15.1p22		CR 19	19p11q13.2		20					20/100
7p22			19p11q13.4							
7q36			19p12q13.1							
CR 8	8p11.1q24.3		6					6/100	19p11.1p13	
	8p11.1p12								19p13.1q13.3	
	8p11.1p12			19p13.2p13.2						
	8p21.3p23.3			19p13.1p13.3						
	8q11.2q13	19p13.3q13.1								
	8q23q24.2	19p13								
	CR 9	9p24		3	3/100	19p13				
		9q12q13				19p13.3				
9q21.1q22.1		19p13.3								
CR 10	10p13p15	4	4/100	19p13.3						
	10p14p15			19p13.3						
	10p14p15			19q12q13.4						
	10p15			19q13.1						
CR 12	12q14q15	4	4/100	19q13.1q13.3						
	12q23q24.2			19q13.4						
	12q23q24.3			CR 20	20p11.1q12	6	6/100			
	12q24.1q24.3				20q11.2q13.3					
CR 13	13q34q34	1	1/100		20q12q13.1					
	13q34q34				20q13.2q13.3					
CR Y	Yp11.2p11.3	7	7/100	20q13.2q13.3						
	Yp11.2q12			20q13.3q13.3						
	Yp11.2q12			CR 22	22q13.1q13.3	1	1/100			
	Yq11.2q12									
	Yq11.2q12									
	Yq11.2q12									
	Yq11.2q12									
	Yq11.2q12									
	Yq11.2q12									
	Yq11.2q12									
Yq11.2q12										
Yq11.2q12										

Tabla 4.1.5. Amplificaciones detectadas en los 134 tumores no músculo infiltrantes

Cromosoma	Región cromosómica	frecuencia (%)	ratio	Cromosoma	Región cromosómica	frecuencia (%)	ratio
CR 1	1p36 1p36.2p36.3 1p36,3 1q21 1q21 1q21q23	10,9	6/55	CR 19	19p13 19p13 19p13 19p13.3 19p13.3 19p13.3 19p13.3 19p13.3 19q12q13.4 19q13.1q13.3 19q13.4	23,63	13/55
CR 2	2p24p25	1,8	1/55	CR 20	20p11.1q12 20q11.2q13 20q13.2q13.3 20q13.2q13.3	7,27	4/55
CR 3	3p21.3p26	1,8	1/55	CR Y	Yp11.2p11.3 Yp11.2q12 Yp11.2q12 Yq11.2q12 Yq11.2q12 Yq11.2q12	12,72	7/55
CR 5	5p12q11.1 5p12p15 5p15.3	5,45	3/55				
CR 7	7p11.1q21.1 7q36	3,63	2/55				
CR 8	8p11.1q24.3 8p11.1p12	3,63	2/55				
CR 9	9q12q13	1,8	1/55				
CR 12	12q14q15 12q23q24.2 12q23q24.3 12q24	7,27	4/55				
CR 16	16p 16p 16p11.1q12.1 16p11.2p12 16q24	9,09	5/55				
CR 17	17q25 17q25 17q25 17q25	7,27	4/55				
CR 18	18p11q11 18p11.1q11	3,63	2/55				
CR 19	19p13.2 19p13.1q13.3 19p12q13.1	23,63	13/55				

Tabla 4.1.6. Amplificaciones detectadas en los 46 tumores músculo infiltrantes

Cromosoma	Región cromosómica	frecuencia (%)	ratio	Cromosoma	Región cromosómica	frecuencia (%)	ratio
CR 1	1p35p36 1p11q22 1q23q24 1q24	8,88	4/45	CR 18	18p 18p 18p11.3q11.2	6,66	3/45
CR 2	2q11.2	2,22	1/45	CR 19	19p13.3q13.1 19p13.2p13.3 19p13.3 19p11p13.1 19p11q13.2 19p11q13.4 19q13.1	15,50	7/45
CR 4	4q26	2,22	1/45	CR 20	20q12q13.1 20q13.3	4,44	2/45
CR 5	5p15.3p15.3 5p15.2p15.3 5p11p14 5p13.3q11.1	8,88	4/45	CR 22	22q13	2,22	1/45
CR 6	6p22.3p25 6p21.3p24 6p22.1p23 6p22.3p23 6p22.3p23	11,10	5/45				
CR 7	7p22 7p15.1p22	4,44	2/45				
CR 8	8p21.3p23.3 8p11.1p12 8q11.2q13 8q23q24.2	8,88	4/45				
CR 9	9p24 9q21.1q22.1	4,44	2/45				
CR 10	10p15 10p14p15 10p14p15 10p13p15	4,44	4/45				
CR 13	13q34	2,22	1/45				
CR 14	14q32.3	2,22	1/45				
CR 16	16p11.2p13	2,22	1/45				
CR 17	17q24q25 17q25	4,44	2/45				

En resumen, los carcinomas uroteliales de vejiga presentan un perfil característico de desequilibrios genómicos con ganancias en 1q, 8q, 11q, 16p, 17q, 18p, 19, 20q, Xq y pérdidas en 4q, 8p, 9p, 9q, 11p, 11q, 13q, 18q e Y. Las ganancias en 5p, 6p, 10p y las pérdidas en 5q, 6q aumentarían su frecuencia de forma significativa a lo largo de la progresión tumoral.

En general, el número de desequilibrios y amplificaciones génicas también aumenta en relación al grado y estadio, aunque ya se observa un elevado número de alteraciones en algunos tumores superficiales de bajo estadio y grado. Del mismo modo se observa

que un grupo minoritario de tumores músculo infiltrantes presenta un número bajo de desequilibrios.

Las regiones cromosómicas que configuran el perfil de desequilibrios en nuestro estudio son: +1p34.2p36, +1q21q22, +8q24.2q24.3, +11q13.1q13.3, +16p13, +17q11.2q21.3, +17q24q25, +18p11.2, +19pq, +20q, +X, -4q23, -8p23, -9p21p24, -9q21q33, - 11p13p14,-11q25, -13q21.2, -18q22, -Y. con ganancias de 5p13, 6p22.1p25, 10p12p15 y pérdidas de 5q15q34 y 6q22q27 más predominantes en tumores avanzados.

De forma recurrente y en más de tres tumores se han detectado amplificaciones en 1p35p36, 5p15, 6p22p23, 10p15, 12q24, 16p11p13, 17q25, 18p11, 19p13, 19q13, 20q13, Yp11q12. Las amplificaciones más características de tumores músculo infiltrantes se localizan en 5p, 6p22p23 y 10p15.

4.1.2. COMPARACIÓN ENTRE LOS DISTINTOS GRUPOS

Partimos de la hipótesis de que aquellas alteraciones que presenten diferencias entre los distintos grupos pueden contribuir a la caracterización genético-molecular de los mismos. Por ello se compararon entre si los distintos grupos histopatológicos y clínicos.

Infiltrantes *versus* no músculo infiltrantes

Con el fin de establecer aquellas alteraciones que pudieran estar implicadas en la progresión tumoral se compararon los resultados obtenidos en los tumores Ta y T1 con los obtenidos en T2-T4. En la tabla 4.1.7 se indican las bandas cromosómicas que presentaban diferencias estadísticamente significativas entre tumores músculo infiltrantes y no músculo infiltrantes. El perfil de diferencias se muestra en la figura 4.1.4.

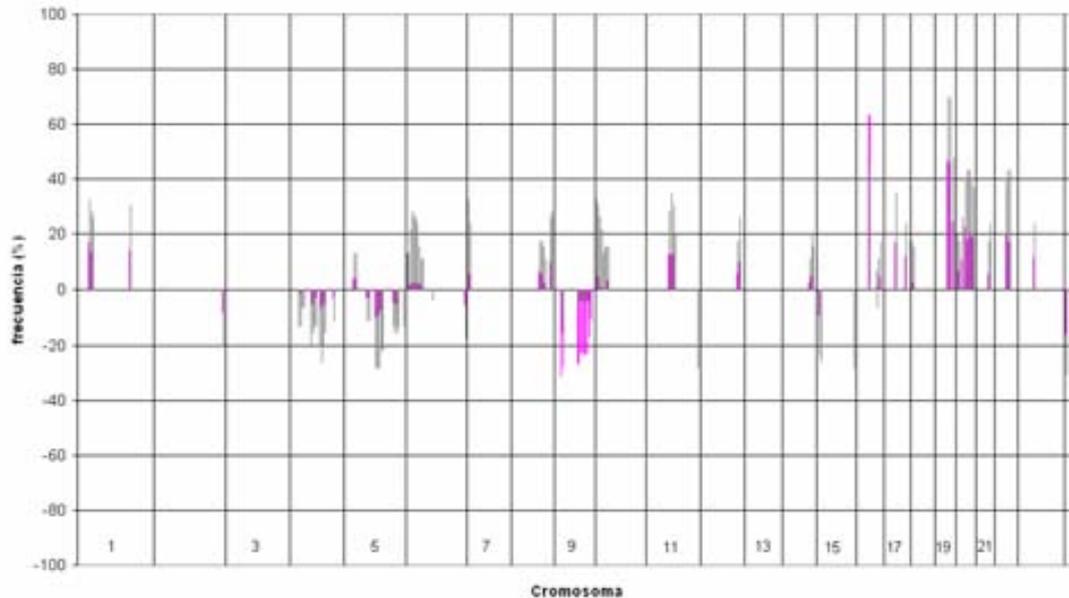


Figura 4.1.4. Frecuencias de las alteraciones que muestran diferencias estadísticamente significativas entre tumores no músculo infiltrantes (rosa) y músculo infiltrantes (gris).

Según estos resultados, 21 regiones cromosómicas aparecen ganadas de forma estadísticamente significativa en los T2T4 y 13 aparecen más frecuentemente perdidas.

Los desequilibrios: +5p13.2p13.3, +6p21.1p25, +8q21.3q22.3, +10p, +14q32, +16q22q23, +18p11.3, -2q37.3, -4p12p15.1, -4q13.2q25, -5q15q34, -6q27 representan las diferencias más relevantes siendo mucho más frecuentes en los tumores músculo infiltrantes

Las pérdidas de los cromosomas 9p21, 9q21q34.2 e Yp11.2 son más frecuentes en superficiales al igual que las ganancias de 15p.

T1 versus Ta

Los desequilibrios más frecuentes en tumores Ta fueron: +19p, +19q, +Yq ($\geq 40\%$); +1q, -9p, -9q, +22q + Xq ($\geq 30\%$); +1p, +7q, +16p, +17q, +18p, -Yq ($\geq 20\%$). El perfil de desequilibrios se indica en la figura 4.1.5.

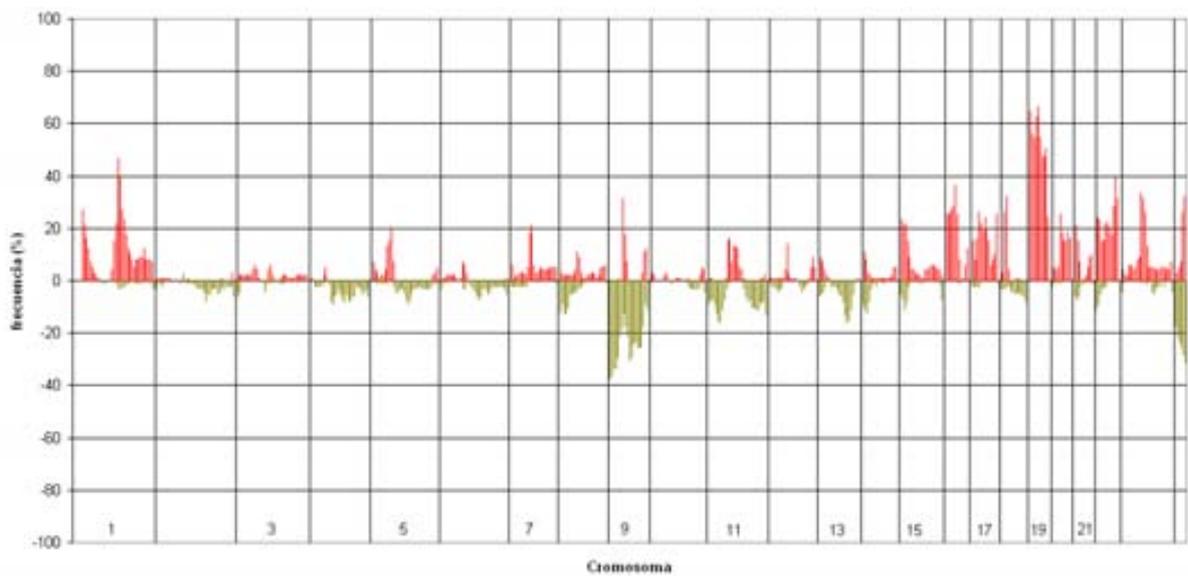


Figura 4.1.5. Frecuencia de alteraciones por banda en tumores Ta. En verde se indican las pérdidas y en rojo las ganancias.

Los desequilibrios más frecuentes en tumores T1 fueron: +1q, +19q, +19q, +Xq (40%); +1p, -4q, +5p, +8q, -9p, -9q, -11p, +16p, +17q, -18q, +20p, +20q, +22q, -Yq ($\geq 20\%$). El perfil de desequilibrios se indica en la figura 4.1.6.

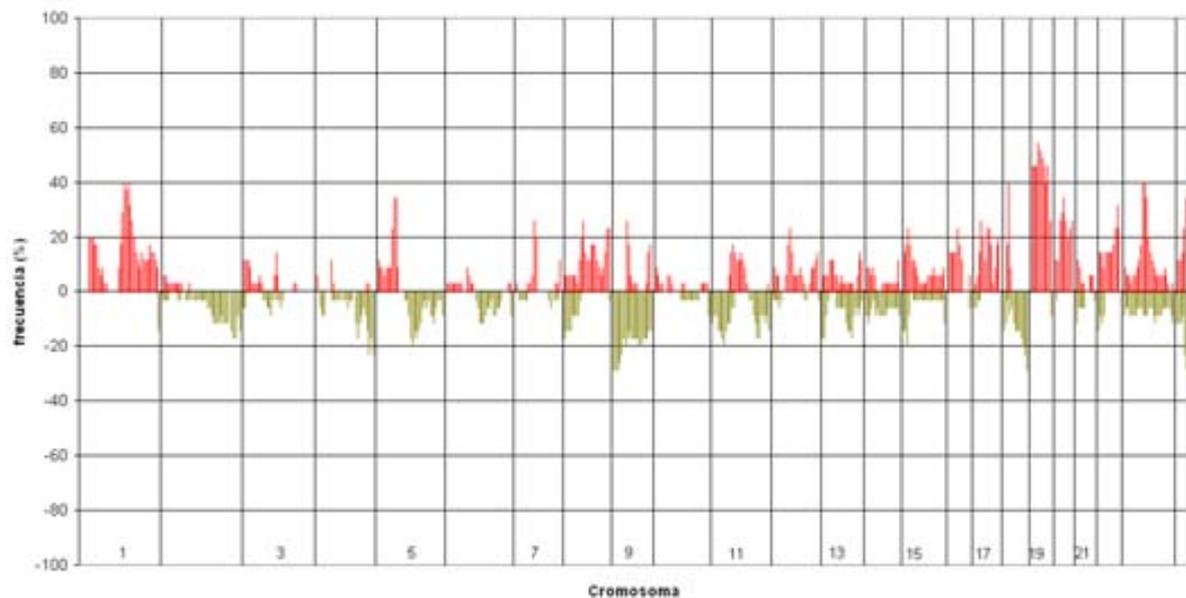


Figura 4.1.6. Frecuencia de alteraciones por banda en tumores T1. En verde se indican las pérdidas y en rojo las ganancias.

La comparación entre ambos grupos de tumores mostró que las ganancias en 8q, 20p y las pérdidas en 2q, 4q, 5q y 18q presentaban diferencias estadísticamente significativas, siendo más frecuentes en los tumores T1

Con el fin de establecer una posible relación entre los desequilibrios cromosómicos y el grado dentro del grupo de tumores no músculo infiltrantes, se compararon los desequilibrios detectados en tumores Ta-T1 de alto grado con los detectados en Ta-T1 de bajo grado.

Los desequilibrios más frecuentes en tumores Ta-T1 de bajo grado fueron: +19p, +19q (50%); +1p, +1q, -9p, +16p, +22q, +Xq (>30%); -9q, +17q, +18p, -Y ($\geq 20\%$). El perfil de desequilibrios se indica en la figura 4.1.7

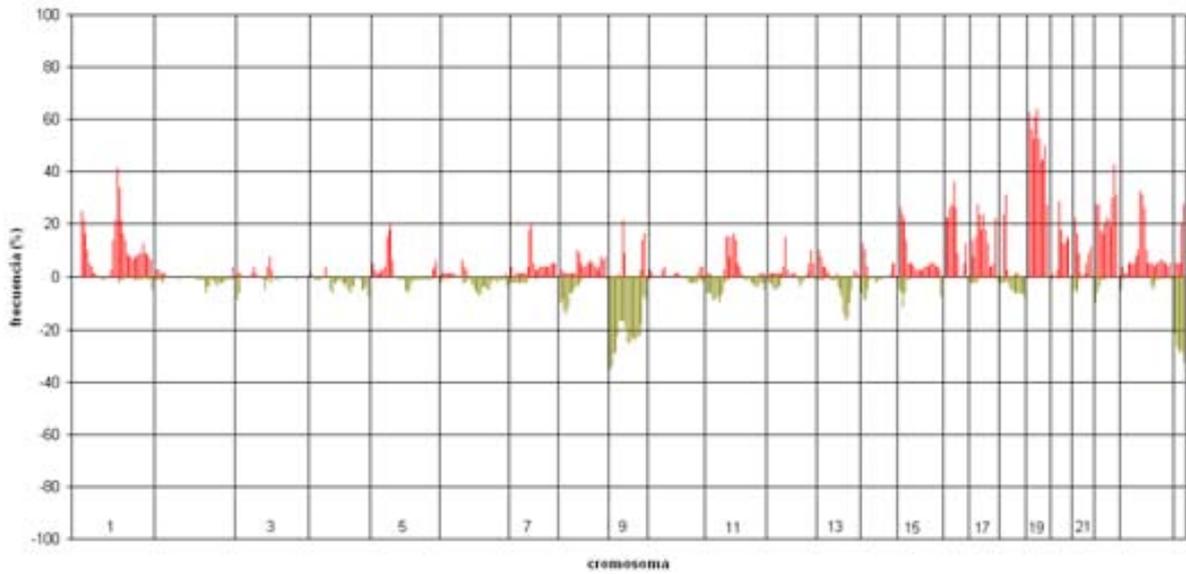


Figura 4.1.7 Frecuencia de alteraciones por banda en tumores Ta-T1 de bajo grado. En verde se indican las pérdidas y en rojo las ganancias.

Los desequilibrios más frecuentes en tumores Ta-T1 de alto grado fueron: +1q, +19p, +19q (>40%); +1p, -9p, +18p,+Xq ($\geq 30\%$); -5q, -9q, -11p, -11q, +16q, +17q, -18q, +20q, +22q, -Yq ($\geq 20\%$). El perfil de desequilibrios se indica en la figura 4.1.8.

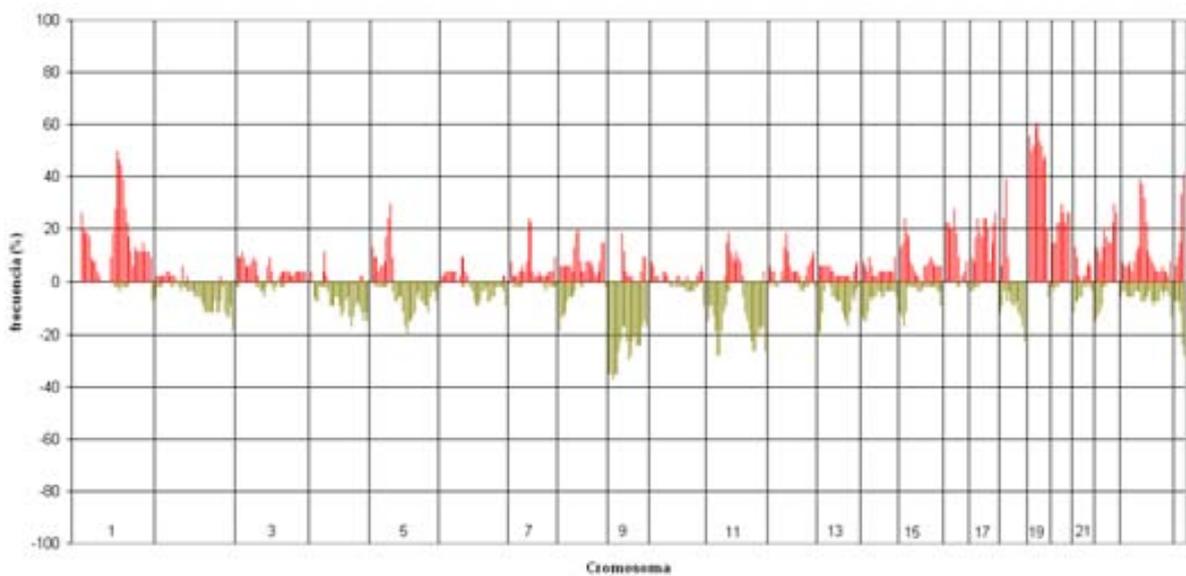


Figura 4.1.8 Frecuencia de alteraciones por banda en tumores Ta-T1 de alto grado. En verde se indican las pérdidas y en rojo las ganancias.

La comparación entre ambos grupos mostró que las ganancias en 1q, 3p, 5p, 8p12, 15q, 20p y las pérdidas en 2q, 4q, 5q, 11p, 11q, 13q, 18q y Xq presentaban diferencias estadísticamente significativas, siendo más frecuentes en los tumores Ta y T1 de alto grado

Comparación entre los distintos grupos clínicos

Los carcinomas uroteliales pueden clasificarse desde un punto de vista clínico en distintos grupos. Con el fin de determinar si existían alteraciones asociadas significativamente a determinado grupo clínico, se compararon entre si los diferentes grupos: TaT1 de bajo grado, Ta de alto grado, T1 de alto grado, \geq T2 no anaplásico y \geq T2 anaplásico. Los desequilibrios cromosómicos que presentaron diferencias significativas mediante el análisis de regresión logística, se indican en la tabla 4.1.8

Tabla 4.1.8. Diferencias entre grupos clínicos

		ANÁLISIS MONOVARIANTE			ANÁLISIS MULTIVARIANTE		
Ta-T1Gb vs. TaGa							
Alteraciones	Ta-T1Gb tumores (%)	TaGa tumores (%)	p	OR (95% CI)	OR (95% CI)	Especificidad	Sensibilidad
+1q	18 (22%)	13 (43,3%)	0,033	2,71 (1,11-6,63)			
-2q	2 (2,44%)	4 (13,3%)	0,043	6,15 (1,06-35,55)			
+9q	18 (22%)	1 (3,3%)	0,022	0,12 (0,016-0,96)		91,46%	43,33%
-11q	4 (4,88%)	8 (26,7%)	0,003	7,09 (1,95-25,76)	8,14 (2,23-29,88)		
+18q	2 (2,44%)	4 (13,3%)	0,043	6,15 (1,06-35,55)			
-Xq	3 (3,66%)	5 (16,7%)	0,031	5,26 (1,17-23,61)	6,77 (1,49-30,83)		
Ta-T1Gb vs. T1Ga							
Alteraciones	Ta-T1Gb tumores (%)	T1Ga tumores (%)	p	OR (95% CI)	OR (95% CI)	Especificidad	Sensibilidad
-2q	2 (2,44%)	5 (20%)	0,007	10 (1,8-55,37)			
+5p	2 (2,44%)	4 (16%)	0,026	7,61 (1,3-44,46)	8,25 (1,37-49,73)		
-5q	4 (4,88%)	5 (20%)	0,031	4,87 (1,19-19,84)			
+8p	3 (3,7%)	4 (16%)	0,05	5,01 (1,04-24,16)			
-11p	6 (7,32%)	6 (24%)	0,031	4 (1,16-13,79)	4,82 (1,32-17,56)	97,56%	28,0%
+12p	1 (1,22%)	3 (12%)	0,039	11,04 (1,09-111,46)			
+13q	1 (1,22%)	3 (12%)	0,039	11,04 (1,09-111,46)			
-14q	0 (0%)	3 (12%)	0,012	25,68 (0,81-810,25)	38,9 (1,21-1251,06)		
+20p	6 (7,32%)	7 (28%)	0,011	4,92 (1,47-16,44)			
-Xq	3 (3,66%)	4 (16%)	0,05	5,01 (1,04-24,16)			
TaGa vs. T1Ga							
Alteraciones	TaGa tumores (%)	T1Ga tumores (%)	p	OR (95% CI)	OR (95% CI)	Especificidad	Sensibilidad
+9p	0 (0%)	4 (16%)	0,037	12,77 (0,46-350,84)		96,67%	24%
+9q	1 (3,33%)	6 (24%)	0,039	9,15 (1,02-82,2)	9,16 (1,02-82,21)		
T1Ga vs. T2-T4 no anaplásico							
Alteraciones	T1Ga tumores (%)	T2-T4 no anaplásico tumores (%)	p	OR (95% CI)	OR (95% CI)	Especificidad	Sensibilidad
+6p	2 (8%)	11 (32,4%)	0,03	5,5 (1,09-27,61)	5,5 (1,10-27,62)	50%	15,3%
T1Ga vs. T2-T4 anaplásico							
Alteraciones	T1Ga tumores (%)	T2-T4 anaplásico tumores (%)	p	OR (95% CI)	OR (95% CI)	Especificidad	Sensibilidad
+6p	2 (8%)	7 (43,8%)	0,017	8,9 (1,55-51,48)			
+10p	1 (4%)	6 (37,5%)	0,009	14,4 (1,53-135,51)			
T2-T4 no anaplásico vs. T2-T4 anaplásico							
Alteraciones	T2 o+ no anaplásico tumores (%)	T2 o+ anaplásico tumores (%)	p	OR (95% CI)	OR (95% CI)	Especificidad	Sensibilidad
+Xp	4 (11,8%)	8 (50%)	0,01	7,5 (1,79-31,38)	10,97 (2,07-58,13)	91,18%	62,5%
-Xq	1 (2,94%)	4 (25%)	0,031	11 (1,11-108,48)	31,82 (1,84-551,63)		

Debido a la importancia que puede tener la presencia de un CIS acompañando a un tumor superficial, se compararon los desequilibrios presentes en tumores Ta/T1 con CIS acompañante versus Ta/T1 sin CIS acompañante. De los 99 tumores Ta, 13 (5 TaGb y 8 TaGa) presentaron CIS asociado. Si bien en aproximadamente un 50% no se observaron desequilibrios destacables en relación a los tumores Ta sin CIS acompañante, el análisis estadístico mediante regresión logística indicó que +2q, -6q, -10q y +18q eran significativamente más frecuentes en los tumores Ta con CIS acompañante. Dentro de los tumores T1, ocho (2 T1Gb y 6 T1Ga) de los 35 estudiados iban acompañados de CIS. Se observó que la ganancia de 1p (más frecuente en tumores T1 sin CIS) y la ganancia de Yq marcaban diferencias significativas entre los dos grupos.

En resumen, en el presente estudio no hemos detectado ninguna alteración específica de estadio o grado. De forma global, los tumores T1 comparten la mayoría de alteraciones con los Ta y de forma adicional presentan desequilibrios más característicos de los tumores músculo infiltrantes. Probablemente, la heterogeneidad observada dentro de cada grupo no permite identificar alteraciones características.

Las diferencias más importantes se observan al comparar los tumores Ta T1 con los T2T4. Según nuestros resultados, los desequilibrios: +5p13.2p13.3, +6p21.1p25, +8q21.3q22.3, +10p, +14q32, +16q22q23, +18p11.3, -2q37.3, -4p12p15.1, -4q13.2q25, -5q15q34, -6q27 representan las diferencias más relevantes siendo mucho más frecuentes en los tumores músculo infiltrantes.

4.2. DESEQUILIBRIOS GENÓMICOS EN CÁNCER DE VEJIGA MÚSCULO INFILTRANTE: importancia de los desequilibrios o amplificaciones en 1q, 5p, 6p, y 19q

Desde hace tiempo, se conoce que las alteraciones implicando al cromosoma 5 son características de los tumores de vejiga más avanzados (Fadl-Elmula 2005; Mitelman 2008). Resultados previos de nuestro grupo (Prat, et al. 2001; Rigola 2003) y los obtenidos en el presente estudio mediante CGH convencional confirman que las alteraciones implicando la ganancia o amplificaciones en 5p y pérdidas en 5q, podrían

tener un papel en la progresión tumoral. Con el fin de profundizar en estas alteraciones nos propusimos aplicar la técnica de CGH en arrays de DNA ya que nos permitiría localizar con mayor precisión los posibles oncogenes o genes supresores en las regiones de interés. Para ello se seleccionaron 24 tumores de los que el estudio mediante CGH convencional había mostrado ganancia o amplificación de 5p y/o pérdida de 5q. La mayoría, 18, de los tumores eran músculo infiltrantes, tres eran T1Ga y dos TaGa. Se incluyó, como control, un TaGb que únicamente presentaba la pérdida del cromosoma 9q mediante CGH convencional.

La técnica de aCGH se aplicó tal y como se describe en el apartado 3.2.4.

Los pacientes procedían del Hospital del Mar y de la Fundación Puigvert de Barcelona. Además de las técnicas de cCGH y aCGH, y de acuerdo con los resultados obtenidos, se aplicaron técnicas de FISH e inmunofluorescencia en dos arrays de tumores contruidos específicamente para este estudio. En la tabla 4.2.1 se indican las características de los tumores y las distintas técnicas aplicadas.

Tabla 4.2.1. Muestras estudiadas y tecnología aplicada.

Paciente	Estadio/Grado	cCGH	aCGH	FISH	IF
BM1	T4Ga	+	+	-	-
BM2	T3Ga	+	+	-	-
BM3	T3Ga	+	+	-	-
BM4	T3Ga	+	+	-	-
BM5	T2Ga	+	+	-	-
BM6	T2Ga	+	+	-	-
BM7	T2Ga	+	+	-	-
BM8	T1Ga	+	+	-	-
BM9	T1Ga	+	+	-	-
B01	T4Ga	+	+	+	+
B02	T4Ga	+	+	+	+
B03	T3Ga	+	+	+	+
B04	T3Ga	+	+	+	+
B05	T2Ga	+	+	+	+
B06	T2Ga	+	+	+	+
B07	T2Ga	+	+	+	+
B08	T2Ga	+	+	+	+
B09	T2Ga	+	+	+	+
B10	T1Ga	+	+	+	+
B11	TaGa	+	+	+	+
B12	TaGa	+	+	+	+
B13	TaGb	+	+	+	+
B14	T3Ga	+	-	+	+
B15	T3Ga	+	-	+	+
B16	T2Ga	+	-	+	+
B17	T2Ga	+	-	+	+
B18	T2Ga	+	-	+	+
B19	T2Ga	+	-	+	+
B20	T2Ga	+	-	+	+
B21	T2Ga	+	-	+	+
B22	T2Ga	+	-	+	+
B23	T2Ga	+	-	+	+
B24	T2Ga	+	-	+	+
B25	T2Ga	+	-	+	+
B26	T2Ga	+	-	+	+
B27	T2Ga	+	-	+	+
B28	T1Ga	+	-	+	+

IF: Marcaje inmunofluorescente

Perfil genómico de los tumores analizados

A excepción de la muestra B13 (TaGb), la mayoría de los 24 tumores analizados, presentó un elevado número de alteraciones.

En la tabla 4.2.2 se indican los desequilibrios detectados mediante CGH array y los detectados mediante CGH convencional en los mismos tumores. En general se

observó concordancia entre ambas técnicas, de forma que los resultados obtenidos por cCGH se confirmaban mediante aCGHa. Sin embargo, ésta última identificó muchos más desequilibrios genómicos y por cromosoma (figura 4.2.1).

Tabla 4.2.2. Desequilibrios genómicos detectados mediante cCGH y aCGH

Paciente	Estadio grado	Pérdidas		Ganancias	
		cCGH	aCGH	cCGH	aCGH
BM1	T4Ga	-	2q36qter	-	1p33.34.2, 1q21q25.1
		-	5q	-	2p
		8q21.2qter 10q24	8p22pter	-	4q13q21.2
		-	11p	5p	5p
		-	13q12q14	-	17p11qter
		16q23qter	-	-	18p
		-	19pterq12	-	20
BM2	T3Ga	2	2p22qter	1q	1
		4q28pter, 4q31.3qter	4pterq28, 4q32qter	4q28q31.2	4q28, 4q31
		5q	5q	5p	5p
		7q21	7q11q31.3	6p21.3p22	6p
		10q11.2q21, 10q23qter,	10q11q21, 10q23.2qter	7p15	7p, 7q32qter
		11	11	9p21qter	9
		12q14q23	12p13, 12q24	10p	10p, 10q22q23.1
		-	13q14	-	13q12q14, 13q14qter
		-	-	17	17
		-	-	18p	18p
		-	-	19	19
		-	-	20p13, 20q11q13.1	20p12p13
		-	-	21q22	21
BM3	T3Ga	2q23qter	2q22qter	1q21q25,	1p33p34.2, 1q12q25.1 2pterq12
		4	4p15pter, 4q22qter		
		5q	5q	3q27qter	
		8p12p23	6p24pter, 6p21	5p	5p
		-	8p	6p21.3p24	6p23, 6p22, 6p12, 6q21qter
		10q23qter	10q23qter	7p	7p14pter, 7p12p13, 7p11.2p12.1
		11p13pter 12q14q23	11p11.2p15.4 12q13qter	8q21.3q22 10q22pter	8q21.3qter 10p11pter, 10q21q22.3
		13q14q21	13q13q21.1	17p12qter	17q
		-	14q21qter	18p	18p
		16q21qter	16q12q21, 16q23qter	-	19q13

Resultados

Paciente	Estadio grado	Pérdidas		Ganancias	
		cCGH	aCGH	cCGH	aCGH
BM3		-	22	20q 21q22	20q13 21
BM4	T3Ga	- - 4q - 10q22qter - -	2q12qter 3pterq12, 3q22q24 4q13qter 5q12q15 10q22.1, 10q23qter 13q13q21.1 16q	1q21q24 2p22pter - - 5 6p21.3p23 - 8q11.1q21.2 - - 19 -	1q21q24 2p24pter, 2p24.1, 2q11.2 3q26qter 4pterq12 5pterq11.2 6p22pter, 6p22.3 7q11.22q11.23, 7q21.3qter 8q 16p 17q23qter 19q12q13.1 21
BM5	T3Ga	2q22q23 3p12p14 4q27q31.2 5q23qter 6q11q24 - - 9p21pter - - 14q13qter - 20p	3p14, 4q28q31 5pterq34 6q14qter 7q11q21 8p12pter, 8q12.1q21.1 9p21pter 10q25qter 11p15, 11p13, 11p11, 11q23qter 14 17p12p13 20p	1q11q22, 2p, 3p21pter, 3q13.3qter - - - 7q22q31 8q22 10p - - - 17q - 19 20q	1q21q22 2pterq12 3p21pter, 3q 4pterq13, 4q22q24 5q35 6p21.2p22.3 7p14pter, 7q21qter 8p12q11.2, 8q21.3qter 10pterq21.1 11p12p13, 11q12 12q13, 12q15q24 15q25q26 17p11q11, 17q21q24 18p11.21, 18q21 19 20q11.2qter
BM6	T3Ga	1p31, 2q21qter, 4p15q27 6q15q16 - - - 11p, 11q22	1p22p32 4p15q26, 6p25, 6p21.2q12.1 8p12pter, 8q21 9p13pter 10q11q22.2, 10q23q24 11p	1q21q23, 1q32qter, 3p23pter, 3p21p22, 3q26.3qter - - 6p21.3p23 7p12q11, 7q34qter 8q22q24	1q12qter 3p14pter, 3q2qter 4q28q32, 4q35 5p 6p21.3p24 - 8p11q12,

Paciente	Estadio grado	Pérdidas		Ganancias	
		cCGH	aCGH	cCGH	aCGH
BM6		- 15q15qter 18q	12p12.3pter 15 18q12qter	9q33qter 10p, 11q13 12q23qter 14q23q24 17 - 19 20q	8q22qter 9p13qter 10p, 10q22.3 11q13 1q23 14q24.2q31.1 17q21.3qter 18pterq11 19q12, 19q13 20q13qter
BM7	T2Ga	- 3p22pter, 5q15q23 7p21 8p22pter, 8q21.2q13 9p21p23 - - 13q14q31 - -	2p14, 2q35qter 5q 8p12p23 9p21p22 10q22qter 11q24q25 13q12q21.1, 13q32qter 17p 22	1q21q23 - 3q29 - - - 9q34 10p 11q13 12q24qter 13 - 16 17 19 20	1q21q25 2p15, 2q11q22 3q12qter 4p13p14, 4q12q26 5p15 7p12q33 - 10p - - 15q26 16p13, 16q21q23 17q - 20p12, 20q12q13.1 21q21
BM8	T2Ga	5q15qter - - 9pterq22 - 11p14pter - - - 17p11	5q12qter 6q14qter 8p12pter, 8q23qter 9q 10q 11p14pter 14q32 15 16p13.2pter 17p	- 2p13p22 3p22p24, 3q13.3qter - - - - 13 19q 20q13 21	1p34.2p36, 2p22pter, 2p16p21, 2p16q13 3p24pter, 3q21qter 6p22.3 8p12q12.3, 8q22 10p 12p11.2p12.1, 12q14 13 19q13 20q11qter 21

Resultados

Paciente	Estadio grado	Pérdidas		Ganancias	
		cCGH	aCGH	cCGH	aCGH
BM9	T2Ga	9q 10q - - -	9q 10q11.2qter 13q12 17p 18q22	1q21 17q21pter 19 20	1q 17q 19q13 9q
BM10	T1Ga	- 2q22q33 5q14q23 6q - 9 11p12p15, 11q21qter, 14q13q32 - 18	1 2q14qter 5q 6q 8p21.3pter 9 11p, 11q21qter 14 16p12pter 18p11qter	5p 8p21q12, 8q13qter 10 11q13, 12q13pter, 12q23qter 13 16pterq21, 16q22qter 20 21q22	5p 8p21.2qter 10 11q11q14.1 - 13 16p11.2 16q22qter 20
BM11	T1Ga	5q13q31 9 11p, 11q22qter 18q21qter	5q15q31 9 10q 11p11pter, 11q14qter 18q12qter	11q13q14 12 14q13qter 15 17p13, 17q12q21 19 20	11p11q14 12 14q13qter 15 17p13, 17q21 19q13 20
B01	T4Ga	2q32, 2q37.3 4q 6q15q16.3, 6q22.1q27 - - - - - - - -	2p11.2, 2q35qter 4pterq22, 4q24q32 6q21q23 7q13qter 8p12pter 9p22q33 10q 11p 14q11.2, 14q32 15 16p13.2p13.3	1p11q24 - - 6p22.1p24 7p22pter 8q21.3q24.3 10p12.3pter - 19 20 22q13	1p22qter 2p12p21, 2q11q14 3p21pter, 3p14q13, 3q23qter 6p23, 6p22, 6p12 7p14p22, 7p11p13 8q 10p 18p 19p, 19q11q12 20pterq12, 20q13 21q21.2q23 -
B02	T4Ga	5q21qter - 10q22.3qter 11q25	5q 8p 10q 11pterq14.1,	1p36.1pter, 1q22q31 - 5p 6p21.1pter	1p36, 1q12qter 3 5p 6p22pter

Paciente	Estadio grado	Pérdidas		Ganancias	
		cCGH	aCGH	cCGH	aCGH
B02		-	11q22.3qter	-	7
		16q	13q12q14	-	8q
		-	16	-	9p
		-	17q24qter	-	10p
		-	19q13.2	-	11q14.1q22.3
		-	22q11	-	17q11.2q24
				18p11.1p11.2	-
				19p12q13.2	19q13.1q13.2
B03	T3Ga	-	1p32, 1p12p22	1p33pter, 1p13.1q25,	1p33pter, 1q21, 1q22q41
		2p15	2p25, 2p11p15, 2q13q21	-	2q11
		-	3p13p24	3p24.2p25	3p24.3p25
		4q24qter	4p13pter, 4q31qter	5p15.3	5p
		5q21q23.1	5q31qter	6p22.1p25	6p22.3, 6p23pter
		8p23.3	8p	7p21pter, 7p11.2q21.1, 7q34q36	7
		-	9q22.3q31	8q	8q, 8q21.1
		-	10q23qter	-	9p13pter,
		-	11p14pter	-	10p15.2q22.2
		-	12q13q14, 12q23qter	11p11	11p13, 11p11q12, 11q13q23
		-	14q11q12, 14q24qter	13q32q34	13q31qter
		-	16p13.2p13.3, 16q13.2qter	-	15
		-	22	16p13.2q12.2	16p13.1q12
				17p	17p
				18p	18p
				20	20
		21q22	21		
B04	TaGa	2q32.1qter	2q36q37	1p32.3p34.2, 1p12q24	1q21q31
		-	3p25q13	-	2p25q22
		4p12pter, 4q24qter	4p15p16, 4p14q12, 4q32q35	-	3q21q26
		5q21q23.1	5q	5p	5p13p15, 5p12p13
		-	7q11.21q11.22	-	6p21.2p24
		8p11.1q13,	8p23.2pter, 8p21.2q12.3, 8q24.2qter	-	7p22q11, 7q11.23qter
-	9p22	8p21.1pter, 8q22.2q24.1	8p23.2, 8p21.3p23.1, 8q23.1q24.4		
-	10q11.1qter	-	9p23p24, 9p12p21		

Resultados

Paciente	Estadio grado	Pérdidas		Ganancias	
		cCGH	aCGH	cCGH	aCGH
B04		-	11p11.2pter	10p13pter	10p14pter, 10p11.2p13
		13q14q32	13q12.1q13, 13q14.3qter	11q13	11p11.2qter
		-	15	12q24	12
		-	17p12p13	-	13q13q14.2
		-	18q11q12,18q23 qter	-	14q12q23
				16p13	16p13
				18p	18p, 18q12q23
				19	-
				20	20
				21q21q22, 22q11.2q12. 1	21
B05	T2Ga	1q31q32.1	1q22q23, 1q25q41	1q21.2q23	1q12q22
		2q22qter	2q22qter		3p25, 3q13qter
		5q11.2q23.1	5q11.2q23	5p15.3pter	5p
		-	6p25, 6p21.2p22.1	6p22.3pter	6p23p24
		-	8p12pter, 8q11.1q12	7p22, 7q11.2	7
		12q15q22,	12	8q24.3	8p11.1p12, 8q12qter
		13q12.3q22,	13q12q21	9q34	9q21qter
		-	16q12qter	-	14q12q21
		-	17p,	-	18q12
		18q21.3q23, -	18q21qter 22		
B06	T2Ga	2q21.3q24.3, 2q35q36	2p11p13.3, 2q14q31, 2q33qter	1p34.1pter, 1p12q25	1p34, 1q21qter
		4q		2p14pter	2p14pter, 2q11q14
		5q12, 5q34qter	5q11.2q13, 5q23, 5q32qter 6p23pter, 6p21.2p21.3 8p	-	3p25pter, 3q13qter 4p15.3pter
		-	9	5q15q21	5q14q22, 5q23q31
			10q21q22.1,	6p21.1p25	6p24, 6p21p23, 6p12p21.2
		11p11.2pter, 11q14.1q25	11p11pter, 11q13.4qter	7p14pter, 7q11.2	7p15p21.1, 7q11.22
		-	14q11q12, 14q24qter	8q	8q, 8q11.2q13, 8q24.1q24.2
		-	17p12p13.1	10p14pter	10p14pter
			22	-	11q11q12 11q12q13.4
				16 17p13pter	13q31q33 16 17p13.2

Paciente	Estadio grado	Pérdidas		Ganancias	
		cCGH	aCGH	cCGH	aCGH
B06				19 20	19q13.3qter 20
B07	T2Ga		1p31q12,	1p31,3pter, 1p13.1q21.3	1p31pter, 1q21q24,
		2q22q32.1 4p14p15.3, 4q21.3q35	2 4p15p14,	- 5p14q11.2	3 5p14pter, 5p13p12
		8p23.2pter, 8q22.3q23 9p21pter	5q11.2q14, 8 9p21p24	- 7p11.1q11.2	6 7p11q24, 7q36,
		-	10p14p15	-	10q22q23, 11p11, 11q12- 11q13.2, 11q13.3qter
		11q22, 11q25 13q21.1q22, 13q34	11p12ptel	-	12p11.2q12.34,
			-	14q32.3	14q23.qter
				16p12q13	16p, 16q23q24
				-	17p11p13.1, 17q21.3q22, 17q25
				18p	18pq11
				19	19q12q13.2
				20p11.2q12	20p11q12
				-	21
B08	T2Ga	-	1p34,3pter	1p32.1p34.2 , 1p13.1q23;1 q32.1	1p32.3p34.2, 1q21qter
		2q22q24.1 3p26, 3p12	2q22, 2q37 -	2p22pter 5p15.1pter	2p16pter 5p
		4q13.3q24	4pterq26	6p21.3	6p21
		5q11.2q34	5q	7q36	-
		6q22.1q26	6q22qter	8q24.3	8q24.3
		-	7p12pter	9q34	9q34
		-	9	10p15	10p
		10q21.1q21. 2	10q	11p11q13	11p11.12q14.1
		11p11.2p15. 3	11p, 11q21q23, 11q24q25	-	13
		-	18q12qter	14q32.2q32. 3	14q23qter
		-	19p	6q22qter	16q22qter
		-	21q21.2qter	17p11.2qter 18p11.1p11. 2	17q11.2qter 18pterq12
				19	19q
				20q	-
				-	21q21

Resultados

Paciente	Estadio grado	Pérdidas		Ganancias			
		cCGH	aCGH	cCGH	aCGH		
B09	T2Ga	-	1p12p13	3q26.1q29	1p35		
		2q37.3	2p24.1p25, 2q34qter	-	2p16p23, 2p23p24.1, 2p14q33, 3q26qter, 4p15pter,		
		-	3q12q21	-	-		
		4q31.3qter	4p15.3q13, 4q24qter	-	-		
		5q21	5q11q35	5pterp14	5p,		
		-	6p21.3p22	-	6p12p21.2, 7p21.3pter,		
		-	8p23, 8p12p21.2	7p22, 7q22q31.1	7q11q31.3, 8p12qter,		
		9p21p24	9pterq32	8p11.1p12, 8q22.1q24.3	-		
		-	12q24.32qter	-	10pterq23, 11p11.2p15.2, 12q23q24.2, 14q24.2q24.3, 3		
		-	13q12q14	-	15q21.3q26.1, 1		
		-	14q21q22	-	16p11.2qter, 18p,		
		-	15q12q21	14q24.2q24.3	19p13.2q13 20p13, 20p11.22p12.1, 20p11.2q11.2, 20q13.1		
		-	16p12p13	15q22.3q26.1	-		
		-	17p13q12	-	-		
		-	20p12, 20q11.2q12	-	-		
		21p11.2pter	21	-	-		
		B10	T1Ga	2q34q36	2q34q36	1p34.3pter, 1p13.1q23	1p34p35p35, 1q21q25
				3p14.1p21	3p14p21.2	-	3q12qter
				4p15.2p15.3	4p15.2p16, 4q25q28	-	4q13q21, 4q32.3qter
				5q14q34	5q	5p	5p
-	6q23qter			9q34	9q34		
-	8p23			13q34	13		
9p23p21	9p21p23			17q21.2q25	17q21.q25		
-	10			18p11.1p11.	-		
-	11q22.3qter			19	-		
-	14q11q12, 14q24qter			20	20		
-	16q11.2q12.1			-	21q22		
-	17p			22q13	-		
B11	TaGa			-	2p12qter	1q22q31	1q12q23
				-	5p15.3	2p23pter	2p25.1
		-	6q14qter,	5p	5p15.3, 5p12p15.3		
		-	8pterq11, 8q24	6p22.3pter	6pterq13		
		-	10q	-	7q11qter		
		-	12q24.32q24.33	10p14pter	10p12.3p15.2		
		13q14q21.1	13q14q21.1	12p12.3pter	12pterq24.32		
		18q23	18q	17q23q25	17q23qter		
-	22	20q	20q				

Paciente	Estadio grado	Pérdidas		Ganancias	
		cCGH	aCGH	cCGH	aCGH
B12	TaGa	5q11.2q22 - 9 11q25	5p15.2, 5q11.2q22 8p21.2p22 9 11p15.4pter, 11q23.2qter	1q22q44 20 22	1q21qter 20 22
B13	TaGb	9q21.3q33	9q21q33		

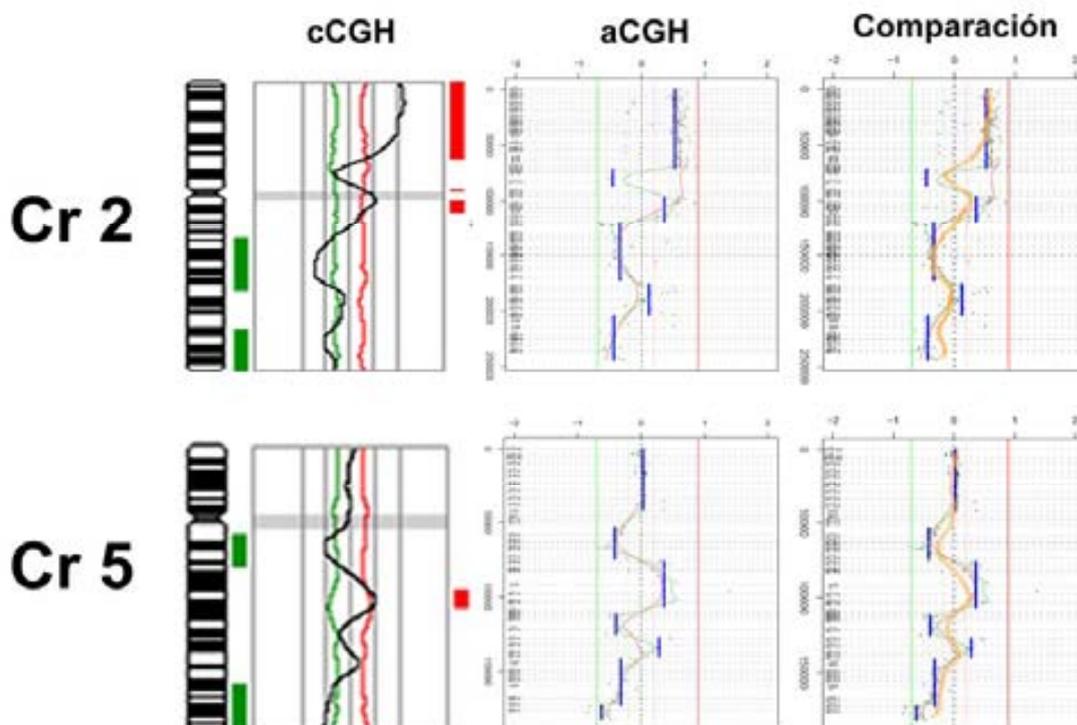


Figura 4.2.1 Ejemplos de desequilibrios encontrados en el tumor B06 en los cromosomas 2 y 5. Se muestran de izquierda a derecha los resultados obtenidos mediante cGH, aCGH e integración de ambas técnicas (la línea naranja muestra los resultados de cGH y la línea azul representa la información obtenida mediante aCGH). Como puede observarse la aCGH detecta más desequilibrios que la cGH.

Si bien el número de tumores Ta y T1 era muy reducido para hacer comparaciones, se observó que el número y extensión de los desequilibrios iba aumentando en relación al estadio (figura 4.2.2). La extensión del genoma afectado se definió como fracción del genoma alterado (FGA). El cálculo de la FGA mostró que los tumores Ta presentaban un 9,3% del genoma alterado, siendo las pérdidas equivalentes a las ganancias (4,8% del genoma alterado correspondía a ganancias y 4,5% a pérdidas). En los tumores T1, el daño genómico era tres veces superior (28% del genoma alterado, con un 13% ganado y un 15% perdido). Los tumores músculo infiltrantes mostraron un daño genómico similar a los T1 con un 28% del genoma dañado, del cual un 15% correspondía a ganancias y un 13% a pérdidas. El análisis de los tumores T2, T3 y T4 por separado mostró que los T3 presentaron el mayor porcentaje de alteraciones con un 32% del genoma alterado (17% ganancias y 15% pérdidas). Este porcentaje disminuía en los T4, sobre todo por un descenso de las pérdidas (20% del genoma alterado, 12% ganancias y 8% pérdidas).

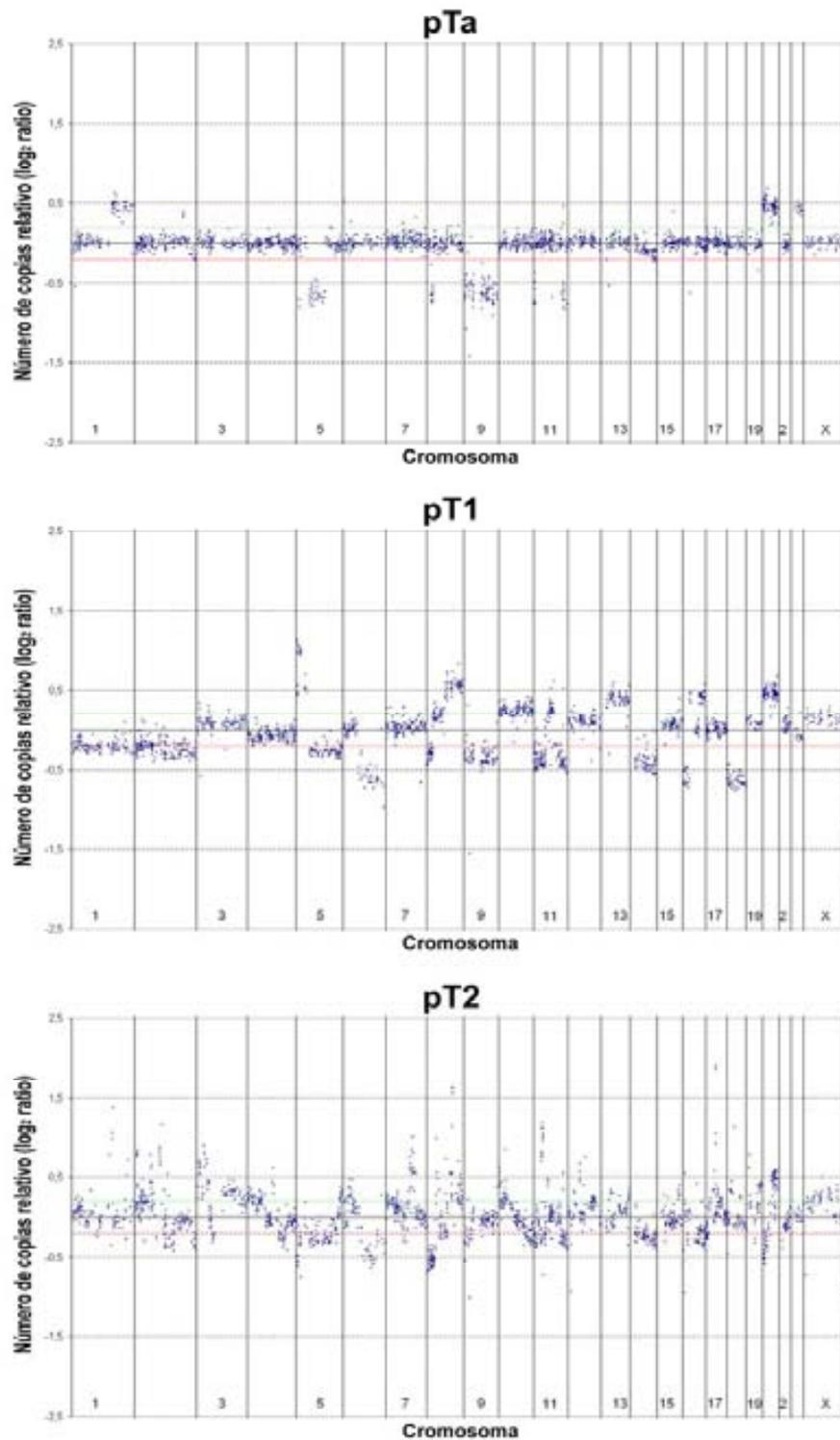


Figura 4.2.2 Ejemplos del perfil del genoma completo obtenido mediante aCGH de un tumor Ta, un tumor T1 y un tumor T2. Obsérvese como el número de desequilibrios genómicos aumentan con el estadio.

Para establecer el perfil genómico de los tumores estudiados, se consideraron únicamente los 18 tumores músculo infiltrantes. Este perfil se muestra en la figura 4.2.3, en la que se puede observar que prácticamente todos los cromosomas están alterados confirmando la elevada inestabilidad del genoma de estos tumores. Además de las alteraciones en 5p y/o 5q, los desequilibrios más frecuentes correspondieron a ganancias en 1q, 2p, 3pq, 6p, 7, 8q, 10p, 17q, 18p, 19q, 20q y pérdidas en 2q, 4pq, 6q, 8p, 9, 11pq, 13q, 14q y 15q.

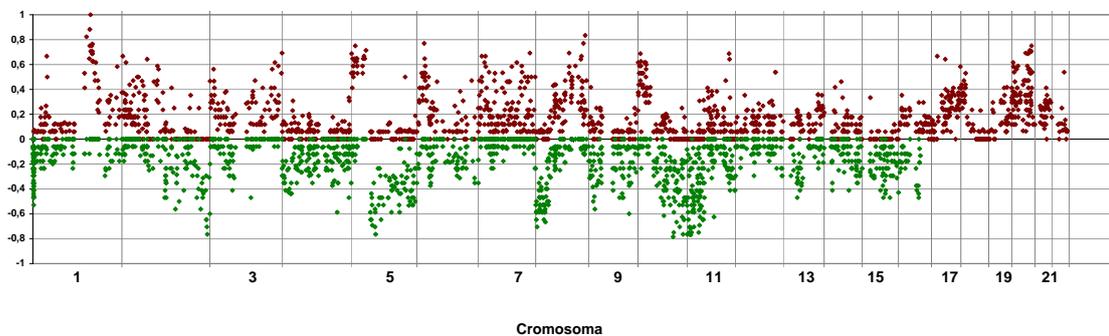


Figura 4.2.3 Frecuencias de desequilibrios observados en los tumores músculo infiltrantes analizados mediante aCGH.

Amplificaciones y deleciones en homocigosis

De forma recurrente, en más de dos tumores, se detectaron amplificaciones de alto nivel en diversas regiones del cromosoma 1q, en 5p, 6p22.3, 8q22.2 y 19q12, q13 (tabla 4.2.3). En las figuras 4.2.4 y 4.2.5 pueden verse algunos ejemplos de estas amplificaciones. En el cromosoma 6p22.3, el clon más frecuentemente amplificado incluía el gen *E2F3*. El cromosoma 1q presentaba patrones de amplificación complejos implicando numerosos genes. En dos de los casos con amplificación de 1q23, el clon que contenía el gen *UHMK1* fue el que presentó un mayor grado de amplificación. En 1q21.2 uno de los clones amplificados se hallaba muy próximo a *CKS1*. Las amplificaciones en 5p abarcaban, generalmente, toda la región de brazos cortos; aunque se detectaron dos regiones concretas en 5p13.2 y 5p15.33 que se amplificaban en más de dos muestras. Uno de los clones amplificado de forma recurrente en 19q12 incluía el gen de la ciclina E.

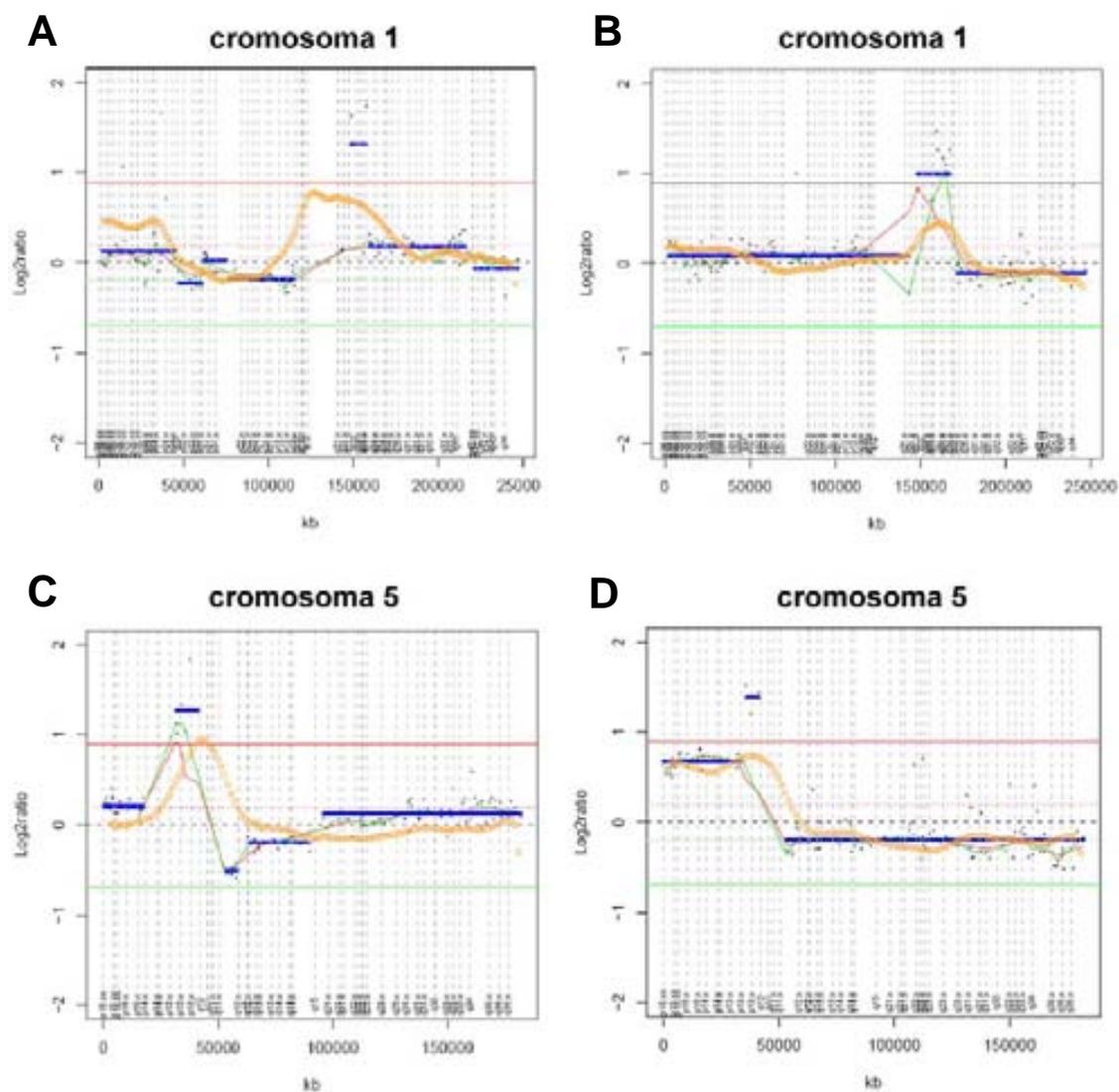


Figura 4.2.4 A-B ejemplos de 2 tumores con amplificación en 1q. C-D ejemplos de 2 tumores con amplificación en 5p.

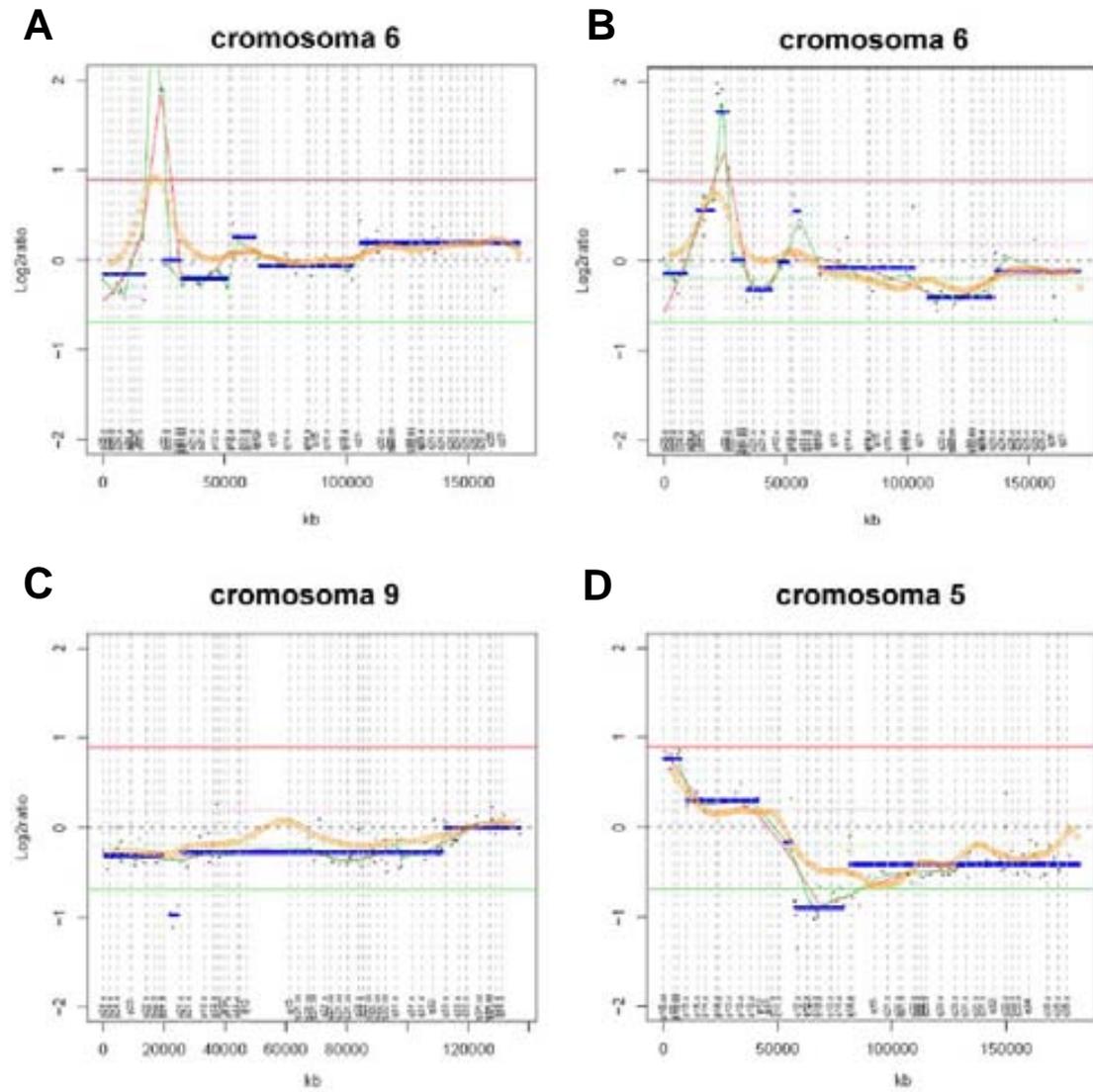


Figura 4.2.5 A-B ejemplos de amplificación en 6p22. C-D ejemplos de deleción en homocigosis, en 9p21 y 5q

Tabla 4.2.3. Clones amplificados en al menos dos muestras

Clon	Banda cromosómica	Genes	Nº de tumores
RMC01P52		<i>MYCL1</i>	2
RP11-71L20	1q21.3	<i>PI4KB, RFX5, SELENBP1, PSMB4, POGZ</i>	3
RP11-97G24	1q23.2q23.3	<i>SLAMF6, KALI, CD84, SLAMF1</i>	3
RP11-8D14	1q23.3	<i>CD48, SLAMF7, CS1, LY9, CD244, 2B4</i>	5
RP11-260G23	1q23.3	<i>UHMK1, UAP1</i>	3
RP11-28D10	1q24.2	<i>MPZL1</i>	2
RP11-167M6	1q24.2	<i>ADCY10, BRP44, DCAF6</i>	2
RP11-249C5	1q24.2	<i>DCAF6, GPR161, TIPRL</i>	2
RP11-171H24	1q24.2		2
RP11-184N12	1q24.2	<i>LOC284688</i>	2
RP11-542B5	2p25.1-2p25.2	<i>LOC339788</i>	2
RP1-24H17	5p15.33		2
RP11-94J21	5p15.33	<i>CLPTM1L, SLC6A3, LPCAT1</i>	2
RP11-85N3	5p13.2	<i>SPEF2</i>	3
RP11-253B9	5p13.2	-	2
RP11-9G14	5p12	<i>D5S634</i>	2
RP11-43B4	6p22-6p23	<i>D6S1700</i>	3
RP11-159C8	6p22.3	<i>E2F3</i>	3
RP11-3D15	6p22.3	-	3
RP11-273J1	6p22.3	-	4
RP11-53I19	6p22.3	-	2
RP11-224B15	6p22.3	<i>IBD3, KIAA0319</i>	2
RP11-52C20	6p22.3	-	2
RP11-208E21	8q22.2	<i>VPS13B</i>	2
RP11-10G10	8q22.2	<i>SPAG1, RNF19A</i>	2
RP11-102K7	8q22.2	<i>SPAG1, RNF19A, Dorfin</i>	2
RP11-46I12	19q12	<i>UQCRCF1</i>	2
RP11-110J19	19q12	<i>AK094793</i>	2
CTB-25O22	19q12	<i>CCNE1</i>	3
RP11-92J4	19q13.1	<i>THAP8</i>	2
RP11-91H20	19q13.13	<i>WDR87, SIPA1L3</i>	4
RP11-140E1	19q13.13-19q13.2	<i>SIPA1L3, DPF1, PPP1R14A, SPINT2, YIF1B, C19orf33, IMUP, KCNK6, CATSPERG</i>	3
RP11-118P21	19q13.2	<i>ACTN4</i>	2

De forma recurrente, se detectaron pérdidas en homocigosis en 8p23.2, 9p21, 9q32 y en amplias regiones de 5q, 11p y 11q (tabla 4.2.4). Una de las pérdidas en homocigosis más frecuente incluía el gen *CDKN2A* en 9p21, confirmando la importancia del mismo en la carcinogénesis urotelial (figura 4.2.5).

Tabla 4.2.4. Clones delecionados en homocigosis en al menos dos muestras

Clon	Banda cromosómica	Genes	Nº de tumores
RP11-143O12	5q11.2	-	2
RP11-15P2	5q12.3	<i>MAST4</i>	3
RP11-40N8	5q13.1	-	2
RP11-267K19	5q12	-	2
RP11-62D9	5q13.3	<i>CRHBP, AGGF1, ZBED3, SNORA47, LOC728723</i>	2
RP11-275E14	5q14.2-q14.3	<i>VCAN</i>	2
RP11-135F5	5q14.3	<i>D5S617</i>	2
RP11-246G24	8p23.2-8p23.3	-	2
CTB-65D18	9p21	<i>CDKN2A/p16</i>	4
RP11-44J18	9q21.12	<i>MAMDC2</i>	3
RP11-46P18	9q32	<i>COL27A1, KIAA1870, ORM1, ORM2, AKNA</i>	2
RP11-98L18	11p15.4	<i>OR52B2, FAM160A2, CNGA4, CCKBR</i>	2
RP11-205O15	11p15.4	<i>SYT9</i>	3
RP11-170F20	11p15.4-p15.3	<i>LYVE1, HAR, MRV11</i>	2
RP11-80B10	11p15.1	<i>NAV2</i>	2
RP11-13O19	11p15.1	<i>NAV2</i>	2
RP11-199K11	11p15.1	<i>NAV2</i>	2
RP11-62G18	11p15.1	<i>NAV2</i>	2
CTD-208O19	11q13.4	-	2
RP11-35P15	11q23.3	<i>DSCAML1, KIAA1132</i>	3
RP11-8K10	11q23.3	-	2
RP11-133I16	11q23.3	<i>GRIK4</i>	4
RP11-35M6	11q24.1	<i>GRAMD1B</i>	2
RP11-7F12	11q25	<i>NTM</i>	2
RP11-17M17	11q25	<i>OPCML</i>	2
RP11-27H17	11q25	<i>NCAPD3</i>	2
RP11-48J15	Yp11.3	<i>RPS4Y1</i>	2
RP11-20H21	Yq11.222	<i>TTY9B, TTY9A, HSFY2, HSFY1</i>	4
RP11-236J18	8q21.13	<i>STMN2</i>	4
RP11-256K9	Yq11.223	<i>EIF1AY</i>	3
RP11-140H23	Yq11.223	<i>DKFZp666C074, DAZ1, DAZ4, DAZ2, DAZ3</i>	2

Validación de los genes seleccionados en las regiones de amplificación

Mediante la técnica de aCGH se observó que además de la ganancia y amplificación de 5p, de forma predominante, estaban implicadas las regiones 1q21.2, 1q23.3, 6p22.3 y 19q12. Se seleccionaron los genes *E2F3* y *CCNE1* contenidos en clones que se amplificaban en 6p22.3 y 19q12 respectivamente. Debido a que los resultados de aCGH no nos aportaban información precisa sobre la amplificación de las regiones en 1q y 5p, se decidió seleccionar los genes *UHMK1* (incluido en un clon de 1q23.3), *CKS1* (1q21.2) y los genes *TRIO*, *SKP2*, *FGF10* (5p). Esta selección se hizo, en parte, teniendo en cuenta los datos de la literatura.

Para validar estos genes como candidatos a ser diana de las amplificaciones se procedió al análisis mediante FISH en dos arrays de tumores.

La técnica de FISH se aplicó según la metodología descrita en el apartado 3.2.7. Las sondas de hibridación se construyeron a partir de BACs según está descrito en el

apartado 3.2.5. Este estudio se completó con el análisis del gen *CDKN1b* que codifica la proteína p27 implicada en la misma ruta de control del ciclo celular.

En los arrays de tejidos se incluyeron los tumores B01-B13 del presente estudio y 15 tumores adicionales de los que se disponía de información mediante CGH convencional (apartado 4.1). Estos nuevos tumores, excepto un T1G3, eran músculo infiltrantes.

Los resultados obtenidos se indican en la tabla 4.2.5. En la figura 4.2.6. se muestran ejemplos de las amplificaciones detectadas.

El gen *UHMK1* o *hKIS* se observó amplificado en un 19% de los tumores analizados. La alta ganancia (≥ 5 copias) se observó en un 50% de los casos. El gen *CKS1* se amplificó en un 23% de los tumores, con alta ganancia en un 45% de los mismos. La coamplificación de ambos genes se observó en un tumor (B01).

Dentro de la región 5p se seleccionaron tres genes: *TRIO*, *SKP2* y *FGF10*. De ellos, el que presentó amplificación en un mayor número de tumores fue *SKP2* (40% de los casos). En cinco tumores se observó la amplificación de *TRIO* junto con *SKP2*.

El gen que presentó un mayor número de amplificaciones fue *E2F3*, un 48% de los tumores analizados presentaban este gen amplificado.

El gen de la ciclina E (*CCNE1*) se amplificó únicamente en 4 tumores (16%). El gen de la p27 (*CDKN1b*) presentaba una dosis normal en la mayoría de las muestras analizadas.

Dos tumores (B01, B28) presentaron amplificación de *CKS1*, *SKP2*, *E2F3* y *CCNE1*. Es interesante destacar que B28 era un tumor T1G3. En cinco tumores se observó la amplificación de *SKP2* y *E2F3*.

Las amplificaciones detectadas mediante FISH coincidieron con las detectadas mediante aCGH excepto en dos tumores (B01 y B06) en los que la amplificación de *SKP2* se detectó únicamente por FISH. Cuando se compararon con los resultados obtenidos mediante CGH en cromosomas metafásicos, esta última técnica no había detectado la amplificación de *E2F3* presente en un tumor (B07) ni las de *SKP2* en dos tumores (B01, B06) y *CKS1* en un tumor (B09).

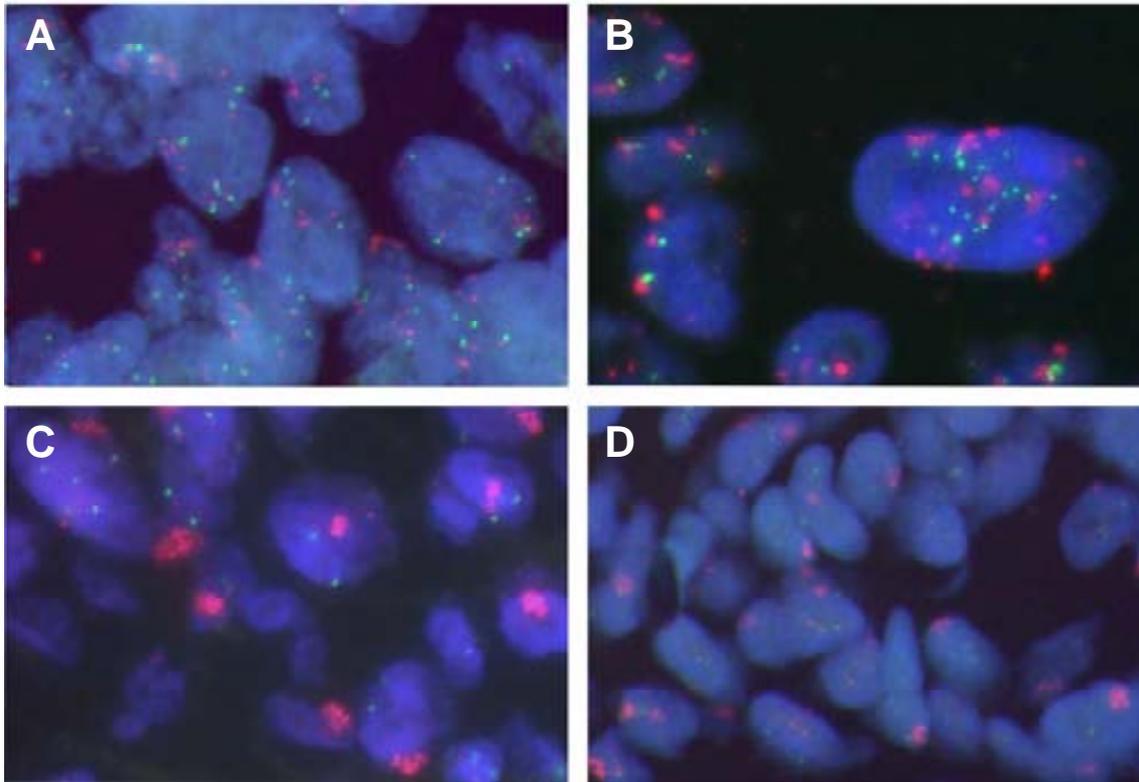


Figura 4.2.6 Ejemplos de amplificaciones de los genes *SKP2*, *CKS1*, *E2F3* y *CCNE1* encontradas en los tumores. A) en rojo *SKP2*, en verde *TRIO*. B) en rojo 1q21.1, en verde *CKS1*. C) en rojo *E2F3*, en verde centrómero del 6. D) en rojo *CCNE1*, en verde 19p13.1.

Tabla 4.2.5. Resultados de FISH y tinción inmunofluorescente

Paciente	Estadio/ Grado	UHMK1		CKS1		TRIO		SKP2		FGF10		E2F3		p27		p27		CCNE1		pRB	
		FISH	FISH	FISH	proteína (%)	FISH	proteína (%)	FISH	proteína (%)	FISH	proteína (%)	FISH	proteína (%)	FISH	proteína (%)	FISH	proteína (%)	FISH	proteína-P (%)	FISH	proteína-P (%)
B01	T4Ga	amp	amp	amp	90	g	amp	18	g	amp	0	amp	alt g	alt g	alt g	24	amp	negativo	amp	negativo	
B02	T4Ga	amp	alt g	alt g	-	alt g	alt g	0	alt g	alt g	0	alt g	alt g	alt g	0	g	0	g	alt g	negativo	
B03	T3Ga	alt g	alt g	alt g	14	alt g	alt g	0	alt g	-	0	-	-	alt g	0	g	0	g	alt g	negativo	
B04	T3Ga	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B05	T2Ga	alt g	amp	alt g	35-70	alt g	alt g	10	alt g	alt g	4	amp	amp	normal	-	-	-	alt g	alt g	negativo	
B06	T2Ga	amp	alt g	amp	0	amp	amp	4	amp	amp	30	amp	amp	-	-	-	amp	amp	alt g	negativo	
B07	T2Ga	alt g	alt g	alt g	60-80	alt g	alt g	30	amp	amp	0	amp	amp	normal	5	alt g	5	alt g	alt g	20-50	
B08	T2Ga	alt g	alt g	alt g	-	alt g	alt g	0	alt g	g	0	g	g	g	0	normal	0	normal	normal	negativo	
B09	T2Ga	alt g	amp	amp	18	amp	amp	30	alt g	alt g	60	alt g	alt g	alt g	0	g	0	g	g	negativo	
B10	T1Ga	amp	g	g	17	g	g	60	g	g	30	-	g	normal	0	normal	0	g	g	< 5	
B11	TaGa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B12	TaGa	normal	-	normal	30	normal	normal	<30	normal	normal	0	normal	normal	normal	0	normal	0	normal	normal	12-15	
B13	TaGb	normal	normal	alt g	0	alt g	alt g	0	alt g	alt g	0	alt g	-	-	0	-	0	-	-	negativo	
B14	T3Ga	alt g	amp	g	80	g	g	25	g	alt g	g	alt g	alt g	g	0	normal	0	normal	normal	negativo	
B15	T3Ga	g	g	g	60	g	g	0	g	normal	0	normal	normal	g	0	normal	0	normal	normal	-	
B16	T2Ga	alt g	g	amp	-	amp	amp	-	amp	amp	-	amp	g	g	-	-	-	alt g	alt g	40	
B17	T2Ga	amp	g	amp	5	amp	amp	33	amp	amp	33	amp	amp	alt g	14	g	13	g	g	13	
B18	T2Ga	alt g	alt g	alt g	1	alt g	amp	72	alt g	amp	72	-	alt g	g	0	normal	0	normal	normal	negativo	
B19	T2Ga	amp	-	-	-	g	g	34	g	amp	34	-	normal	g	0	g	0	g	g	33	
B20	T2Ga	g	-	-	20	-	-	21	-	-	21	-	-	-	0	g	0	g	g	17	
B21	T2Ga	alt g	alt g	g	90	g	g	100	g	g	100	g	amp	g	0	normal	0	alt g	alt g	negativo	
B22	T2Ga	normal	g	normal	-	normal	normal	-	normal	normal	-	normal	normal	normal	-	-	-	g	g	-	
B23	T2Ga	alt g	alt g	amp	20	amp	amp	21	amp	amp	21	-	amp	g	13	normal	-	normal	normal	negativo	
B24	T2Ga	g	g	g	4	alt g	alt g	25	alt g	alt g	25	-	amp	g	0	g	0	g	g	50	
B25	T2Ga	alt g	alt g	alt g	26	alt g	alt g	80	alt g	alt g	80	-	alt g	alt g	5	alt g	5	alt g	alt g	50	
B26	T2Ga	alt g	alt g	alt g	60	g	amp	25	g	amp	25	-	amp	alt g	0	alt g	0	amp	amp	26-32	
B27	T2Ga	normal	-	normal	0	normal	normal	0	normal	normal	0	normal	normal	normal	0	normal	0	alt g	alt g	negativo	
B28	T1Ga	alt g	amp	g	50	g	amp	90	g	amp	90	-	amp	alt g	30	alt g	30	amp	amp	90	

amp: amplificación; g: ganancia; alt g: alta ganancia; p: pérdida; proteína-P: proteína fosforilada; negativo: negativo para la proteína fosforilada y sin fosforilar.

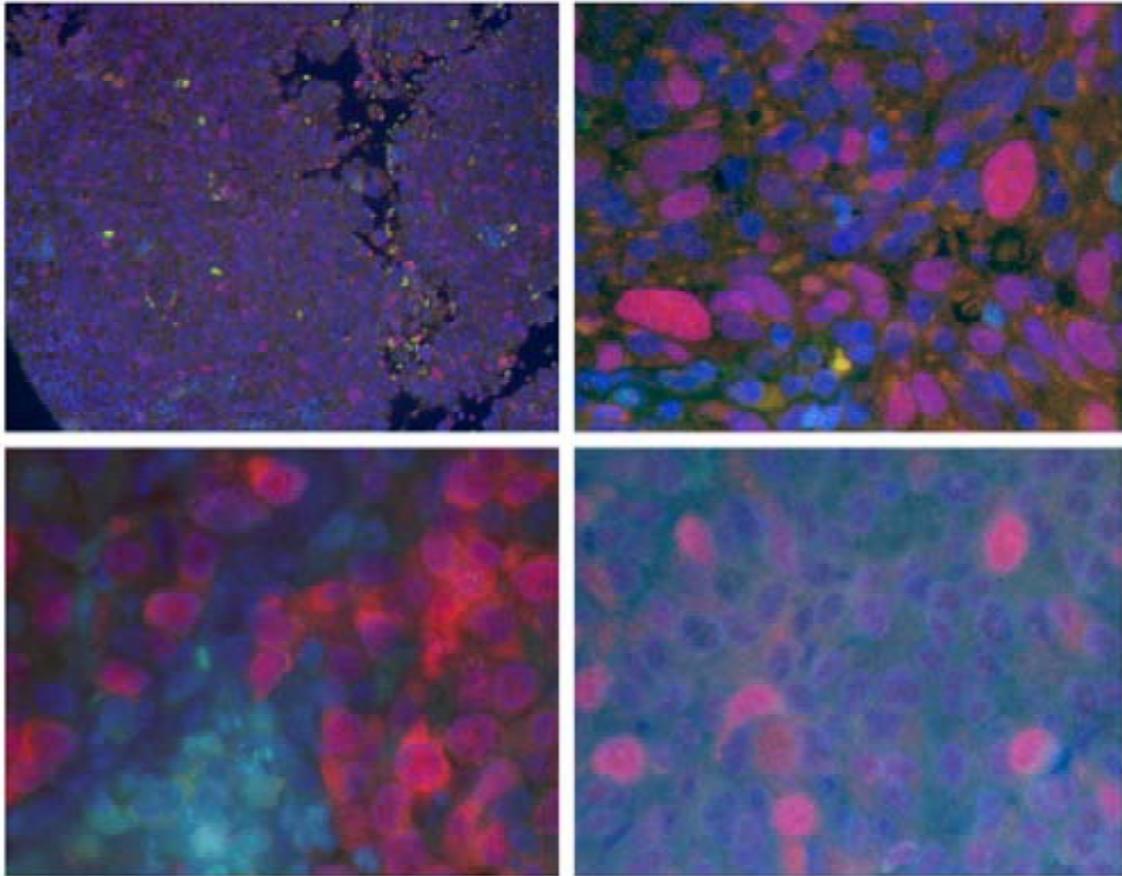


Figura 4.2.7 Tinción inmunofluorescente. A) cilindro de un tumor altamente positivo para SKP2 (rojo). B) tumor altamente positivo para SKP2 (rojo) y negativo para p27, observe la presencia de linfocitos altamente positivos para p27 (verde), C) tumor altamente positivo para CKS1 (rojo) y negativo para p27, observe la presencia de linfocitos altamente positivos para p27 (verde). D) tumor con expresión moderada de CKS1 (rojo).

Correlación entre la dosis génica y expresión de la proteína

A continuación se analizó la expresión de las proteínas CKS1, SKP2, p27 y pRB en el mismo array de tumores. Se incluyó el análisis de la proteína del retinoblastoma (pRB) puesto que ocupa una posición central dentro de la vía de control del ciclo celular. La expresión de proteínas se analizó por inmunofluorescencia según la metodología descrita en el apartado 3.2.8. Las proteínas E2F3 y ciclina E no se pudieron analizar al no disponer de anticuerpos adecuados.

Los resultados se indican en la tabla 4.2.5. En la mayoría de los tumores incluidos en nuestro grupo de estudio, se observó una elevada expresión de las proteínas SKP2 y CKS1, junto con una expresión reducida de p27 (figura 4.2.7). Los cinco tumores con amplificación del gen *CKS1* mostraron una elevada expresión de la proteína. Algo

similar sucedió con el gen *SKP2*, observándose amplificado en 10 casos, de los cuales ocho mostraron una marcada expresión de la proteína. La proteína p27 se encontró infraexpresada en todos los casos estudiados, ya que ninguna de las muestras mostró tinción nuclear en al menos el 50% de las células. En lo que la pRB se refiere, un 52% de los tumores no mostraron expresión alguna de la misma, y en aquellos tumores que sí se expresaba, se encontró siempre hiperfosforilada.

En resumen, en nuestro grupo de tumores, en su mayoría músculo infiltrantes y con frecuentes alteraciones en el cromosoma 5, se encuentran afectadas las proteínas p27 y pRB. Se observa una expresión elevada y generalizada de CKS1 y SKP2, existiendo una correlación negativa con la expresión de p27 y pRB. El gen que con mayor frecuencia se amplifica en esta serie de tumores músculo infiltrantes es *E2F3* confirmando su papel en la progresión tumoral.

4. 3. INESTABILIDAD CROMOSÓMICA EN EL CÁNCER DE VEJIGA

La aneuploidía, las anomalías del centrosoma y la amplificación génica son características de la inestabilidad cromosómica (CIN) en cáncer. Hasta el momento no existen estudios previos respecto al comportamiento *in vivo* de estos fenómenos en un mismo tumor de vejiga. Por ello nos planteamos estudiar el comportamiento del amplicón de *CCND1* (gen de la ciclina D1) y la heterogeneidad en el número de copias del cromosoma 11 como señal de la inestabilidad cromosómica en el cáncer de vejiga. Para ello se analizaron 22 tumores incluidos en parafina mediante CGH convencional y FISH. Con el objetivo de esclarecer la heterogeneidad cromosómica observada en nuestras muestras, se investigó la integridad de los centrosomas y huso mitótico mediante tinción inmunofluorescente.

Se estudiaron 22 tumores de vejiga fijados en formalina e incluidos en parafina procedentes de la fundación Puigvert y Hospital del Mar de Barcelona. El estadio y grado tumoral se definió de acuerdo a la clasificación WHO (1973). Todos los tumores, exceptuando uno, eran no músculo infiltrantes o mínimamente invasivos (9pTa, 11pT1 y 1pT2). De los 22 casos, seis eran grado 1, ocho grado 2 y ocho grado 3. Los datos clínicos e histopatológicos se muestran en la tabla 4.3.1. En uno de los pacientes (caso U-443) se estudiaron además, tanto la primera recidiva del tumor, como las sucesivas metástasis a pene y nódulo linfático inguinal.

Tabla 4.3.1. Características de los pacientes y resultados del estudio

Caso	Edad Sexo	Estadio Grado	U/M	CIS	Número modal	Índice CIN	Status CCND1	Subpo p	CS (%)	Tamaño C (µm)	HM CA (%)	Recurrencia (meses)	Sup	MT
U-400	45/♂	TaG1	U	-	2	17.64	-	No	0	0.8	- 0	0	>6 años	No
U-114	63/♀	TaG1	U	-	2	20	-	No	3,8	1.10	- 0	1;(19)	>6 años	No
U-408	66/♂	TaG2	U	+	2	20.18	-	No	0	0.98	- 0	3;(4),(60),(8)	>6 años	No
U-814	68/♂	T1G2	M	-	2	23.97	g	No	1	0.63	- 0	5;(8),(15),(34),(43),(3)	>5 años	No
U-373	52/♀	TaG2	M	-	2	25.9	-	No	0	0.9	- 0	1;(37)	>6 años	No
U-906	58/♂	TaG1	U	-	2	25.41	-	No	1	0.81	- 0	1;(67)	>5 años	No
U-433	68/♂	TaG1	U	+	2	28.75	-	No	?	?	?	1;(28)	>6 años	No
U-611	54/♂	T1G3	U	+	2	33.7	-	No	0	2.04	+ 0	0	>42 meses	No
U-443	62/♂	T1G3	U	-	2	34.16	HSR	Sí (3)	0	0.98	- 0	3;(17),(13)*,(34)*	67 meses	Sí
U-955	48/♂	TaG1	U	-	2	37.91	-	No	0	0.8	- 0	0	>6 años	No
U-089	45/♂	TaG2	U	-	2	43.33	-	No	5	1.21	+ 0	2;(8),(13)	>5 años	No
U-150	60/♂	T1G2	U	-	2	43.51	HSR, DM	Sí (2)	21	4.88	+ 0	5;(10),(17),(9),(6),(7)	54 meses	Sí
U-617	67/♂	TaG1	U	-	2	47.5	-	No	?	?	? ?	2;(9),(11)	>6 años	No
U-324	52/♂	T2G3	U	-	4	52.22	-	No	12	1.02	+ 10	0(Cystectomy)	>4 meses	No
U-013	73/♂	T1G2	U	+	2	54.83	-	No	4	1.06	- 0	0	>41 meses	No
U-532	51/♂	T1G3	M	+	2	57.14	g	No	38	0.68	+ 7	0	>6 años	No
U-076	67/♂	T1G3	M	+	2	60.41	HSR, DM	Sí (2)	20	2.22	+ 17	3;(9),(4),(10)	31 meses	Sí
U-866	40/♂	T1G3	M	+	3	65.68	g, HSR, DM	Sí (3)	0	5.69	+ 0	-	36 meses	Sí
U-364	73/♂	T1G3	U	-	2	67.61	g, HSR ¹ , HSR ²	Sí (3)	27	2.06	+ 17	0	>3 meses	No
U-183	62/♂	T1G3	M	+	3	70	HSR	No	5	1.18	+ 0	0	>6 años	No
U-466	71/♂	T1G2	U	-	4	70.66	g	No	?	?	? ?	1;(14)	>6 años	No
U-564	55/♂	T1G2	U	-	2	70.68	g	No	0	2.01	+ 0	2;(10),(3)	>6 años	No

U/M: Único/Múltiple, CIS: Carcinoma in Situ, Subpop: Presencia y número de subpoblaciones, CS: Porcentaje de células con centrosomas supernumerarios, Tamaño C: Tamaño medio del centrosoma, CA: Centrosoma anómalo, MM: Metafase multipolar, g: Ganancia, HSR: Región de tinción homogénea, DM: Diminutos dobles. MRC: Muerte relacionada con el tumor.

Heterogeneidad intratumoral y clasificación de los tumores de acuerdo con su índice CIN

Debido a que la CIN genera variaciones del número de cromosomas intercelulares dentro de un mismo tumor, la técnica de FISH puede considerarse un sistema práctico para la detección de la CIN en muestras quirúrgicas (Nakamura, et al. 2003). En este estudio se utilizó el centrómero del cromosoma 11, como referencia del número de copias de dicho cromosoma. La FISH se realizó utilizando la sonda SpectrumOrange-CCND1/ SpectrumGreen- CEP 11 de acuerdo con el protocolo descrito en el apartado 3.2.7.

El índice CIN se definió como el porcentaje de células que no presentan el número modal para el cromosoma estudiado (Nakamura, et al. 2003; Yamamoto, et al. 2006). Las muestras se clasificaron en tres grupos de acuerdo a su índice CIN, CIN negativo (<30% de las células no presenta el número modal), moderado (>30 %< 60% de las células) y alta CIN (>60% de las células). Se estudió además mediante FISH la amplificación del gen CCND1

Tal y como hemos indicado, de acuerdo a su índice CIN (elevado, moderado y negativo), los tumores se clasificaron en tres grupos (Tabla 4.3.1). La muestras cuyo

índice CIN era superior a 30% fueron consideradas CIN positivas, 15 de 22 muestras analizadas fueron clasificadas en este grupo (68%). Los tumores CIN negativos presentaron un número modal de 2 para el cromosoma 11. Sólo una pequeña fracción de células mostró monosomía, y aún menos frecuentemente trisomía (Figura 4.3.1 A). Los tumores de CIN moderado mostraron un número modal de 2 en ocho de los nueve casos, únicamente un tumor mostró un número modal de 4 (U-324). En este grupo, la variación en cuanto al número de copias era mayor que en el grupo CIN negativo, siendo la trisomía del cromosoma 11 la alteración más frecuente (Figura 4.3.1B). El grupo de CIN elevada presentaba una gran variación en cuanto al número de copias del cromosoma 11 (Figura 4.3.1C), en este grupo la monosomía era infrecuente, el número modal era igual a 2 en tres muestras, la trisomía en dos casos y la tetrasomía en sólo uno de ellos.

El índice CIN mostró asociación respecto al grado tumoral (Figura 4.3.1D). Además, la mayoría de los tumores TaG1/G2 (6/9) se encontraban incluidos en el grupo de CIN negativo. Por el contrario los tumores T1G3 se encontraban exclusivamente en los grupos de CIN elevada (4/7) y CIN moderada (3/7) (Tabla 4.3.1).

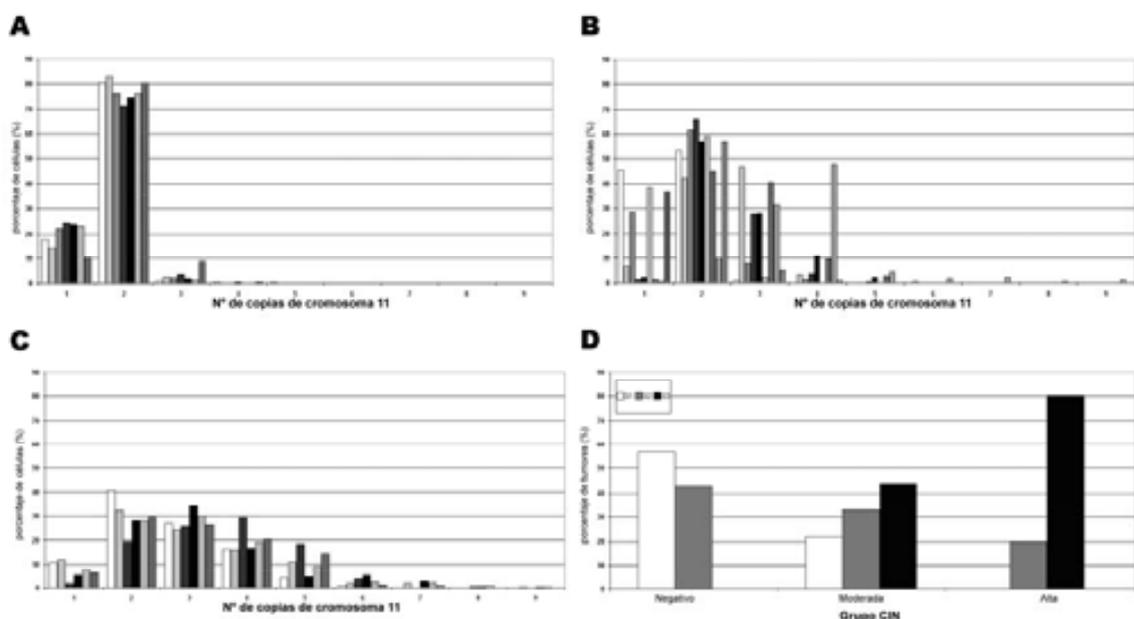


Figura 4.3.1. Variabilidad en el número de copias del cromosoma 11 en (A) tumores CIN-negativos, (B) tumores con CIN-moderada y (C) tumores con alta-CIN. (D) correlación entre el índice CIN y el grado tumoral.

Defectos en el centrosoma y metafases multipolares

En la búsqueda de la heterogeneidad cromosómica observada, tratamos de investigar la integridad del centrosoma y el huso mitótico mediante marcaje inmunofluorescente para γ -tubulina, β -tubulina y α -tubulina según la metodología descrita en el apartado 3.2.8.

Se obtuvieron resultados satisfactorios en 19 de las 22 muestras. En general, el índice CIN correlacionaba con anomalías en el centrosoma ($p < 0.005$).

No se observaron errores en el huso mitótico en aquellas muestras con número normal de centrosomas (Figura 4.3.2 A-B). En nuestro estudio, la aberración más frecuente fue la presencia de centrosomas supernumerarios. La presencia de centrosomas anormalmente grandes, fenómeno indicativo de agrupación de centrosomas, también se observó con frecuencia. Alteraciones de la forma del centrosoma, tales como centrosomas en forma de cadena, también fueron observados, pero con menor frecuencia (Tabla 1). Todas las muestras con CIN elevada ($n=6$) presentaron algún tipo de anomalía en el centrosoma. Se observó la presencia de centrosomas supernumerarios y agrupación de centrosomas en un 60% y 80%, respectivamente. (Figura 4.3.2 F-J). En dos de los casos ambos tipos de alteraciones se observaron de forma concomitante.

En el grupo de CIN moderada, cinco de los ocho casos presentaron algún tipo de anomalía del centrosoma. El 50% de los casos presentó centrosomas supernumerarios, mientras que la agrupación de centrosomas únicamente se encontró en un 25% de los casos. En una muestra se encontraron ambas alteraciones de manera simultánea (Tabla 4.3.1).

Las células normales adyacentes al tumor no presentaron alteraciones en el centrosoma (Figura 4.3.2 E). Se encontraron centrosomas en forma de cadena en tres muestras (U-150, U-866 y U-564) (Figura 4.3.2 C-E). El centrosoma de mayor tamaño ($7,33\mu\text{m}$) se observó en una muestra (U-150). Estos centrosomas extraordinariamente largos participaban en la formación de husos mitóticos bipolares (Figura 4.3.2 C-D, Tabla 4.3.1).

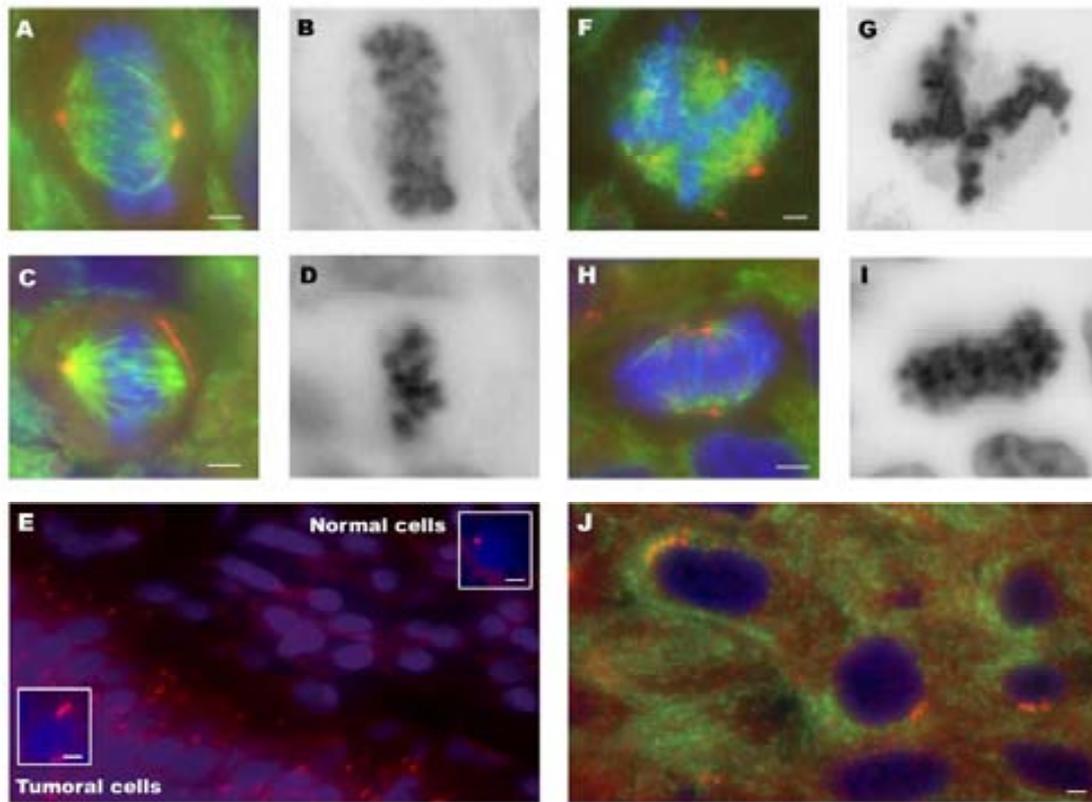


Figura 4.3.2. Ejemplos de alteraciones del centrosoma. El marcaje inmunofluorescente se realizó para γ -tubulina (rojo), α - y β -tubulina (verde). El DNA se marcó con DAPI (azul). (A-B) Huso mitótico normal/bipolar. (C-D) Huso mitótico bipolar con centrosoma en forma de fibras. (E) Células tumorales con centrosomas alargados, junto a tejido adyacente sano. (F-G) Huso multipolar. (H-I) Metafase pseudobipolar. (J) Células tumorales con centrosomas supernumerarios. Barra de escala, μm .

Se observaron metafases multipolares y/o pseudobipolares en cuatro de las siete muestras con cromosomas supernumerarios (57%) (Figura 4.3.2 F-I). La coalescencia o agrupamiento de los centrosomas supernumerarios en dos polos del huso mitótico funcionales se observó en todos los casos con centrosomas anormalmente grandes.

En resumen, la coalescencia de centrosomas supernumerarios asociada a la formación de husos mitóticos bipolares se observó en un 80% de los tumores con un mayor índice de inestabilidad remarcando la importancia de este fenómeno en la generación de inestabilidad cromosómica viable en el cáncer urotelial de vejiga.

Comportamiento *in vivo* del amplificación *CCND1*

Amplificación de CCND1: FISH vs. CGH

Se analizó el gen *CCND1* mediante FISH y cCGH. Hubo concordancia entre los resultados de ambas técnicas en 17 de los 22 casos; todas las muestras discordantes correspondían a muestras CIN positivas. En una muestra (U-532) no se detectó amplificación de 11q13 mediante CGH, sin embargo un 42% de sus células mostraron 5 o más copias de *CCND1* al ser analizadas mediante FISH, aunque el número modal era igual a 2. El mayor número de discordancias se encontró en el grupo de CIN elevada. Tres muestras (U-866, U-364 y U-183) presentaban amplificación de *CCND1* mediante FISH, por el contrario esta amplificación no se detectó mediante CGH. En otra de las muestras (U-564), se detectó pérdida del cromosoma 11 completo mediante CGH, aunque la misma mostró más de 5 copias del cromosoma 11 en un 23% de las células analizadas mediante FISH.

En resumen, la amplificación de *CCND1* ya sea en forma de HSRs o DMs se encontró en seis casos mediante FISH; sin embargo mediante CGH se detectó únicamente en tres. La amplificación de *CCND1* se observó en la mayoría de casos con alta inestabilidad (en 4 de 6), en un 22% de los casos con CIN moderada y en ningún caso del grupo de CIN negativa.

Subpoblaciones celulares intratumorales

Gracias al cuidadoso análisis mediante FISH de las muestras con amplificación de *CCND1*, se pudo identificar la presencia de distintas subpoblaciones celulares en algunas de las muestras analizadas. La subpoblación se definió como un grupo de células con una alteración cromosómica distintiva (numérica o estructural) en un área específica o limitada del tumor.

Se encontraron subpoblaciones celulares distintas en tres muestras tumorales (U-076, U-866 y U-364) con CIN elevada y en dos muestras con CIN moderada (Tabla 4.3.1). La muestra U-076 presentó dos subpoblaciones: una presentaba amplificación de *CCND1* en forma de HSR, mientras la otra presentaba amplificación en DMs, probablemente a consecuencia de una escisión de la HSR. Además, se encontraron

conformaciones intermedias, a medio camino entre ambos tipos de amplificación (Figura 4.3.3 A-H). Las amplificaciones en HSR y DM son fácilmente distinguibles en metafase, pero pueden distinguirse con facilidad también en interfase, ya que las HSRs producen una amplificación compacta, mientras que la señal de los DMs es más difusa.

En la muestra U-866 se observaron tres subpoblaciones intratumorales: La primera mostraba ganancia de *CCND1* debido a la polisomía de cromosoma 11, presentando un número de hasta 9 señales centroméricas y de *CCND1*, las otras dos subpoblaciones, mostraban un número modal de 3 para el cromosoma 11, y presentaron amplificación de *CCND1* en forma de HSR y DM, respectivamente. La coexistencia de dos subpoblaciones con HSR y DM, respectivamente, se observó también en una de las muestras de CIN moderada (U-150).

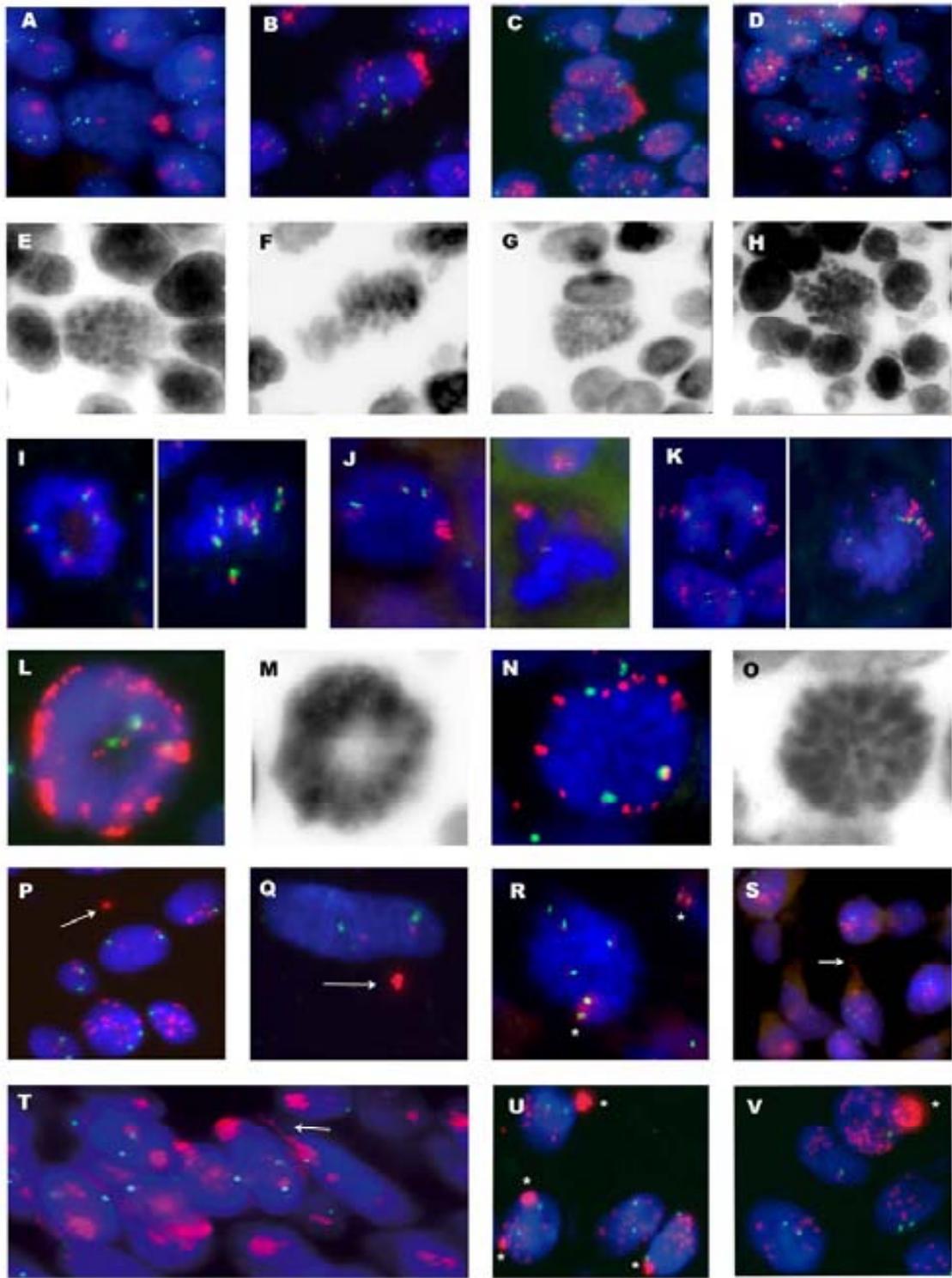


Figura 4.3.3. Resultados de *FISH* realizada sobre tumores de vejiga incluidos en parafina. El centrómero del cromosoma 11 se indica en verde y el gen *CCND1* en rojo. La tinción del DNA se realizó con DAPI (azul). Las imágenes en blanco y negro corresponden a la imagen de DAPI invertida. (A-H) Imágenes de metafases de un mismo tumor, sugiriendo una secuencia de rotura del amplicón 11q13, pasando de HSR

a DMs. (I-K) Distintos patrones de amplificación de *CCND1* observados en la muestra U-364. (I) Subpoblación con ganancia completa del cromosoma 11. (J) Subpoblación con HSR de gran número de copias de *CCND1*. (K) Subpoblación con amplificación de *CCND1* y material genético de origen desconocido. (L-O) Localización periférica de los DMs durante la metafase. (P-Q) Micronúcleos positivos para *CCND1*, ver flechas. En la imagen Q se muestra la eliminación mediante extrusión de MN de todas las copias de *CCND1*, excepto aquellas unidas a centrómero. (R) Células metafásicas mostrando cromosomas dicéntricos con dos copias para el centrómero 11 y amplificación de *CCND1*, ver asteriscos. (S-T) Presencia de puentes internucleares positivos para *CCND1* en células con HSR. (U-V) Protrusiones nucleares con alta positividad para *CCND1*, ver asteriscos.

La muestra U-364 mostró un patrón complejo de amplificación de *CCND1*. En esta muestra se detectaron tres subpoblaciones distintas. Una subpoblación presentaba una ganancia de *CCND1*, de hasta 9 copias, debido a la polisomía del cromosoma 11 (Figura 4.3.3 I); dos subpoblaciones mostraron amplificación de *CCND1* en forma de HSR, siendo estas amplificaciones distintas en tamaño y estructura. La primera de las subpoblaciones presentaba una amplificación de *CCND1* con un elevado número de copias, que en metafase podía observarse como una señal larga y compacta (Figura 4.3.3 J). La segunda subpoblación por el contrario, presentaba un patrón de amplificación distinto, caracterizado por un menor número de señales de *CCND1* y además estas señales se encontraban flanqueadas por material genético desconocido, como se podía ver en metafase (Figura 4.3.3 K).

En el paciente U-443 fue posible analizar la evolución del amplicón a lo largo del tiempo. Se detectó la amplificación de *CCND1* como HSR compacta en el tumor primario de este paciente, su recidiva y metástasis a pene (a los 13 y 30 meses, respectivamente). Sin embargo, en la metástasis a nódulo inguinal 34 meses después, se observó el cambio de la amplificación a una HSR más difusa y se observó la presencia de DMs en una pequeña población de células. Estos resultados sugieren que las HSRs pueden permanecer estables durante un largo periodo de tiempo, para luego dar lugar a DMs en una metástasis (el paciente falleció 3 meses después de la metástasis).

Cabe destacar, que únicamente los pacientes con DMs (U-150, U-076 U-866 y U-443) murieron por el tumor. Las curvas Kaplan Meier mostraron que los pacientes con DMs presentaban una supervivencia significativamente menor ($p=0,00001$)

Distribución de los DMs en la placa metafásica, micronúcleos, puentes internucleares y protrusiones nucleares.

Este análisis se realizó sobre las muestras que presentaban amplificación del gen *CCND1* en forma de DMs (U-150, U-076 y U-866) (Tabla 4.3.2). Los DMs, conteniendo la amplificación de *CCND1*, se localizaban predominantemente en la periferia de la placa metafásica (Figura 3L-O) (Tabla 4.3.2). Las células fueron analizadas sobre tejidos tumorales parafinados, haciendo posible la visualización de la localización predominantemente periférica de los DMs durante el estadio de metafase.

Todas las muestras estudiadas presentaron protrusiones nucleares y micronúcleos (MN) positivos para *CCND1*, fenómeno que no se observó en las muestras que no presentaban DMs. El tamaño de los micronúcleos variaba de un 5% a un 30% del volumen nuclear. El número de micronúcleos por cada 100 células estudiadas fue 10 a 13 (Tabla 4.3.2). En las muestras U-150 y U-076, se encontró un número significativo de micronúcleos positivos para *CCND1* (45% y 40%, respectivamente) (Figura 4.3.3 P-Q). En ambas muestras aproximadamente un 2% de los micronúcleos era positivo para el centrómero del cromosoma 11. En la muestra U-866, se encontraron 10 micronúcleos por cada 100 células, con un 24% de micronúcleos positivos para *CCND1*. Este tumor presentó una proporción mayor de micronúcleos positivos para el centrómero del 11 (24%), indicando un alto nivel de aneuploidía, comparado con las otras dos muestras (U-076 y U-150). En una pequeña fracción de células se pudo observar la eliminación total de los DMs conteniendo *CCND1* mediante la extrusión de micronúcleos, dando lugar a células con únicamente una o dos copias de *CCND1* (Figura 4.3.3 P-Q).

Tabla 4.3.2. Localización de los DMs en las metafases y frecuencia de micronúcleos

Muestra	Localización periférica de los DMs		MN Positivos para <i>CCND1</i>		MN Positivos para CEP11		MN Totales	
	por metafase	Porcentaje (%)	por núcleo	por 100 núcleos	por núcleo	por 100 núcleos	por núcleo	por 100 núcleos
U-150	22/25	88,00%	28/472	5,93%	1/472	0,21%	62/472	13,14%
U-076	27/36	75,00%	19/477	3,98%	1/477	0,21%	48/477	10,06%
U-866	15/20	75,00%	10/412	2,43%	10/412	2,43%	42/412	10,19%

DM: Double minutes, MN: Micronúcleos, CEP: Centrómero

Además, en las muestras con CIN elevada pudo observarse la presencia de cromosomas dicéntricos, puentes internucleares y protrusiones nucleares positivos para *CCND1*, indicativos de la alta inestabilidad cromosómica presente en estas muestras (Figura 4.3.3 R-V).

En resumen, este estudio representa la primera aportación en la literatura acerca de la amplificación simultánea de *CCND1* en forma de HSR y DM en tumores de vejiga. Nuestros resultados sugieren una estrecha correlación entre la fragmentación de la HSR y la aparición de DM en el mismo tumor. Estos DM son subsecuentemente eliminados mediante extrusión en micronúcleos. De forma interesante cabe destacar que solamente aquellos pacientes cuyos tumores presentaban amplificación de *CCND1* en DM mostraron un tiempo de supervivencia significativamente más corto que el resto de pacientes estudiados.

4.4. ESTATUS DE LOS GENES *CCND1*, *EGFR*, *C-MYC* Y EL LOCUS 9p21 EN EL CÁNCER DE VEJIGA SUPERFICIAL. RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS Y PARÁMETROS CLÍNICOS

Diversos trabajos han estudiado la implicación de reguladores del ciclo y la proliferación celular en el cáncer de vejiga y su papel en el pronóstico. Sin embargo, estos resultados son controvertidos y el potencial valor pronóstico de estos marcadores continúa sin estar claro.

Consideramos que para comparar las alteraciones genéticas con el desarrollo tumoral y progresión, sería interesante esclarecer la correlación entre el número de cromosomas y número de copias de los genes estudiados con la expresión de proteína. Por ello, se analizaron mediante FISH las alteraciones en 9p21, *CCND1*, *EGFR* y *CMYC* en relación al número de copias centroméricas de sus respectivos cromosomas (9, 11, 7, 8). También se estudió la expresión de las proteínas Ciclina D1, p16, p21 y p53 en un array de tejidos compuesto de 152 tumores de vejiga Ta y T1.

Las muestras estudiadas procedían del archivo de tumores del Departamento de Urología del Hospital del Mar de Barcelona. Los tumores fueron recogidos durante el periodo comprendido de 1995 a 2004. El estadio y grado se establecieron de acuerdo con el sistema TNM y clasificación WHO respectivamente (1973; 1978). Dos casos eran tumores TaG1, 56 TaG2, 23 TaG3, 29 T1G2 y 42 T1G3.

De un total de 152 pacientes, 128 eran hombres y 24 mujeres. La edad oscilaba entre 41 y 91 años (media, 69,06). El tiempo de seguimiento promedio fue de 68,04 meses (rango, 62-74.9). Se produjo recurrencia de la enfermedad en 66 de los 152 pacientes estudiados (43,4%), y progresión en 14 de los 152 pacientes; 26 (9,21%) murieron a causa del tumor.

La recurrencia de la enfermedad se definió como la aparición de cualquier tipo de evidencia del tumor en un periodo superior a 3 meses. La progresión se definió como el desarrollo de un tumor invasivo (>T2) a partir de un tumor diagnosticado como Ta o T1. Las características clínicas e histopatológicas se resumen en la tabla 4.4.1.

Tabla 4.4.1 Características clínicas e histopatológicas de los pacientes y tumores

Características	n (%)
Sexo	
Hombres	127 (83.6)
Mujeres	25 (16.4)
Hábito tabáquico	
Fumadores	27 (17.8)
No fumadores	121 (79.6)
Desconocido	4 (2.6)
Estadio-Grado	
TaG1	2 (1.3)
TaG2	56 (36.8)
TaG3	23 (15.1)
T1G2	29 (19.1)
T1G3	42 (27.6)
Tamaño del tumor (cm)	
<3	94 (61.8)
>3	57 (37.5)
Desconocido	1 (0.7%)
Multifocalidad	
Único	75 (49.3)
Múltiple	65 (42.8)
Desconocido	12 (7.9)
Recidiva	
Sí	81 (53.3)
No	64 (42.1)
Perdidos	7 (4.6)
Progresión a infiltrantes	
Sí	25 (16.4)
No	120 (78.9)
Perdidos	7 (4.6)
Estado actual	
Muertos por tumor	17 (11.2)
Vivos	107 (70.4)
Muertos por otras causas	28 (18.4)

El estudio se llevó a cabo en un *microarray* de tejidos (TMA) conteniendo 210 cilindros de 0,6 mm de diámetro, tal y como se ha descrito en el apartado 3.2.6. La técnica de FISH se aplicó tal y como se describe en el apartado 3.2.7. Debido a razones técnicas el número de muestras del TMA analizadas mediante FISH varió entre un ensayo a otro. Se obtuvieron resultados satisfactorios en más de un 77% de

las muestras estudiadas para todos los genes analizados. Las mismas muestras analizadas mediante FISH se estudiaron mediante inmunohistoquímica.

Alteraciones en el número de copias de los genes y centrómeros de los cromosomas analizados mediante FISH

Se utilizaron dos criterios distintos para el análisis del número de copias de los genes objeto del estudio. En un primer análisis se contabilizó el número absoluto de copias del gen (independientemente de número de copias centroméricas), considerándose ganancia un número de copias mayor a 2 y pérdida un número de señales inferior a 2. Se realizó un segundo análisis teniendo en cuenta el desequilibrio de número de copias de cada gen respecto al número de copias del centrómero del cromosoma en el que se localiza. Se utilizaron los siguientes criterios para la evaluación de las muestras.: (a) ganancia absoluta (cualquier incremento en el número de copias del gen o del cromosoma); (b) alta ganancia (más de cinco copias de gen o centrómero, incluyendo alta polisomía); (c) ganancia relativa (mayor número de señales de gen que de centrómero); (d) amplificación relativa (ratio de señales de gen respecto centrómero >3); (e) pérdida absoluta (menos de 2 copias del gen o centrómero, incluyendo la monosomía del cromosoma); (f) delección en homocigosis (ninguna copia del gen o cromosoma); (g) pérdida relativa (menor número de copias del gen que del centrómero). Tanto las ganancias absolutas como las relativas se consideraron únicamente cuando al menos un 10% de las células presentaban la alteración. La pérdida absoluta y relativa únicamente se consideraron cuando al menos un 50% de las células presentaban la alteración.

Locus 9p21 y cromosoma 9

Se obtuvieron resultados en 117 de las 152 muestras del TMA. La pérdida de 9p21 se observó en 37 muestras (31.6%), de las cuales 18 mostraron delección en homocigosis. 22 casos mostraron monosomía del cromosoma 9. La pérdida relativa de 9p21 respecto al centrómero se observó en 27 muestras. La ganancia de 9p21 debido a polisomía del cromosoma 9 se observó en 28 casos, nueve de los cuales mostraron una alta polisomía con ≥ 5 copias del cromosoma y locus 9p21.

CCND1 y cromosoma 11

El estudio del gen de la ciclina D1 y del cromosoma 11 se pudo realizar en 128 muestras del TMA. En 60 casos (46,8%) se observó ganancia de *CCND1*, de los cuales 29 presentaban alta ganancia (5 o más copias). La ganancia del cromosoma 11 se observó en 55 casos (43%), 17 de los cuales correspondían a alta polisomía. La ganancia relativa de *CCND1* respecto al centrómero del cromosoma 11 se observó en 18 casos (14%), 12 de los cuales eran amplificaciones.

EGFR y cromosoma 7

En lo que se refiere al número de copias de *EGFR* y del centrómero del cromosoma 7, se obtuvieron resultados satisfactorios para 121 de los casos del TMA. La ganancia de *EGFR* estaba presente en 59 muestras (49,5%), 27 de ellas presentaron alta ganancia. Solo se observó amplificación en una muestra. En la mayoría de casos el número de señales de *EGFR* y centrómero 7 era el mismo.

CMYC y cromosoma 8

Un total de 121 casos del TMA resultaron ser óptimos para el estudio de *CMYC* y centrómero 8. La ganancia de *CMYC* se observó en 71 casos (58,7%), siendo alta ganancia en 41 de los mismos. La ganancia del centrómero 8 se observó en 65 casos y alta polisomía en 28. La ganancia relativa de *CMYC* respecto al centrómero del cromosoma 8 se observó en 28 muestras (23%), y la amplificación sólo en 6 de las mismas.

En resumen, el aumento de dosis génica de *CMYC* (57,3%), seguido de la ganancia del centrómero 8 (52,4%), ganancia de *EGFR* y centrómero 7 (49,6%) y ganancia de *CCND1* (46,9%) fueron las alteraciones más frecuentes. La monosomía del cromosoma 9 se observó en 16 casos (13,7%). El 31% de los casos presentaron la pérdida de 9p21. Un 9,48% de los tumores presentaron la pérdida de 9p21 como única alteración. El resto de marcadores analizados aparecían generalmente alterados en combinación.

Relación con las características histopatológicas del tumor

Los resultados de FISH y su correlación respecto al estadio y grado tumoral se muestran en la tabla 4.4.2. En general, se observó que el grado tumoral se asociaba a un incremento en el número de copias de los marcadores analizados. El estadio mostró una asociación estadísticamente significativa respecto a la ganancia relativa de *CCND1*, ganancia de *EGFR*, centrómeros 7 y 8, así como con la alta ganancia de 9p21. La pérdida de 9p21 y/o centrómero del 9 se observó con una frecuencia similar en todos los estadios y grados. Sin embargo, la ganancia de 9p21 fue significativamente más frecuente en tumores TaG3 y T1G3. Estos tumores se caracterizaban además por la ganancia de *CCND1*, *CMYC*, polisomía del cromosoma 11 y altas polisomías de los cromosomas 7 y 8.

En este estudio, la ganancia relativa de *CCND1* se observó en un 14% de todos los tumores y se encontró significativamente asociada a tumores T1G3.

Respecto al sexo de los pacientes, no se encontró ningún tipo de asociación con ninguno de los parámetros estudiados. Sin embargo, la edad avanzada de los pacientes mostró estar asociada a la ganancia, polisomía de todos los marcadores estudiados, así como a la ganancia relativa de *CCND1* y pérdida relativa de 9p21.

Tabla 4.4.2. Resultados de FISH y características histopatológicas de los tumores

	Estadio			Grado			Estadio/Grado						Valor P
	pT1		pT1	1-2		3	TaG1-2		TaG3	T1G2	T1G3	Valor P	
	n	(%)	n	n	(%)	n	n	(%)	n	(%)	n		
9p21													
Ganancia	12 (19.7%)	16 (29.1%)	n.s.	11 (15.9%)	17 (36.2%)	0.016	5 (11.0%)	7 (41.2%)	6 (24%)	10 (33.3%)	n.s.		
Alta ganancia	1 (1.63%)	8 (14.54%)	0.073	3 (4.3%)	6 (12.8%)	n.s.	0 (0%)	1 (5.9%)	3 (12%)	5 (16.7%)	0.047		
Pérdida rel.	11 (17.7%)	16 (21.9%)	n.s.	15 (21.4%)	12 (25.5%)	n.s.	9 (20.5%)	2 (11.8%)	6 (24%)	10 (33%)	n.s.		
Monosomía	16 (26.2%)	21 (38.2%)	n.s.	22 (31.4%)	15 (31.9)	n.s.	12 (27.3%)	3 (17.6%)	9 (36%)	12 (40%)	n.s.		
Delección H.	8 (13.1%)	10 (18.2%)	n.s.	10 (14.3%)	8 (17.0%)	n.s.	6 (13.6%)	2 (11.8%)	4 (16%)	6 (20%)	n.s.		
CEP9													
Ganancia	17 (27.4%)	23 (41.8%)	n.s.	18 (25.7%)	23 (48.9%)	0.011	9 (20.5%)	8 (47.1%)	9 (36%)	15 (50%)	0.044		
Alta ganancia	5 (8.1%)	11 (20%)	n.s.	8 (11.4%)	9 (19.1%)	n.s.	3 (6.8%)	2 (11.8%)	5 (20%)	7 (23.3%)	n.s.		
CCND1													
Ganancia	27 (39.7%)	33 (55%)	n.s.	21 (29.6%)	39 (68.4%)	0.000	14 (30.4%)	13 (65.0)	7 (30.4%)	26 (70.3%)	0.000		
Alta ganancia	13 (19.1%)	16 (26.7%)	n.s.	8 (11.3%)	21 (36.8%)	0.001	6 (13.0%)	7 (35.0)	2 (8.7%)	14 (37.8%)	0.011		
Ganancia rel.	5 (7.35%)	13 (21.66%)	0.02	5 (7.0%)	13 (22.8%)	0.019	3 (6.4%)	2 (10.5)	2 (8.7%)	11 (29.7%)	0.043		
CEP11													
Ganancia	25 (36.8%)	30 (50%)	n.s.	20 (28.2%)	35 (61.4%)	0.000	13 (28.3%)	12 (60.0%)	7 (30.4%)	23 (62.2%)	0.002		
Alta ganancia	7 (10.3%)	10 (16.7%)	n.s.	4 (5.6%)	13 (22.8%)	0.007	3 (6.5%)	4 (20.0%)	1 (4.3%)	9 (24.3%)	0.042		
EGFR													
Ganancia	24 (36.36%)	35 (64.48%)	0.002	25 (39.1%)	34 (61.8%)	0.017	13 (30.2%)	11 (52.4%)	12 (60%)	23 (67.6%)	0.007		
Alta ganancia	13 (20%)	14 (25.9%)	n.s.	7 (10.9%)	20 (36.4%)	0.001	4 (9.3%)	9 (42.9%)	3 (15%)	11 (32.4%)	0.008		
CEP7													
Ganancia	24 (36.36%)	35 (64.48%)	0.002	25 (39.1%)	34 (61.8%)	0.017	13 (30.2%)	11 (52.4%)	12 (60%)	23 (67.6%)	0.007		
Alta ganancia	13 (20%)	14 (25.9%)	n.s.	7 (10.9%)	20 (36.4%)	0.001	4 (9.3%)	9 (42.9%)	3 (15%)	11 (32.4%)	0.008		
CMYC													
Ganancia	32 (49.2%)	39 (66.1%)	n.s.	31 (44.9%)	40 (72.7%)	0.002	17 (38.6%)	15 (75.0%)	14 (58.3%)	25 (71.4%)	0.008		
Alta ganancia	22 (33.8)	19 (32.2%)	n.s.	13 (18.8%)	28 (50.9%)	0.000	10 (22.7%)	12 (60.0%)	3 (12.5)	16 (45.7%)	0.001		
Ganancia rel.	15 (23.1%)	13 (22%)	n.s.	11 (15.9%)	17 (30.9%)	n.s.	7 (15.9%)	8 (40.0%)	4 (16.7%)	9 (25.7%)	n.s.		
CEP8													
Ganancia	28 (43.75%)	37 (64.91%)	0.02	30 (43.5%)	35 (63.6%)	0.031	17 (38.6%)	11 (55.0%)	13 (54.2%)	24 (68.6%)	n.s.		
Alta ganancia	14 (21.5%)	14 (23.7%)	n.s.	9 (13.0%)	19 (34.5%)	0.005	8 (18.2%)	6 (30.0%)	1 (4.2%)	13 (37.1%)	0.019		

CEP = Centrómero, Delección H. = Delección en homocigosis, Pérdida rel. = Pérdida relativa, Ganancia rel. = Ganancia relativa, n.s. = No significativo.

Relación entre la dosis génica y la expresión de proteínas

Para determinar el efecto de la dosis génica de *CCND1* y del locus 9p21 en la expresión de sus proteínas, se realizó un análisis inmunohistoquímico. Debido a que *CDKN2A* es el principal gen diana de las deleciones de 9p21 en el cáncer de vejiga, se estudió la expresión de p16 (producto del gen *CDKN2A*). Se analizaron, también las proteínas p21 y p53 implicadas en el control del ciclo celular.

El análisis inmunohistoquímico se llevó a cabo en el Departamento de Urología del Hospital del Mar de Barcelona, utilizando los anticuerpos para p53 (D07, Novocastra, United Kingdom, dilución 1:50) p21 (anti p21waf SX118, DakoCytomation, Denmark, dilución 1:25) p16 (p16INK4a EGH4, DakoCytomation, Denmark, prediluido) y ciclina D1 (DCS-6, DakoCytomation, Denmark, dilución 1:25).

La expresión de las proteínas en relación a la dosis de los genes estudiados se indica en la tabla 4.4.3.

La expresión de p16 correlacionó con la ganancia de 9p21 y polisomía 9 ($P < 0.001$). La deleción de 9p21 también se asoció a la falta de expresión de p16. Tanto las pérdidas relativas como absolutas de 9p21 se asociaron a un incremento en la expresión de la proteína p21 (tabla 4.4.3).

La proteína p53 se asoció a un incremento en el número de copias de los genes y cromosomas estudiados, pero no al incremento o pérdida relativa de los genes. Los marcadores estudiados mediante inmunohistoquímica no mostraron correlación con ninguno de los parámetros clinicopatológicos.

Tabla 4.4.3: Relación entre los resultados de FISH y la expresión de proteínas

			Expresión de Ciclina D1		Expresión de P16		Expresión de P21		
			Casos positivos(%)	Valor P	Casos positivos(%)	Valor P	Casos positivos(%)	Valor P	
9p21	Ganancia	-	59.5	<i>n.s.</i>	12.3	<i>0.001</i>	35.3	<i>n.s.</i>	
		+	48		44		35.7		
	Alta ganancia	-	56.3	<i>n.s.</i>	18.2	<i>n.s.</i>	34.6	<i>n.s.</i>	
		+	62.5		42.9		44.4		
	Pérdida	-	49.3	<i>0.037</i>	25.4	<i>0.041</i>	28.2	<i>0.034</i>	
		+	72.2		8.3		50		
	Deleción en homocigosis	-	49.4	<i>0.000</i>	23.3	<i>0.022</i>	28.1	<i>0.001</i>	
		+	94.4		0		72.2		
	Pérdida relativa	-	50	<i>0.014</i>	21	<i>n.s.</i>	27.6	<i>0.003</i>	
		+	77.8		15.4		59.3		
Total casos			104		107		114		
CCND1	Ganancia	-	54,1	<i>n.s.</i>	9,5	<i>0.003</i>	29,2	<i>n.s.</i>	
		+	57,4		32,7		39,3		
	Alta ganancia	-	52,7	<i>n.s.</i>	20,2	<i>n.s.</i>	33,3	<i>n.s.</i>	
		+	64		17,4		37		
	Ganancia relativa	-	49	<i>0.001</i>	21,4	<i>n.s.</i>	32,7	<i>n.s.</i>	
		+	93,8		7,1		43,8		
	Total casos			118		112		120	
	EGFR	Ganancia	-	56,6	<i>n.s.</i>	10,5	<i>0.043</i>	31,8	<i>n.s.</i>
			+	55,4		26,5		37,5	
		Alta ganancia	-	59	<i>n.s.</i>	17,1	<i>n.s.</i>	36,8	<i>n.s.</i>
+			46,2	20,8		26,9			
Total casos			109		106		113		
CMYC		Ganancia	-	53,2	<i>n.s.</i>	12	<i>n.s.</i>	32,7	<i>n.s.</i>
			+	53,7		25,4		23	
		Alta ganancia	-	54,7	<i>n.s.</i>	17,6	<i>n.s.</i>	32,5	<i>n.s.</i>
			+	51,3		23,1		34,1	
		Ganancia relativa	-	54	<i>n.s.</i>	18,4	<i>n.s.</i>	31,9	<i>n.s.</i>
	+		51,9	23,1		37			
	Total casos			114		113		121	

Papel pronóstico: recurrencia, progresión y supervivencia

A continuación se evaluaron las implicaciones pronósticas de la dosis génica, polisomías cromosómicas y otras variables clínicas e histopatológicas: estadio y grado, tamaño del tumor, multifocalidad, hábito fumador, edad y sexo de los pacientes.

En cuanto a la recurrencia, el análisis global de todos los tumores mostró que la alta ganancia de *EGFR* junto con la polisomía del cromosoma 7 fueron las únicas variables

que mostraron asociación estadísticamente significativa tanto en el análisis univariante ($P=0,002$), como en el multivariante ($RR=2,29$, $95\%CI=1,33-3,95$, $P=0,003$). El análisis de tumores Ta y T1 por separado reveló, que la alta ganancia de *EGFR* junto con la polisomía del cromosoma 7 permanecían como marcadores de recurrencia en tumores Ta (univariante: $P=0,004$, multivariante: $RR=2,9$, $95\%CI=1,34-6,30$, $P=0,007$), sin embargo en tumores T1 esta asociación no era significativa. Al desglosar las muestras por estadio-grado, los tumores TaG2 mantuvieron la asociación entre la alta ganancia de *EGFR* / polisomía 7 y la recurrencia tumoral en el análisis univariante ($P=0,007$), en el análisis multivariante esta asociación se mantuvo ($RR=5,06$, $95\%CI=1,35-19,01$, $P=0,016$). En los tumores T1G2, la multifocalidad tumoral mostró asociación con la recurrencia en el análisis univariante ($P=0,0031$) y multivariante ($RR=3,31$, $95\%CI=1,04-10,49$, $P=0,042$). En lo que a los tumores T1G3 se refiere, ningún marcador mostró asociación respecto a la recurrencia. Estos resultados se muestran en la figura 4.4.1 y tabla 4.4.4.

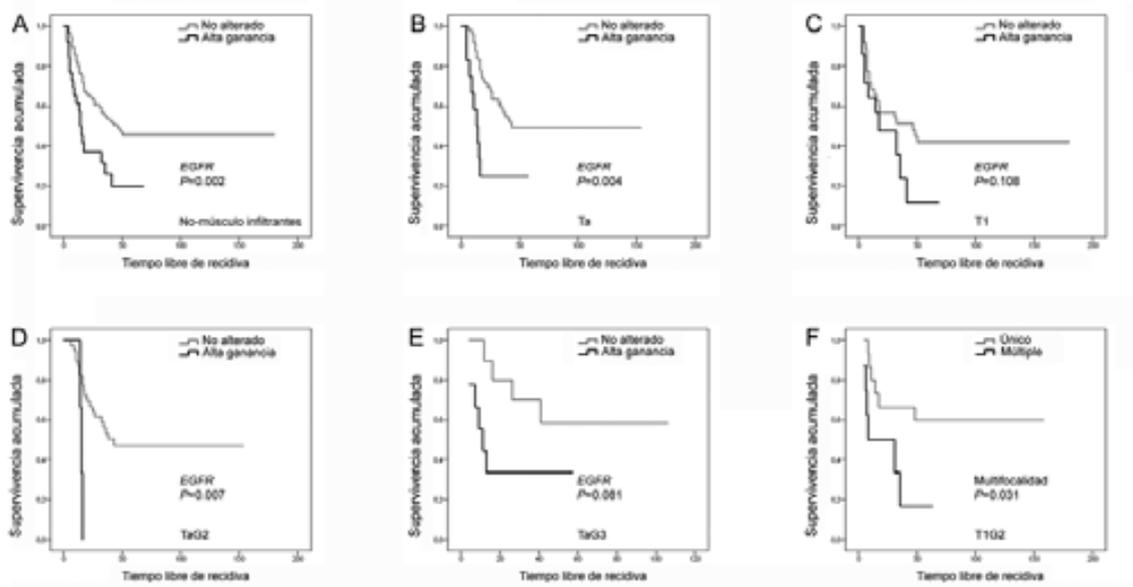


Figura 4.4.1. Curvas Kaplan-Meier para la recurrencia. A) tumores no músculo infiltrantes. B) Tumores Ta. C) Tumores T1. D) Tumores TaG2. E) Tumores TaG3. F) Tumores T1G2.

Respecto a la progresión, el análisis de la totalidad de tumores no músculo infiltrantes mostró que, la alta ganancia de *CCND1* ($P=0,0019$), *9p21* ($P=0,03$) y *CMYC* ($P=0,037$) y ganancia de *CCND1* ($P=0,003$), así como los variables histológicas de grado y estadio-grado se asociaban con la progresión tumoral en el análisis univariante. En el análisis multivariante, únicamente el grado demostró ser significativo ($RR=14,8$, $95\%CI=3,28-66,83$, $P=0,000$). Al desglosar las muestras del estudio en tumores Ta y T1, ninguna de las variables mostró asociación con la progresión a tumor músculo infiltrante en el grupo de tumores Ta. Sin embargo, los tumores T1 seguían manteniendo la asociación de las variables de grado ($P=0,006$), altas ganancias de *CCND1* ($P=0,035$), *9p21* ($P=0,019$) y *CMYC* ($P=0,011$) y ganancia de *CCND1* ($P=0,016$) respecto a la progresión. El análisis multivariante mostró que la alta ganancia de *9p21* ($RR=7,17$, $95\%CI=1,73-34,66$, $P=0,014$) y *CMYC* ($RR=7,48$, $95\%CI=1,85-30,29$, $P=0,005$) eran marcadores pronóstico de progresión en tumores T1. Al desglosar las muestras por estadio y grado conjuntamente, la alta ganancia de *9p21* se confirmó como marcador pronóstico de progresión en tumores T1G3 tanto en el análisis univariante ($P=0,006$), como multivariante ($RR=8,21$, $95\%CI=1,36-49,31$, $P=0,021$). Estos resultados se indican en la figura 4.4.2 y tabla 4.4.4.

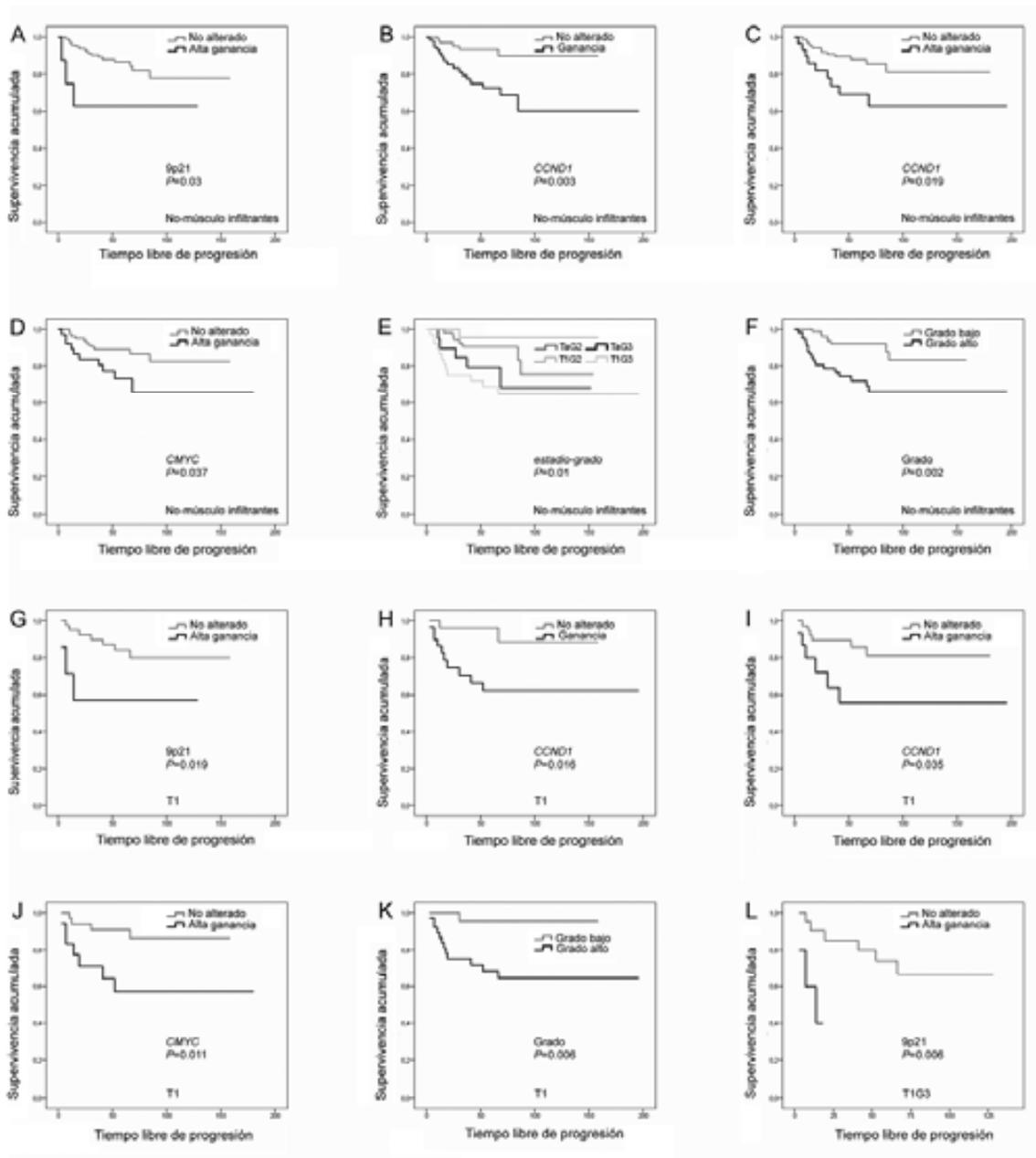


Figura 4.4.2. Curvas Kaplan-Meier para la progresión. A-F) tumores no músculo infiltrantes. G-K) Tumores T1. L) Tumores T1G3.

En cuanto a la mortalidad tumor específica, el grado tumoral (univariante: $P=0,004$, multivariante: $RR=4,32$, $95\%CI=1,18-15,80$, $P=0,027$) y la amplificación relativa del gen *CCND1* (univariante: $P=0,008$, multivariante: $RR=3,63$, $95\%CI=1,11-11,95$, $P=0,034$) se asociaron a una menor supervivencia de los pacientes con cáncer de vejiga no músculo infiltrantes en el análisis univariante y multivariante. Al desglosar las

muestras de acuerdo a su estadio (Ta o T1), ninguno de los parámetros estudiados se asoció de forma estadísticamente significativa a una menor supervivencia. Lo mismo ocurrió al realizar el análisis de las muestras por separado, de acuerdo a su estadio-grado (Figura 4.4.3, Tabla 4.4.4).

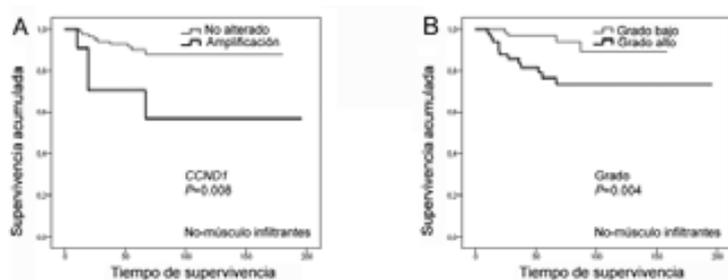


Figura 4.4.3. Curvas Kaplan-Meier para la supervivencia. A-B) tumores no músculo infiltrantes.

Tabla 4.4.4: Análisis multivariante de marcadores de recurrencia, progresión y supervivencia

	RR	95%CI de RR	Valor P
Tiempo libre de recurrencia			
Tumores Ta y T1			
Alta ganancia de <i>EGFR</i>	2,29	(1,33-3,95)	0,003
Tumores Ta			
Alta ganancia de <i>EGFR</i>	2,9	(1,34-6,30)	0,007
Tumores TaG2			
Alta ganancia de <i>EGFR</i>	5,06	(1,35-19,01)	0,016
Tumores T1G2			
Multifocalidad	3,31	(1,04-10,49)	0,042
Tiempo libre de progresión			
Tumores Ta y T1			
Grado	14,8	(3,28-66,83)	0,000
Tumores T1			
Alta ganancia de 9p21	7,17	(1,73-34,66)	0,014
Alta ganancia de <i>CMYC</i>	7,48	(1,85-30,29)	0,005
Tumores T1G3			
Alta ganancia de 9p21	8,21	(1,36-49,31)	0,021
Supervivencia			
Tumores Ta y T1			
Amplificación relativa de <i>CCND1</i>	3,63	(1,11-11,95)	0,034
Grado	4,32	(1,18-15,80)	0,027

R.R.: Riesgo relativo. C.I.: Intervalo de confianza

En resumen, la ganancia de *EGFR* asociada a polisomía del cromosoma 7 es marcador independiente de recurrencia en tumores Ta, mientras que la multifocalidad se muestra como marcador de recurrencia en los tumores T1G2. La alta ganancia de *CMYC* y de 9p21 (asociada a alta polisomía del cromosoma 9) es marcador independiente de progresión en tumores T1, siendo la alta ganancia de 9p21 marcador de progresión de tumores T1G3. El grado tumoral y la amplificación de *CCND1* son los únicos marcadores independientes de supervivencia en la globalidad de los tumores estudiados (Ta y T1), sin embargo ninguno de los marcadores analizados presentó validez como pronóstico independiente de supervivencia al desglosar los tumores por estadio Ta y T1.

4.5. INCIDENCIA DE CÁNCER DE PULMÓN EN PACIENTES CON CÁNCER DE VEJIGA NO MÚSCULO INFILTRANTE

El comportamiento clínico de los tumores de vejiga de bajo riesgo comporta un control de los pacientes durante periodos de tiempo prolongados, que en algunos casos, conduce a la aparición de un segundo tumor primario. Durante el estudio detallado de las historias clínicas de los pacientes del apartado anterior (4.4) nos llamó poderosamente la atención el hecho de que apareciera con relativa frecuencia un segundo tumor primario afectando a pulmón. En España existen muy pocos estudios sobre la cuantificación del riesgo a desarrollar un segundo tumor primario después de desarrollar un cáncer de vejiga no músculo invasivo. Por ello nos propusimos estimar este riesgo, especialmente para cáncer de pulmón utilizando la base de datos de pacientes con cáncer de vejiga del Hospital del Mar en Barcelona entre los años 1995 a 2003. En el estudio se incluyeron, únicamente, aquellos pacientes afectados de cáncer de vejiga que habían desarrollado un tumor no músculo infiltrante. Todos los tumores eran uroteliales y el tiempo mínimo de seguimiento era mayor o igual a 5 años.

En el estudio se incluyeron 231 pacientes, 39 de los cuales habían desarrollado una segunda neoplasia. 10 de los pacientes presentaron cáncer de pulmón, uno pancreático, uno gástrico, uno faríngeo, uno hepático, uno de paratiroides, uno esofágico, cinco de piel (carcinoma de células basales), tres de laringe, dos colon, tres de recto y 10 de próstata.

De los diez casos que presentaron cáncer de vejiga y cáncer de pulmón, nueve eran varones y un único caso era mujer. El promedio de edad era de 69,58 años en los pacientes con cáncer de vejiga únicamente y de 67,1 en pacientes con ambas neoplasias. En todos los casos el cáncer de vejiga fue el primer tumor primario en manifestarse. El intervalo medio entre ambas neoplasias fue de 54,2 meses (rango 8 - 168). Las características clínicas e histopatológicas analizadas se indican en la tabla 4.5.1.

En cuanto a la frecuencia de casos de cáncer de pulmón esperados y observados, el riesgo de padecer cáncer pulmón fue 10.27 veces superior en los pacientes con cáncer de vejiga, respecto a la población general de Cataluña (una población de misma edad y la misma proporción de hombres y mujeres). (95% CI=4.92-18.88)

En el momento del diagnóstico nueve de 10 tumores de pulmón eran de estadio avanzado, solo uno era inicial de 2 cm de diámetro. Cinco tumores eran carcinomas de células microcíticas y cinco eran carcinomas de células no microcíticas.

Tras cinco años del diagnóstico todos los pacientes con cáncer de pulmón de estadio avanzado habían muerto. Únicamente un paciente con cáncer de pulmón de estadio temprano, sobrevivió tras la quimioterapia, mostrando una remisión parcial del tumor.

La supervivencia de los pacientes con ambos tumores primarios fue significativamente menor a la de los pacientes que presentaban únicamente un tumor de vejiga no músculo infiltrante (Figura 4.5.1).

Tabla 4.5.1. Características clínicas e histopatológicas de los pacientes con cáncer de vejiga

	Pacientes sin cáncer de pulmón primario	Pacientes con cáncer de pulmón primario	Total
Número de pacientes	221	10	231
Sexo			
Hombres	204	9	213
Mujeres	17	1	18
Promedio (rango)			
Edad al diagnóstico de cáncer de vejiga, años	69.58 (41-91)	67.1 (55-76)	69.16 (41-91)
Edad al diagnóstico de cáncer de pulmón, años	-	71.1 (65-78)	-
Intervalo entre los tumores, meses	-	54.2 (8-168)	-
N:			
Fumadores y exfumadores	130	10	140
No fumadores	66	0	66
Desconocido	25	0	25
Estadio del cáncer de vejiga			
Ta	119	7	126
T1	102	3	105
Grado del cáncer de vejiga			
G1	5	1	6
G2	127	6	133
G3	89	3	92
Histología del cáncer de pulmón			
Carcinoma de células microcíticas	-	5	5
Carcinoma de células no microcíticas	-	5	5

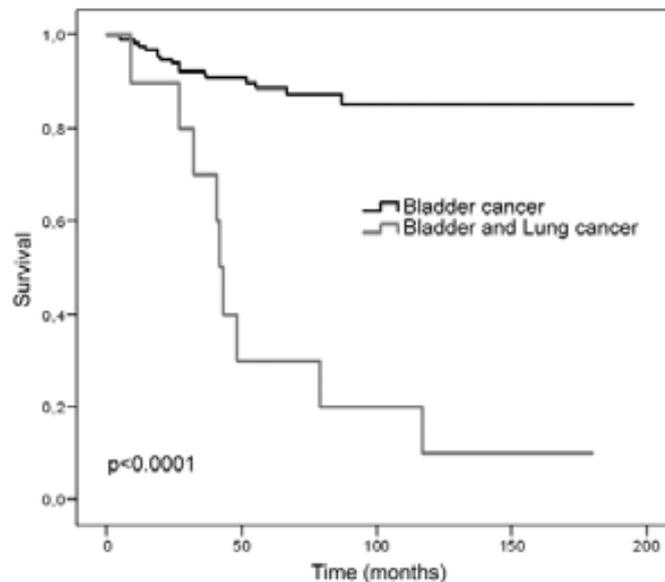


Figura 4.5.1: Curvas Kaplan-Meier mostrando supervivencia en pacientes con cáncer de vejiga y cáncer de pulmón

En resumen, el riesgo de padecer cáncer pulmón como segunda neoplasia incrementa en los pacientes con cáncer de vejiga no músculo infiltrante, siendo 10.27 veces superior en los pacientes con cáncer de vejiga de nuestro estudio, respecto a la población general de Cataluña.

La supervivencia de los pacientes con ambos tumores primarios fue significativamente menor a la de los pacientes que presentaban únicamente cáncer de vejiga.

5. Discusión

5.1. PERFIL DE DESEQUILIBRIOS GENÓMICOS EN EL CÁNCER DE VEJIGA.

El cáncer de vejiga constituye un grupo heterogéneo de tumores que difieren en sus tipos y en el rango de alteraciones genéticas (Knowles 1998; Orntoft and Wolf 1998) Tal y como se ha descrito en otros tumores sólidos, una característica de la vía de desarrollo y progresión del tumor es un aumento en la complejidad y número de las alteraciones genéticas. Con el fin de contribuir al conocimiento de las mismas realizamos un estudio prospectivo de 180 pacientes con carcinomas uroteliales de vejiga obtenidos de forma consecutiva.

En los estudios retrospectivos, la población de pacientes se desvía a menudo en seleccionar aquellos en los que se puede obtener una muestra analizable. La disponibilidad de las muestras puede estar relacionada con el tamaño del tumor y el seguimiento clínico del paciente. Hasta el momento no disponemos de información sobre estudios prospectivos que contribuyan a confirmar los desequilibrios cromosómicos asociados al cáncer de vejiga.

Nuestros resultados confirman que el cáncer urotelial de vejiga presenta un perfil característico de desequilibrios genómicos con ganancias en 1q, 8q, 11q, 16p, 17q, 18p, 19, 20q, Xq y pérdidas en 4q, 8p, 9p, 9q, 11p, 11q, 13q, 18q e Y. Las ganancias en 5p, 6p, 10p y las pérdidas en 5q, 6q aumentarían su frecuencia de forma significativa a lo largo de la progresión tumoral.

Los resultados son consistentes con los obtenidos mediante análisis del cariotipo con bandas G (Fadi-Elmula 2005) estudios de LOH (Czerniak, et al. 2000; Knowles 2001), CGH en cromosomas metafásicos (Kallioniemi, et al. 1995; Prat, et al. 2001; Richter, et al. 1997; Richter, et al. 1999; Simon, et al. 2000) y CGH array (Blaveri, et al. 2005a; Heidenblad, et al. 2008; Hurst, et al. 2004; Veltman, et al. 2003). El hecho de que el patrón de ganancias y pérdidas se conserve en los distintos estudios confirma la importancia de estas alteraciones en la carcinogénesis urotelial.

Si bien nuestros resultados coinciden cualitativamente con los de la literatura, observamos diferencias cuantitativas respecto a la frecuencia en que aparecen las alteraciones. Por ejemplo, observamos que la ganancia del cromosoma 19 era la alteración más frecuente siendo incluso superior a la pérdida del cromosoma 9. Una de las razones de esta discrepancia podría ser el hecho de que la ganancia del 19 no se haya considerado en estudios de cCGH debido a que podría ser artefactual. La

correlación observada entre ganancia del 19 y los resultados del apartado 4.2 confirma la importancia que este desequilibrio puede tener en la carcinogénesis urotelial. Estudios mediante CGH array también encuentran alteraciones que superan, en frecuencia, la pérdida del cromosoma 9 (Blaveri, et al. 2005a; Heidenblad, et al. 2008; Hurst, et al. 2004; Veltman, et al. 2003) aunque algunos de estos estudios se refieren a líneas celulares derivadas de tumores avanzados (Hurst, et al. 2004). Nuestros resultados mediante el análisis por FISH de un elevado número de tumores (apartado 4.4 de la presente Memoria) indican que las polisomías 7 y 8 son más frecuentes que la pérdida del cromosoma 9.

Teniendo en cuenta que nuestra serie comprende una fracción mayoritaria de tumores Ta (99 de 180) debemos suponer que el análisis se ve desviado hacia un predominio de las alteraciones más frecuentes en este tipo de tumores. También, respecto a los desequilibrios de los tumores T1Gb hemos de tener en cuenta el bajo número de muestras analizadas (n=10). Con estas consideraciones hemos destacado aquellas regiones que aparecen alteradas en tumores de bajo estadio y grado y permanecen en los de estadio y grado avanzados. Estas regiones cromosómicas conformarán el perfil de desequilibrios de los tumores uroteliales de vejiga.

Nuestro análisis ha permitido identificar las regiones o bandas más afectadas dentro de cada brazo cromosómico por lo que las regiones cromosómicas que configuran el perfil de desequilibrios en nuestra serie de tumores son: +1p34.2p36, +1q21q22, +8q24.2q24.3, +11q13.1q13.3, +16p13, +17q11.2q21.3, +17q24q25, +18p11.2, +19pq, +20q, +X, -4q23, -8p23, -9p21p24, -9q21q33, - 11p13p14,-11q25, -13q21.2, -18q22, -Y. con ganancias de 5p13, 6p22.1p25, 10p12p15 y pérdidas de 5q15q34, 6q22q27 más predominantes en tumores avanzados.

La pérdida del cromosoma 9 se considera como la alteración más característica de los carcinomas uroteliales de vejiga y la mayoría de estudios, empleando diversas técnicas, la proponen como una de las alteraciones primarias (Blaveri, et al. 2005a; Czerniak, et al. 2000; Chow, et al. 2000; Dalbagni, et al. 1993; Fadl-Elmula 2005; Habuchi, et al. 2001; Richter, et al. 1997). Nuestros resultados mediante cCGH, aCGH y FISH en array de tejidos confirman su importancia como alteración inicial en la carcinogénesis urotelial. La pérdida de 9p se encontró en todos los estadios y grados y en algunos tumores como única alteración. La pérdida de 9q aparecía más frecuentemente asociada a tumores superficiales mostrando una diferencia

estadísticamente significativa entre éstos y los tumores músculo infiltrantes. Este resultado coincide con el obtenido por Blaveri (2005) utilizando arrays de genómica.

La pérdida del cromosoma Y se considera una alteración frecuente en cáncer de vejiga (Sandberg and Berger 1994). En nuestro estudio hemos encontrado la pérdida y ganancia de este cromosoma con frecuencias similares, lo que puede ser un reflejo de la alta inestabilidad de estos tumores y ser por tanto una alteración que aparece como consecuencia de procesos de no disyunción o segregación anómala y posterior selección del conjunto de desequilibrios presentes en la célula. Debido a que, en general, la ganancia del cromosoma Y se ha encontrado en tumores con numerosas alteraciones no la hemos considerado como importante a la hora de definir el perfil de desequilibrios de los tumores objeto de estudio. Por lo que respecta a la pérdida de este cromosoma hemos observado que aparece frecuentemente como única o asociada a la pérdida del 9p o 9q en los tumores superficiales. En ninguno de los tumores infiltrantes se observó como única pérdida.

Las otras regiones cromosómicas cuya pérdida es importante en la carcinogénesis urotelial, pero que aparecían con menor frecuencia en los tumores superficiales de nuestra serie, corresponden a 4q26q27, 5q15q23, 11p13p14 y 11q25 entre otras. La implicación de estas regiones coincide con datos obtenidos mediante LOH (Tzai, et al. 2003), CGH en cromosomas metafásicos (Prat, et al. 2001; Simon, et al. 2000) y CGH en arrays de DNA (Heidenblad, et al. 2008).

Los estudios mediante CGH en arrays de DNA permiten detectar pérdidas en homocigosis que son indicativas de la presencia de genes candidatos a supresores tumorales. Estos estudios han detectado deleciones en homocigosis en 11p13 donde se localizan los genes *TRAF6* (*TNF-associated factor 6*) cuyo producto es un regulador de la muerte celular en respuesta al *stress* y *RAG1* (*recombination activating gene 1*) implicado en facilitar las roturas en el DNA durante el proceso de recombinación V(D)J (Veltman, et al. 2003). Deleciones en homocigosis se han detectado en otras regiones, entre ellas la 13q14 implicando el gen del Retinoblastoma (Heidenblad, et al. 2008). En todos estos estudios, la deleción en homocigosis más frecuente afectaba al gen *CDKN2A* en 9p21.

En este momento de la discusión hemos de puntualizar que el tamaño de los desequilibrios detectados mediante la técnica de CGH en cromosomas metafásicos no

permite identificar los genes candidatos incluidos en la región. Para ello se necesitan técnicas de mayor resolución tales como CGH en arrays de DNA o FISH con sondas locus-específicas. Por ello, en este apartado no profundizaremos demasiado en los posibles genes candidatos que puedan localizarse en las regiones cromosómicas que hemos observado ganadas o pérdidas mediante CGH convencional.

De acuerdo con nuestros resultados, los tumores uroteliales presentan, en general, un predominio de ganancias de material cromosómico respecto a pérdidas. Estos resultados discrepan con los obtenidos por otros autores que observan un predominio de pérdidas o una frecuencia similar de pérdidas y ganancias sobre todo en los tumores superficiales. Una de las posibles causas podría ser la falta de detección de pérdidas mediante la técnica de CGH convencional. Esta posibilidad se ve reforzada por el hecho de que encontramos un mayor número pérdidas en los tumores T2-T4 analizados mediante CGH array que las detectadas en estos mismos tumores mediante CGH convencional (apartado 4.2). Por otra parte, algunas de las regiones que se han observado ganadas pueden ser problemáticas. La región 1p36 se ha considerado artefactual por corresponder a regiones teloméricas o subteloméricas. La ganancia de 22q también se considera problemática y la hemos descartado puesto que no se confirma mediante aCGH (ver tumores de la tabla 4.2.2).

La ganancia de 18p se detectó con una frecuencia relativamente alta tanto en tumores no músculo infiltrantes (23% de los casos) como en músculo infiltrantes (28% de los casos). Otras regiones envueltas en ganancias: 1q21q22, 7p22, 7q11.2, 8q24.2q24.3, 11q13.1q13.3, 16p13q12.2, 17q11.2q21.3, 17q24q25, 19p13, 19q13, 20q13 coinciden o se solapan con las descritas en la literatura (Blaveri, et al. 2005a; Heidenblad, et al. 2008; Hurst, et al. 2004; Richter, et al. 1998; Richter, et al. 1997; Veltman, et al. 2003; Zhao, et al. 1999).

Las amplificaciones en 1q21q24, 5p12p15, 6p22p23, 10p13p15, 12q23q24, 16p11p12, 17q25, 18p11, 19 q13, 20q13 presentes en más de tres de los tumores de nuestra serie coincidían con muchas de las regiones ganadas tal y como se puede comprobar observando el párrafo anterior. Este hecho destaca la importancia de estas regiones cromosómicas en la tumorigénesis urotelial. Cabe destacar que las

amplificaciones de 6p22 y 10p13p15 se detectaron únicamente en tumores músculo infiltrantes.

Sorprendentemente no hemos detectado un predominio de amplificaciones del gen de la ciclina D1 (*CCND1*) localizado en 11q13. Tal y como demuestran nuestros estudios sobre el comportamiento de este amplicón en el apartado 4.3 de esta memoria, la técnica de CGH detecta únicamente un 50% de las amplificaciones de este gen. Ello es debido a que esta amplificación está presente en una población de células del tumor que no es mayoritaria y que por lo tanto no puede detectarse, o se detecta como simple ganancia, por la técnica de CGH. Debido a la elevada heterogeneidad que presentan los tumores de vejiga, es probable que este fenómeno afecte a otras amplificaciones tal y como se demuestra en el apartado 4.2 de esta memoria para los genes *CKS1*, *SKP2* y *E2F3*.

Un reto de la información que se da referente a cambios de todo el genoma consiste en diferenciar aquellas alteraciones relevantes de las que no lo son y que pueden seleccionarse al mismo tiempo que los acontecimientos biológicamente importantes. De forma inicial, la frecuencia de alteraciones en un tumor puede servir de guía, pero los eventos menos frecuentes pueden caracterizar subgrupos de tumores y por ello necesitarían ser caracterizados.

VÍAS DE PROGRESIÓN Y DIFERENCIAS EN RELACIÓN A ESTADIO Y GRADO

Los datos del presente estudio no nos han permitido identificar alteraciones específicas de estadio o grado. Sin embargo hemos observado como una serie de alteraciones se iban acumulando a lo largo de la evolución tumoral. Confirmando estudios de otros autores, el número de desequilibrios, en especial ganancias, aumentaba en relación al grado (Blaveri, et al. 2005a).

La mayoría de los estudios sobre carcinogénesis urotelial coincide en que los tumores superficiales Ta de bajo grado presentan un número bajo de desequilibrios (Knowles 2008; Wu 2005). En nuestro estudio hemos observado que alrededor de un 52% de los tumores TaGb cumplen este requisito. Estos datos sugieren que serían más estables que los T1Ga y T2-T4 tal y como se confirma en el apartado 4.3 del

presente estudio según el cual la mayoría de tumores CIN negativos corresponden a Ta.

Sin embargo, observamos que un 29% de los tumores TaGb presentaba un elevado número de desequilibrios, algunos de los cuales tales como -5q, -6q predominantes en tumores más avanzados. Con el fin de comprobar si estos tumores presentaban alguna particularidad, se volvieron a examinar en el departamento de Anatomía Patológica de la Fundación Puigvert observándose que no presentaban diferencias respecto a otros TaGb con cariotipo estable.

De acuerdo con nuestros resultados, podemos concluir que los tumores TaGb son un grupo heterogéneo que incluye, al menos, dos subgrupos claramente distintos: un subgrupo mayoritario cromosómicamente estable, y el otro con un elevado número de desequilibrios, algunos de los cuales son más característicos de tumores T1 o T2-T4. Un tercer subgrupo menos definido y minoritario presentaría un perfil con un ligero predominio de pérdidas.

Los tumores T1 se han considerado como la antesala de la invasión muscular por lo que la mayoría de autores no los considera dentro del mismo grupo que los tumores superficiales Ta. Nuestros resultados indican que una parte de los tumores T1 muestran alteraciones cromosómicas características de infiltrantes. Sin embargo, comparten muchas de sus alteraciones con los tumores Ta por lo que seguirían una vía de evolución por acumulación de alteraciones. En nuestro estudio, observamos que la ganancia de 3p, 5p, 8p12 y 20p así como las pérdidas de 2q, 4q, 5q, 11p, 11q, 13q y 18q presentaban diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los tumores Ta, T1 de alto grado con los de bajo grado. Podemos sugerir que el grado marcaría diferencias importantes entre los tumores superficiales. Debemos tener en cuenta, sin embargo, el bajo número de tumores T1Gb analizados en el presente trabajo.

La mayoría de autores coincide en que, a pesar de que los tumores Ta y T1 se consideran superficiales, representan un grupo heterogéneo de tumores que pueden diferir en su patogénesis molecular y vías de progresión (Eble J.N. 2004).

Muchos investigadores se han centrado en identificar alteraciones específicas que permitan discriminar entre Ta y T1. Hasta el momento, se ha propuesto que estas diferencias corresponderían a pérdidas de 2q, 8p y 11p y ganancias de 1q y 8q

(Blaveri, et al. 2005a; Richter, et al. 1998). Nuestros resultados indican que +8q, +20p,-2q, -4q, -5q, y -18q son significativamente más frecuentes en T1 que en Ta.

En la revisión de 274 casos de tumores uroteliales estudiados por CGH (Prat, et al. 2001) se observó que las alteraciones que eran significativamente más frecuentes en tumores T1 que en Ta incluían ganancias de 1q, 3p, 6p, 8q, 10p, 17q, y 20 y pérdidas en 2q, 5q, 8p, 10q, 11p, 11q, 13q, 14q y 17p. La mayoría con frecuencias comparables a las observadas en músculo infiltrantes.

Podemos concluir que la complejidad y diversidad de datos de que disponemos acerca de los tumores de vejiga superficiales no permiten identificar alteraciones genéticas específicas de estadio o grado, aunque estamos de acuerdo en que el número y complejidad de los desequilibrios aumenta en la mayoría de los tumores T1 de alto grado.

Los tumores músculo infiltrantes del presente estudio se han caracterizado por una mayor aneuploidía y complejidad de alteraciones, un mayor número de amplificaciones y pérdidas y una mayor extensión del genoma afectado.

Hemos observado una serie de bandas cromosómicas que presentaban diferencias significativas entre los tumores músculo infiltrantes y no músculo infiltrantes de nuestra serie. Las más relevantes corresponden a 5p13.2p13.3, 6p21.1p25, 8q21.3q22.3, 10p11.2p15, 14q32, 16q22q23, 18p11.3 que se ganan preferentemente en tumores T2-T4. Se ha observado un incremento en las pérdidas relacionado con la progresión. Las pérdidas más frecuentes en tumores músculo infiltrantes afectaban a 2q37.3, 4p12p15.1, 4q13.2q25, 5q15q34 y 6q27.

Cabe destacar que la ganancia o amplificación de 5p13 y/o 6p22 se presentaron asociadas a la pérdida de 5q y/o 6q en un 30% de los tumores T2-T4. Esta asociación no se observó en ninguno de los TaGb y T1Gb analizados. Solamente un tumor TaGa presentó la asociación y la misma se observó en un 16% de los tumores T1Ga.

De forma interesante, hemos observado que la ganancia de 15p era significativamente más frecuente en tumores superficiales que en músculo infiltrantes. En estas regiones se localizan los genes de RNA ribosómico y se descartan en estudios de CGH. Existen diferentes argumentos para explicar la ganancia de estas regiones. Podría tratarse de una detección artefactual y que en realidad nos indicara la

región 15q. Estudios realizados por nuestro grupo mediante CGH y MLPA confirmarían esta posibilidad (Prat, et al. 2009). Sin embargo, en un estudio mediante M-FISH y CGH array se observó la alteración +15p en líneas celulares de carcinomas uroteliales (Heidenblad, et al.2008). Un estudio realizado por nuestro grupo mediante cCGH, bandas G y tinción NOR demostró amplificación de las regiones NOR en una línea celular de carcinoma vulvar epidermoide (Pedrazzini, et al. 2003). Además, un estudio de expresión génica muestra que los tumores superficiales se agrupan en un clúster con amplificación de proteínas ribosomales (Blaveri, et al. 2005b) lo que estaría de acuerdo con una amplificación asociada de genes de RNAr. También es interesante destacar que si estas ganancias fueran artefactuales, se observarían al azar e independientemente del grado o estadio tumoral.

Disponemos de un gran volumen de información sobre la genética de los carcinomas de vejiga. Sin embargo todavía no es posible trazar un modelo de patogénesis molecular que incluya todos los grupos.

Diversos autores han propuesto vías de progresión en la carcinogénesis urotelial. La existencia de dos vías divergentes en su inicio parece el modelo más generalizado (revisado por Knowles 2008; Wu 2005). Los tumores T2-T4 se originarían directamente de CIS/displasia y los tumores Ta a partir de hiperplasia papilar (70-80%), de estos, un 70% recurren y un 15% pueden progresar a músculo infiltrante.

Basándose en la revisión de los datos histopatológicos y moleculares, Knowles (2008) propone un modelo según el cual una vía daría origen a los tumores no invasivos de bajo grado y la otra a los tumores infiltrantes T2. En este modelo no queda claro el origen de los Ta de alto grado, que podrían originarse a partir de Ta de bajo grado o a partir de displasia/CIS. Tampoco queda claro como se desarrollan los T1Ga que podrían originarse a partir de TaGa o bien de CIS. Los estudios moleculares proponen, también, dos vías, una implicando mutaciones en *RAS* y *FGFR3* y la otra implicando alteraciones de *RB1* y *TP53* (Cordon-Cardo 2008).

Diversos estudios han descrito la evolución a partir de la acumulación de alteraciones (ver tabla 1.4.1 de la Introducción). Un estudio mediante arrays de CGH de alta resolución indica que los tumores Ta se caracterizarían por un número limitado de desequilibrios siendo la ganancia de 1q y la pérdida de 9q los más frecuentes. Los tumores T1 presentan cambios adicionales y muestran frecuentemente pérdidas de

6q, 8p, 9q, 11p, 17p, 19p y 22q y ganancias de 1q, 5p, 8q, 10p, 13. Los tumores T2-T4 muestran desequilibrios adicionales y cambios más complejos. Según estos autores la principal diferencia se observa entre los tumores de bajo grado y los de alto grado. Las ganancias son más frecuentes en los de alto grado y las amplificaciones son 10 veces más frecuentes en los de alto grado (Heidenblad, et al. 2008). Esto concuerda con el hecho de que los tumores de alto grado muestran frecuentes puentes anafásicos que daran lugar a ciclos de rotura-fusión-puente que originarán amplificaciones (Jin, et al. 2007). Nuestros resultados del apartado 4.3 sobre la correlación de la inestabilidad cromosómica con el grado y el comportamiento del amplicón *CCND1* confirman claramente esta posibilidad y demuestran que la inestabilidad cromosómica es la responsable del elevado número de desequilibrios que se observan a lo largo de la progresión tumoral.

La mayoría de los estudios antes mencionados, consideran como homogéneos los grupos con un mismo estadio y grado. Nuestro estudio sugiere, sin embargo, una mayor heterogeneidad dentro de los tumores uroteliales según la cual dentro de cada grupo histopatológico existirían tres subgrupos: uno mayoritario en tumores TaGb y minoritario en T2T4 que presentaría un cariotipo estable con un bajo número de desequilibrios. Otro subgrupo que incluiría un 30% de los TaGb, un 35% de los TaGa, un 30% de los T1Gb, un 56% de los T1Ga y un 68% de los T2T4, presentaría un elevado número de desequilibrios con predominio de ganancias. Un tercer subgrupo estaría menos definido con un ligero aumento de las pérdidas. Tal y como se describe en el apartado 4.3 del presente estudio, la inestabilidad cromosómica como mecanismo generador de las alteraciones sería predominante en tumores T1G3 dentro de los tumores superficiales.

Esta propuesta coincide con el modelo de Junker que propone que aquellos tumores con mutación de *FGFR3* serían estables en estadios superficiales y se mantendrían estables en músculo infiltrantes (Junker, et al. 2008). La otra vía se caracterizaría por inestabilidad cromosómica con la acumulación de alteraciones. En nuestro estudio no hemos analizado las mutaciones de *FGFR3*, pero nuestros resultados del apartado 4.3 confirman la existencia de CIN en los tumores uroteliales.

Un estudio previo realizado en nuestro laboratorio (Prat, et al. 2009) mostró que los carcinomas uroteliales de vejiga no músculo infiltrantes podían clasificarse de acuerdo con sus perfiles de desequilibrios, de forma que un grupo mayoritario se caracterizaría

por un número bajo de alteraciones, otro grupo se caracterizaría por un predominio de ganancias y un grupo minoritario por un predominio de pérdidas. Los resultados del presente estudio confirman, en parte, esta clasificación y la extienden al grupo de los tumores músculo infiltrantes.

¿EXISTEN MARCADORES MOLECULARES PARA LOS DISTINTOS GRUPOS CLÍNICOS?

Al comparar los distintos grupos clínicos entre sí pudimos constatar una serie de desequilibrios que mostraban diferencias significativas entre aquellos tumores Ta y T1 que se presentaban asociados o no a CIS. Algunos de estos desequilibrios, tales como -6q y -10q, coincidían con algunos de los que son más frecuentes en tumores más avanzados lo que sugiere un patrón distinto de alteraciones en aquellos tumores asociados a CIS.

Cuando se compararon los distintos grupos clínicos también se observaron una serie de marcadores que permitían diferenciar con alta especificidad pero baja sensibilidad los tumores Ta-T1 de bajo grado de los tumores Ta y T1 de alto grado. En el análisis monovariante, las ganancias en 1q y 18q y las pérdidas en 2q, 11q y Xq fueron más frecuentes en tumores TaGa. Las pérdidas en 11q y Xq se mantuvieron en el análisis multivariante con una especificidad de más del 90% pero con una sensibilidad del 43%.

La comparación entre Ta-T1 de bajo grado con T1 de alto grado mostró que las ganancias en 5p, 8p, 12p, 13q, 14q, 20p, y las pérdidas en 5q, 11p, 14q, Xq eran significativamente más frecuentes en los tumores T1Ga que en los Ta-T1Gb en el análisis monovariante. De estas alteraciones, la ganancia de 5p y las pérdidas de 11p y 14q se mantenían en el análisis multivariante con una especificidad del 97.56% pero con una sensibilidad del 28%.

Confirmando la importancia del grado en los tumores no músculo invasivos, observamos pocas diferencias entre los tumores TaGa y los tumores T1Ga. De forma sorprendente, estas correspondían a las ganancias de 9p y 9q más frecuentes en tumores T1Ga. Estudios realizados en líneas celulares indican que el cromosoma 9 se reduplica durante la progresión (Williams, et al. 2002). Además, nuestro análisis del locus 9p21 y del centromero del cromosoma 9 mediante FISH en un TMA de 152

tumores de vejiga muestra que un aumento del número de copias de este cromosoma se asocia a progresión y se encuentra preferentemente en tumores T1G3 (ver apartado 4.4).

Como era de esperar, la ganancia de 6p fue la única alteración significativamente más frecuente en tumores T2-T4 anaplásicos y no anaplásicos que en tumores T1Ga. Finalmente, otra alteración característica de tumores músculo infiltrantes, la ganancia de 10p, diferenciaba el grupo de los anaplásicos de los T1Ga.

La ganancia de Xp y la pérdida de Xq diferenciaban los tumores T2-T4 anaplásicos de los no anaplásicos con una especificidad del 91% y una sensibilidad del 62.5%.

Podemos concluir que, en general, nuestros resultados confirman y amplían la información sobre los desequilibrios genómicos en cáncer de vejiga. Aquellos desequilibrios que aparecen en todos los estadios y grados conforman el perfil de alteraciones característico de los carcinomas uroteliales, mientras que las alteraciones que muestran diferencias significativas entre distintos grupos marcan distintas vías de evolución y están asociados a progresión tumoral. La implicación de los genes afectados por estos desequilibrios debe demostrarse mediante técnicas de mayor resolución tal y como nos hemos planteado en el siguiente apartado de esta tesis.

5.2. PERFIL DE DESEQUILIBRIOS GENÓMICOS EN TUMORES MÚSCULO INFILTRANTES Y PAPEL DE *E2F3*, *SKP2* y *CKS1* EN LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE VEJIGA

Las alteraciones implicando la ganancia de 5p, 6p y 10p así como la pérdida de 5q y 6q son significativamente más frecuentes en tumores músculo infiltrantes sugiriendo un papel importante en la progresión tumoral. Con el fin de profundizar en este aspecto, se estudiaron, mediante aCGH, 24 tumores que habían sido seleccionados por presentar alteraciones en estas regiones.

Partiendo de la base de que estos tumores se habían seleccionado de acuerdo con la información obtenida mediante CGH en cromosomas metafásicos (cCGH), en primer lugar se compararon los resultados obtenidos mediante ambas técnicas. En general, los resultados se complementaron y, como era de esperar, la técnica de CGH en arrays de DNA (aCGH) mostró un mayor número de desequilibrios. Se observó, también, un mayor porcentaje de pérdidas que no se habían detectado mediante la técnica de CGH convencional. Un estudio comparativo en cáncer de colon mostró también que la aCGH es capaz de detectar numerosas pérdidas que pasan desapercibidas mediante cCGH (Camps, et al. 2006).

Una de las características de las vías de desarrollo y progresión de los tumores es el aumento en la complejidad de las alteraciones del genoma. Nuestros resultados mostraron un perfil de desequilibrios muy complejo en los tumores de vejiga músculo infiltrantes con una fracción del 28% del genoma alterado del cual aproximadamente una mitad (15%) correspondía a ganancias y la otra mitad (13%) a pérdidas. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Blaveri et al. (2005). Según estos autores, los tumores T2-T4 presentan un 16% del genoma alterado. Este porcentaje es mucho menor al detectado por nosotros. Es interesante destacar que, otros autores (Heidenblad, et al. 2008), han obtenido resultados similares a los nuestros y también discrepan con los obtenidos por Blaveri et al. (2005).

De acuerdo con nuestros resultados, los tumores T1G3 muestran una elevada inestabilidad con una fracción del 28% del genoma alterado, confirmando la similitud genética de estos tumores con los músculo infiltrantes. Dentro de éstos últimos, cabe destacar que los T3 eran los que presentaban un mayor número de desequilibrios y que estos disminuían en los T4.

El perfil de desequilibrios genómicos de nuestra serie de tumores músculo infiltrantes es muy complejo, afectando a la mayoría de los cromosomas. Las regiones más frecuentemente ganadas fueron: 1q, 2p, 3pq, 5p, 6p, 7, 8q, 10p, 17q, 18p, 19q y 20q. Las pérdidas afectaron a 2q, 4pq, 5q, 6q, 8p, 9, 11pq, 13q, 14q, 15q. Estos resultados coinciden, en general, con los de otros autores que han analizado tumores de vejiga mediante aCGH (Blaveri, et al. 2005a; Heidenblad, et al. 2008; Hurst, et al. 2004; Veltman, et al. 2003).

De forma recurrente, se observaron deleciones en homocigosis afectando a 5q, 8p, 9p, 9q, 11p y 11q. Debido a la complejidad que presentaban las pérdidas de 5q, 11p y 11q, nuestros resultados no nos permitieron resolver con precisión estas alteraciones. Confirmando la mayoría de estudios (Heidenblad, et al. 2008; Hurst, et al. 2004; Veltman, et al. 2003), se identificó la pérdida en homocigosis de clones en 9p21.3 correspondientes al gen *CDKN2A* y en diversas regiones de 9q.

La alteración genómica que da lugar a la amplificación génica es un mecanismo frecuente de activación de oncogenes durante el desarrollo del cáncer. La amplificación génica juega un importante papel en la progresión del cáncer de vejiga y algunos de los genes diana tales como *HER2* en 17q21, *CCND1* (11q13), *CMYC* (8q24), *EGFR* (7p13) entre otros tiene un papel importante en el desarrollo de estos tumores (Knowles 2008).

En nuestro estudio mediante de hibridación genómica comparada en arrays de DNA detectamos una serie de amplificaciones de alto nivel que implicaban las regiones cromosómicas 5p13.2, 5p15.33, 1q21.2, 1q23.3, 6p22.3 y 19q12, estas amplificaciones eran recurrentes, observándose en dos o más tumores.

Uno de los clones amplificado de forma recurrente en 19q12 contenía el gen de la ciclina E. Mediante FISH confirmamos su amplificación en un 16% de las muestras analizadas.

Uno de los clones amplificados en la región 6p22.3 contenía el gen *E2F3*. Otros estudios mediante aCGH han propuesto que este gen es diana de la amplificación en al menos una fracción de los tumores de vejiga (Veltman, et al. 2003) Otros autores (Feber, et al. 2004; Oeggerli, et al. 2004) han demostrado su participación en la progresión del cáncer de vejiga y sugieren que sería uno de los oncogenes más amplificados en los tumores infiltrantes.

Con el propósito de investigar la importancia de *E2F3* en nuestra serie de tumores músculo infiltrantes, demostramos mediante FISH que este gen se amplificaba en un 48% de las muestras analizadas. Además, se observó que estos tumores no presentaban la expresión de pRB o expresaban la forma hiperfosforilada.

E2F3 pertenece a la familia de factores de transcripción que regulan el ciclo celular bajo el control del retinoblastoma. De forma interesante, nuestros resultados correlacionan una amplificación o ganancia de *E2F3* con alteraciones de pRB.

Muchas de las alteraciones genéticas detectadas en cáncer de vejiga dan como resultado la desregulación del control que RB ejerce sobre el ciclo celular (Cordon-Cardo 2008; Knowles 2001). El gen *RB1* puede verse afectado por mutación o pérdida. El descubrimiento de la amplificación de *E2F3* en relación con la ausencia de pRB destaca la importancia del papel del primero. Estudios en líneas celulares de cáncer de vejiga han demostrado la relación entre la amplificación o sobreexpresión de *E2F3* y la pérdida o expresión alterada de pRB (Ferber, et al. 2004). Otros autores (Hurst, et al. 2008) proponen que en un subgrupo de tumores de vejiga con amplificación o sobreexpresión de *E2F3* se requiere, además, la inactivación de la vía del RB. Estos datos confirman nuestros resultados, según los cuales la amplificación de *E2F3* está asociada a la pérdida de funcionalidad de pRB.

La búsqueda de genes diana de las amplificaciones en 1q y 5p no resultó tan evidente como para *E2F3* en 6p22 o *CCNE1* en 19q12, por lo que se seleccionaron genes incluidos en las regiones de amplificación en base a su función en el ciclo celular y datos obtenidos de la literatura.

La validación de posibles genes diana de las amplificaciones precisa del estudio del número de copias de estos genes mediante FISH y debe confirmarse mediante el análisis de la expresión de la proteína. Aplicando esta estrategia, hemos demostrado que *SKP2* y *CKS1* son genes que se encuentran frecuentemente amplificados y sobreexpresados en los tumores de vejiga. Ambos genes cooperan en la degradación de p27 en el proteosoma por lo que también se analizó este gen junto con la expresión de las proteínas *SKP2*, *CKS1*, p27 y pRB.

Este estudio nos permitió demostrar que la elevada expresión de *SKP2* y *CKS1* correlaciona con la expresión negativa de p27 y pRB.

p27 es un regulador negativo del ciclo celular y juega un importante papel en la supresión tumoral. La pérdida de p27 como consecuencia de un incremento en su degradación, da como resultado una proliferación descontrolada y promueve la progresión tumoral. Se han encontrado niveles bajos de p27 en tumores de mama, colon, próstata, así como en otros carcinomas epiteliales, sarcomas y neoplasias hematológicas (revisado por Hershko 2008). A diferencia de otros genes supresores, que de forma frecuente se inactivan por mutación o delección, el gen de p27 no se encuentra alterado en el cáncer (Hengst and Reed 1996; Morgan 1995)

Actualmente se conoce que los niveles de p27 se regulan a través de un sistema controlado que conduce a su ubiquitinación y posterior degradación en el proteosoma. En este proceso, SKP2 juega un papel esencial reconociendo específicamente p27 fosforilada y marcándola para su ubiquitinación (Bornstein, et al. 2003; Montagnoli, et al. 1999). Así pues, la expresión alterada de SKP2 sería la responsable de las alteraciones de p27 observadas en los tumores. Para que la interacción entre el complejo ubiquitin ligasa SKP2 y p27 sea eficiente, se requiere la colaboración de CKS1 (cyclin kinase subunit 1). CKS1 es por lo tanto un factor accesorio esencial para la destrucción de p27 dependiente de SKP2.

Diversos estudios han demostrado que los bajos niveles de p27 en las células tumorales son el resultado de un incremento en la expresión de SKP2 (Nakayama, et al. 2000; Sutterluty, et al. 1999). Un aumento de la expresión de SKP2 y CKS1 asociado a la disminución de p27 se ha observado en numerosas neoplasias humanas y se ha propuesto que ambos pueden tener un papel importante en promover un comportamiento agresivo del tumor vía regulación la degradación de p27. La correlación negativa entre SKP2, CKS1 y p27 se ha demostrado en tumores avanzados de colon (Hershko, et al. 2001; Shapira, et al. 2005), gástricos (Masuda, et al. 2002) de pulmón (Inui, et al. 2003). Todos estos datos confirman la correlación negativa entre SKP2, CKS1 y p27 detectada en el presente estudio. Nuestros resultados demuestran la implicación de estos genes en el control negativo de p27 en tumores avanzados de vejiga. Otros autores (Kawakami, et al. 2007; Langner, et al. 2004) ya habían demostrado el importante papel de *SKP2* y *CKS1* en la progresión de los tumores uroteliales.

Los mecanismos que regulan la expresión de *SKP2* no están del todo claros. En nuestro estudio se demuestra que en algunos tumores, la amplificación del gen es

responsable de la sobreexpresión de la proteína. La amplificación de 5p o de la región que contiene *SKP2* también se ha observado en otros tipos de tumores (Saigusa, et al. 2005; Yokoi, et al. 2004). Respecto a la regulación de la expresión de *CKS1*, estudios en cáncer de mama han demostrado una correlación positiva entre la amplificación del gen y sobreexpresión de la proteína sugiriendo que la sobreexpresión es resultado de la amplificación (Wang, et al. 2009). En nuestro grupo de estudio tanto *CKS1* como *SKP2* se encuentran ampliamente sobreexpresadas, y no únicamente en aquellos tumores que presentan amplificación génica de *SKP2* y *CKS1*. Todo esto pone de manifiesto la presencia de otros mecanismos que favorecerían la sobreexpresión de dichos genes.

Además de la baja o nula expresión de p27, los tumores de nuestra serie se caracterizaron por la ausencia de expresión de pRB o por presentar la forma hiperfosforilada de la proteína.

Estudios recientes (Wang, et al.) han demostrado que ratones heterocigotos para el gen del retinoblastoma (*Rb⁺/Rb⁻*) desarrollan tumores en la pituitaria que son (*Rb⁻/Rb⁻*) y que muestran un aumento substancial de la expresión del RNAm de *skp2* y descenso de p27. Los tumores analizados en el presente estudio presentan las mismas características, es decir: alteraciones en pRB, descenso de los niveles de p27, sobreexpresión de *SKP2* y *CKS1*. El hecho de que además presenten amplificación de *E2F3*, sugiere que en las formas avanzadas del cáncer de vejiga se requiere la alteración de más de un componente de la vía del retinoblastoma.

Podemos sugerir que los tumores estudiados por nosotros constituirían un subgrupo dentro de los tumores de vejiga músculo infiltrantes, caracterizado por alteraciones en el cromosoma 5, frecuente amplificación de *E2F3*, amplificación o sobreexpresión de los genes *SKP2* y *CKS1*, baja la expresión de p27 y alteraciones de pRB.

La frecuente implicación de *E2F3* y *SKP2* en las formas avanzadas de los tumores de vejiga nos empuja a proponer que estudios de FISH mediante sondas de *SKP2* o *E2F3* en células de descamación en orina, serían de gran utilidad para diferenciar tumores invasivos o mínimamente invasivos de los Ta superficiales.

5.3. INESTABILIDAD CROMOSÓMICA EN EL CÁNCER DE VEJIGA: LA COALESCENCIA DE CENTROSOMAS Y LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE LA CICLINA D1 SON FENÓMENOS COMUNES EN TUMORES NO MÚSCULO-INFILTRANTES

La inestabilidad cromosómica es la fuerza motriz del elevado número de alteraciones que se observa en la mayoría de los tumores sólidos. Dentro de los mecanismos que generan inestabilidad cromosómica nos centramos en el estudio de alteraciones en el centrosoma y en el fenómeno de amplificación génica y su presencia en tumores uroteliales de vejiga

Nuestro estudio nos ha permitido describir el comportamiento *in vivo* de la amplificación de *CCND1* dentro de los tumores de vejiga T1 con inestabilidad cromosómica. También hemos demostrado que el agrupamiento de centrosomas supernumerarios asociado a la formación de husos mitóticos bipolares es una característica frecuente en estos tumores.

Nuestro estudio es el primero que describe la amplificación de *CCND1* de manera simultánea en forma de HSR y DMs en las células tumorales de vejiga. Nuestros resultados sugieren una estrecha relación entre el fenómeno de la fragmentación de las HSR y la aparición de los DM. Además estos DMs pueden ser eliminados del núcleo celular mediante su extrusión en micronúcleos. Es interesante, el hecho de que los pacientes cuyos tumores presentaron DMs tuvieron una supervivencia menor, que aquellos sin DMs.

El fenómeno de la coalescencia de los centrosomas supernumerarios se observó en un 80% de los tumores con alta inestabilidad cromosómica

Los datos presentados aquí contribuyen a la comprensión del complejo comportamiento *in vivo* de los cromosomas en las células tumorales de vejiga y muestra como un minucioso análisis mediante FISH sobre muestras parafinadas permite analizar lo que estaba ocurriendo en el tumor en el mismo momento de la extracción quirúrgica del mismo.

HETEROGENEIDAD INTRATUMORAL COMO MANIFESTACIÓN DE CIN

Los resultados de nuestro análisis sobre la variación del número de copias del gen *CCND1*, revelan un patrón de comportamiento complejo en los tumores de vejiga no músculo infiltrantes. Además sugieren que el número de copias de *CCND1* podría servir como biomarcador para detectar la inestabilidad cromosómica en el cáncer de vejiga. Al clasificar las muestras de tumores de acuerdo a su índice CIN, se encontró asociación entre la elevada heterogeneidad, las alteraciones del centrosoma y la amplificación de *CCND1*.

Nuestra serie de 22 muestras incluía 21 tumores no músculo infiltrantes cuyo índice CIN aumentaba con el grado tumoral, este fenómeno ha sido previamente descrito en cáncer de vejiga (Sauter, et al. 2004). Al clasificar las muestras tumorales en tres grupos, de acuerdo a su índice CIN, observamos que la mayoría de tumores Ta correspondían al grupo CIN negativo. Estos resultados concuerdan con la clasificación de WHO del 2004, que diferencia dos tipos de entidades de tumores no músculo infiltrantes: por un lado tumores genéticamente estables, que raramente presentan amplificaciones (Ta de bajo grado G1/G2) y por otro lado tumores con un alto grado de inestabilidad cromosómica, incluyendo amplificaciones de alto grado (T1 de alto grado) (Nelsen, et al. 2005).

La discordancia observada entre los resultados FISH y CGH en las muestras con un índice CIN positivo pone de manifiesto la alta heterogeneidad intratumoral presente en estos tumores. La CGH detecta las alteraciones genéticas predominantes en el tumor, sin embargo no detecta las alteraciones presentes una pequeña fracción de células. La asociación de los DMS, centrosomas alterados y la CIN intercelular observada en nuestro estudio podría reflejar la existencia de un fenotipo CIN, que no se traduce en un fenotipo clonal.

LA COALESCENCIA DE LOS CENTROSOMAS SUPERNUMERARIOS EVITA LA FORMACIÓN DE METAFASES MULTIPOLARES

Como cabía esperar, la amplificación de los centrosomas correlacionó con la CIN en nuestro grupo de muestras estudiadas. Aproximadamente un 77% de las muestras CIN positivas y un 0% de las CIN negativas presentaron anomalías del centrosoma. Durante el análisis de las células en metafase, en algunos tumores se encontraron metafases multipolares y pseudobipolares, en todos los casos se trataba de muestras CIN positivas con centrosomas supernumerarios. La presencia de metafases multipolares, al generar un nivel de aneuploidía demasiado elevada, podría poner en riesgo la viabilidad celular. Numerosas líneas celulares de cáncer parecen haber solucionado este problema mediante la agrupación de los centrosomas extra en dos únicos polos funcionales en el huso mitótico, garantizando de este modo una segregación de los cromosomas en un eje bipolar (Chandhok and Pellman 2009; Kallioniemi, et al. 1994; Quintyne, et al. 2005). Este fenómeno se ha observado en varias muestras del presente estudio, que mostraron husos bipolares y centrosomas extremadamente grandes, confirmando que el fenómeno de agrupación de centrosomas o coalescencia es frecuente en los tumores de vejiga *in vivo*. Cabe destacar que se observó la formación de husos bipolares en tres de las muestras CIN positivas que presentaban centrosomas extremadamente largos en forma de fibra, similares a los observados por Pihan et al. (Pihan, et al. 2003) en una serie de tumores malignos y líneas celulares derivadas de tumores.

La elevada inestabilidad cromosómica observada en nuestras muestras con agrupación de centrosomas sugiere que otros factores podrían estar causando la inestabilidad cromosómica. De hecho, se observaron cromosomas con retraso en su migración a los polos al estudiar tanto células en anafase como en telofase. Esto es consistente con estudios llevados a cabo por Thompson y Compton (Thompson and Compton 2008) sobre líneas celulares humanas, que permitieron identificar la implicación de los errores de unión entre cinetocoro-microtúbulos del huso, dando lugar a retrasos de la anafase y errores de segregación cromosómica. Más recientemente, se ha demostrado en líneas celulares tumorales que los centrosomas supernumerarios son capaces de promover errores en la segregación cromosómica durante una división bipolar. Estos errores de segregación aparecen como consecuencia del paso a través de una situación transitoria de metafase multipolar en

la que los errores por uniones merotéticas se acumulan antes de que los centrosomas se agrupen y comience la anafase (Ganem, et al. 2009).

LA AMPLIFICACIÓN DE *CCND1* PRESENTA UN COMPORTAMIENTO COMPLEJO Y ESTÁ RELACIONADA CON LA INESTABILIDAD CROMOSÓMICA

La amplificación de regiones genómicas es el signo de inestabilidad cromosómica mas frecuente en los tumores. En nuestro estudio detectamos la amplificación de *CCND1* única y exclusivamente en las muestras con inestabilidad sugiriendo una estrecha correlación entre ambos fenómenos. Observamos, además, que la amplificación presentaba un comportamiento complejo y que en algunos tumores, aparecía simultáneamente en forma de HSR y DM con formas intermedias en algunas subpoblaciones celulares del mismo tumor.

El gen *CCND1* es uno de los genes diana del amplicón 11q13. Los genes incluidos en este amplicón han sido exhaustivamente estudiados y al menos cuatro núcleos de amplificación se han identificado en cáncer de mama. (Debatisse, et al. 1998; Hui, et al. 1997; Jin, et al. 2006; Ormandy, et al. 2003). Sin embargo, no se conoce con exactitud como evoluciona este amplicón en las células tumorales.

El amplicón 11q13 se sitúa generalmente en la misma región cromosómica de sus genes diana, es decir en 11q13. (Jin, et al. 2006; Jin, et al. 1998; Roelofs, et al. 1993; Schwab 1998). El hecho de que las HSR observadas en este estudio se ubiquen generalmente en la misma región cromosómica de los genes diana amplificados, respalda la hipótesis de que la amplificación 11q13 tiene un origen intracromosómico (Roelofs, et al. 1993). La presencia de cromosomas dicéntricos y puentes citoplasmáticos en las células con amplificación de *CCND1* de nuestro estudio es consistente con el papel del ciclo rotura-fusión-puente (BFB) en el proceso de las amplificaciones intracromosómicas.

Para explicar la génesis de las amplificaciones extracromosómicas tales como los DMs se han propuesto otros mecanismos (Kuttler and Mai 2007). Experimentos en levaduras han demostrado que las roturas de doble cadena con tope en horquilla que ocurren en las secuencias Alu cuasipalíndromes, pueden dar lugar a amplificaciones génicas tanto en forma de DM como de HSR. De acuerdo con este modelo, la naturaleza del amplicón depende de la localización cromosómica del gen amplificado

respecto a la rotura de doble cadena (Narayanan, et al. 2006). Cabe destacar, la coexistencia de DMs y HSRs conteniendo la amplificación de *CCND1* en las muestras de nuestro estudio, ya que hasta al momento no existe ninguna referencia en la bibliografía respecto a este fenómeno. Además, la amplificación de *CCND1* en forma de diminutos dobles tampoco se había descrito hasta el momento. En los tumores con ambos tipos de amplificación, se observaron metafases con HSR y con DMs en las zonas de transición entre las poblaciones celulares con HSR y las poblaciones con DMs dentro de un mismo tumor. Estas observaciones demuestran una estrecha correlación entre la presencia de DMs y la fragmentación de HSRs observada, sugiriendonos un posible mecanismo de escisión de las secuencias que forman parte de HSR, dando lugar a la amplificación de *CCND1* en DMs. Este fenómeno ha sido descrito en líneas celulares humanas con amplificación del gen de resistencia al Metotrexato (Morales, et al. 2009; Singer, et al. 2000). Nuestros hallazgos sugieren que *in vivo* ocurre un mecanismo similar en las células del tumor. Además, la fragmentación de la HSR puede darse tardíamente en una metástasis del tumor original, tras haber permanecido estable durante un largo periodo de tiempo.

Todas las muestras con DMs también exhibieron micronúcleos, aproximadamente un 50% de ellos siendo positivos para el gen *CCND1*. El hecho de que la señal del gen de la ciclina D1, estuviera ausente en el 50% restante nos indica, que otras regiones del genoma se están eliminando activamente del núcleo celular. Estos resultados sugieren que la extrusión de micronúcleos puede inducir un rápido y dramático cambio, no sólo en el número de copias de los DMs y *CCND1*, sino también de otros fragmentos acéntricos o incluso cromosomas completos, acelerando por tanto la inestabilidad cromosómica. La eliminación de la *CCND1* amplificada en forma de DMs mediante micronúcleos en los tumores de vejiga es consistente con los resultados obtenidos por Valent et al (Valent, et al. 2001) referentes a la amplificación de *MYCN* en forma de DMs en neuroblastoma. Curiosamente, en alguna de las muestras estudiadas se pudieron observar núcleos con una, dos o tres copias del gen *CCND1* y su correspondiente centromero, que presentaban un micronúcleo adyacente completamente positivo para el gen *CCND1*, sugiriendo que se puede restablecer el estado normal de este gen mediante la extrusión de micronúcleos.

Se ha sugerido que la ciclina D1 puede promover la duplicación del centrosoma. Además, Nelsen et al.(Nelsen, et al. 2005) demostraron que la sobreexpresión de

Ciclina D1 durante un corto periodo de tiempo inducía la amplificación de centrosomas, anomalías del huso mitótico y aneuploidía, estos hallazgos son consistentes con nuestros resultados. Todas las muestras con amplificación de *CCND1*, excepto una, presentaron anomalías del centrosoma y en todos los casos eran CIN positivas.

A pesar del bajo número de muestras analizadas, es destacable que nuestra clasificación de los tumores de acuerdo a su índice CIN, incluía todos los tumores T1G3 en el grupo CIN positivo. El grupo CIN negativo se componía de tumores de grado 1 y 2, siendo todos menos uno Ta. La amplificación de *CCND1* se observó en forma de DMs, siendo esta la primera cita en la literatura. Las células tumorales mostraron la capacidad *in vivo* de eliminar las copias extra de *CCND1* mediante la extrusión de micronúcleos. Se observó la eliminación de *CCND1* únicamente en las células que presentaban la amplificación en forma de DM, pero no en las que presentaban dicha amplificación en HSR. Este fenómeno y el reparto desigual de los DMs entre las células hijas pueden dar lugar a un rápido cambio del número de copias génicas en las células tumorales.

Finalmente, es sabido que la amplificación del centrosoma es causa de CIN, como también lo son el retraso de cromosomas en la anafase y la formación de micronúcleos. La agrupación de centrosomas reduce la inestabilidad cromosómica, pero no la elimina por completo (Chandhok and Pellman 2009; Ganem, et al. 2009) sin embargo incrementa de manera significativa la viabilidad de la célula, al evitar la formación de metafases multipolares. El hecho de que la agrupación de centrosomas sea una característica de los tumores de elevada inestabilidad cromosómica y la aparición de nuevas drogas, como la grisofulvina, que de manera específica impiden la agrupación de centrosomas (Rebacz, et al. 2007), pone de manifiesto la importancia de realizar más estudios sobre las alteraciones del centrosoma en el cáncer de vejiga

5.3. GENES IMPLICADOS EN EL CONTROL DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y SU PAPEL PRONÓSTICO EN LOS TUMORES DE VEJIGA SUPERFICIALES

El comportamiento de los tumores uroteliales no músculo infiltrantes se caracteriza por una elevada tasa de recurrencia, lo que condiciona su seguimiento clínico. La identificación de las alteraciones moleculares críticas para la recurrencia y

progresión tumoral podrían ayudar a predecir el comportamiento clínico del tumor y elegir el tratamiento adecuado para el paciente.

Diversos autores han estudiado la implicación de los reguladores del ciclo y de la proliferación celular en el cáncer de vejiga y su papel en el pronóstico. Sin embargo, estos resultados son controvertidos y el potencial valor pronóstico de estos marcadores continua sin estar claro (Knowles 2001; Mhawech, et al. 2004). Para comparar las alteraciones genéticas con el desarrollo y progresión tumoral, consideramos que sería interesante esclarecer la correlación entre en el número de cromosomas y número de copias de los genes estudiados con la expresión de las proteínas.

Por este motivo, se analizaron las alteraciones en 9p21, *CCND1*, *EGFR* y *CMYC* en relación al número de copias centroméricas de sus respectivos cromosomas (9, 11, 7, 8). También se estudió la expresión de las proteínas ciclina D1 y p16, así como otras proteínas involucradas en el control del ciclo celular, como p21 y p53. La utilización de un microarray de 152 tumores se perfiló como la mejor plataforma para un estudio de este tipo.

Nuestros resultados confirman que la delección de 9p21 es una alteración citogenética frecuente y un evento temprano en la carcinogénesis vesical. La pérdida de 9p21 se observó en todos los estadios y grados, siendo más frecuente en los tumores de bajo grado y Ta. Además de las pérdidas del centrómero 9 y el locus 9p21, también se detectó la ganancia del número de copias de dicho locus en algunas de las muestras.

Los casos con ganancia de 9p21 presentaron siempre igual o mayor número de señales centroméricas, indicando que la ganancia de 9p21 aparece como consecuencia de la polisomía del cromosoma 9.

Según nuestros resultados, la ganancia de *CCND1*, *EGFR* y *CMYC* son alteraciones más frecuentes que la pérdida de 9p21. Todas estas ganancias, exceptuando *EGFR*, se asociaban significativamente a los tumores TaG3 y T1G3.

En cuanto a las aneuploidías detectadas analizando los cromosomas 7, 8, 9 y 11, se observó una clara asociación entre el grado tumoral y aneuploidía, ya que los

tumores TaG3 y T1G3 presentaban frecuentemente aneuploidías, confirmando otros resultados de la bibliografía (Placer, et al. 2005; Ribal, et al. 2004).

Se observó que la alta polisomía del cromosoma 7 podría ser un buen marcador de recurrencia de tumor. La polisomía del cromosoma 7 era la causa principal del incremento de número de copias de *EGFR* en los tumores de nuestra serie, ya que la amplificación se observó en un único caso.

En este trabajo demostramos que, en los tumores de vejiga no músculo infiltrantes, la ganancia tanto de *EGFR* como de 9p21 tiene su origen principal en las ganancias de cromosoma completo. Por el contrario las ganancias de *CCND1* y *CMYC* presentan incremento del número de copias tanto debido a la polisomía como a un incremento en el número de copias respecto al centrómero. De hecho, las ganancias y amplificaciones de *CCND1* y *CMYC* son comunes en el cáncer de vejiga (Watters, et al. 2002).

En nuestro estudio observamos, además, una relación entre aneuploidía de los tumores y edad de los pacientes. La ganancia de los genes y cromosomas analizados mostraron una asociación estadísticamente significativa con una edad avanzada del paciente. Además de la polisomía, la ganancia relativa y la pérdida relativa de 9p21 se asociaron también a una mayor edad. Cabe destacar que Namazie et al. (Namazie, et al. 2002) han descrito un fenómeno similar relacionando la amplificación de *CCND1* en cancer de cabeza y cuello con la edad de los pacientes.

La aneuploidía es frecuente en los tumores humanos y durante décadas la edad se ha asociado a un incremento de las aneuploidías en la línea germinal (Jacobs, et al. 1963). Una edad más avanzada implica una mayor exposición a factores ambientales dañinos, errores genéticos en la traducción o replicación del DNA y errores mitóticos (Geigl, et al. 2004), lo que favorecería la aparición de aneuploidías y fenómenos como la amplificación y delección en los tumores de los pacientes de edad más avanzada.

Además, se ha descrito que el tiempo libre de recurrencia disminuye con el aumento de la edad de los pacientes de vejiga y que la mayor edad correlaciona con la desdiferenciación del tumor (Shi, et al. 2008).

CONSECUENCIA DE LAS ALTERACIONES DE LA DOSIS GÉNICA EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS Y PRONÓSTICO

En cuanto al efecto de las alteraciones genéticas sobre la expresión proteica, y el pronóstico de los pacientes, es importante destacar que se han utilizado dos criterios para evaluar los resultados de FISH. Por un lado el número absoluto de copias del gen o centrómero, y por otro la ganancia o pérdida relativa del gen respecto al centrómero.

En el caso de la ciclina D1, observamos que su expresión se asociaba a la ganancia relativa del gen, por el contrario la ganancia absoluta del mismo no mostró ningún tipo de asociación con la proteína. Teniendo en cuenta que la expresión de ciclina D1 está regulada a nivel transcripcional y traduccional, nosotros sugerimos que la disminución de expresión de ciclina en los tumores altamente aneuploides observada en nuestro estudio, podría tener su origen en la compleja regulación presente en los carcinomas de vejiga. Además, la pérdida relativa y delección en homocigosis del locus 9p21 se asociaba a un incremento en la expresión de ciclina D1. Estos resultados concuerdan con el hecho de que la ciclina D1 y p16 son antagonistas en el control del ciclo celular.

Curiosamente, p21, inhibidor que regula negativamente el ciclo celular y que actúa posteriormente a p16 en la cascada enzimática, mostró un aumento de expresión en los tumores con pérdida de 9p21. Probablemente, el incremento de expresión de p21 refleja la existencia de un mecanismo de regulación homeostático, para prevenir los efectos de la pérdida de p16. La asociación estadísticamente significativa entre el aumento de expresión de p21 y la pérdida de p16 (9p21) es consistente con este modelo. Como se esperaba, la ganancia de 9p21 asociada a la polisomía del cromosoma 9 resultó en un incremento estadísticamente significativo de la expresión de p16, por el contrario la pérdida o delección en homocigosis resultó en el descenso o no expresión de p16, respectivamente.

Respecto a la expresión de p53, observamos que correlacionaba con la ploidía del tumor. Estos resultados son consistentes con el hecho que la p53 mutada se asocia con la inestabilidad genómica en las células tumorales (Hopman, et al. 2002). Las mutaciones de p53 en carcinomas uroteliales se sabe que favorecen la disfunción de los centrosomas y la aparición de aneuploidía (Flori and Schulz 2008).

El gen *CDKN2* es la diana principal de la delección del locus 9p21. Este gen juega un papel principal en el control del ciclo celular y es un conocido marcador del cáncer de vejiga (Baffa, et al. 2006; Kim and Bae 2008; Knowles 2001), lo que ha planteado a numerosos autores su posible valor predictivo de la recurrencia y progresión tumoral.

El valor predictivo de recurrencia de la pérdida de 9p21 en los tumores de vejiga no músculo infiltrantes continua siendo controvertido (Friedrich, et al. 2001; Kruger, et al. 2003). Algunos investigadores han sugerido que la pérdida de 9p21 es un factor predictivo de recurrencia, sin embargo otros no han encontrado ningún tipo de asociación. Los resultados de nuestro estudio no muestran asociación con recurrencia, en concordancia con los resultados obtenidos por Friedrich et al (Friedrich, et al. 2001).

Varios estudios han mostrado una relación clara de la sobreexpresión de *EGFR* con una pronóstico clínico adverso (Mellon, et al. 1995). La amplificación de *EGFR* se ha observado en un 4,6% de los tumores uroteliales y se ha asociado a una proliferación rápida, agresividad tumoral y mal pronóstico (Chow, et al. 2001). Nuestros resultados indican que la amplificación de *EGFR* no es una alteración frecuente en tumores Ta y T1. En lo que a pronóstico se refiere, se encontró correlación entre la alta ganancia de *EGFR* (asociado a la alta polisomía del cromosoma 7) y recurrencia del tumor. El tiempo libre de recurrencia era menor en los pacientes que presentaron esta alteración. El análisis multivariante de COX mostró que la alta ganancia de *EGFR* era un marcador pronóstico independiente de recurrencia en tumores Ta. Siendo el riesgo de recurrencia dos veces mayor en los pacientes cuyos tumores presentaban alta ganancia de *EGFR*. Curiosamente, este riesgo se veía incrementado hasta 5 veces en los tumores TaG3 con alta ganancia de *EGFR*.

Ninguno de los parámetros clínicos estudiados se asoció a la pérdida de 9p21. Sin embargo, la alta ganancia de 9p21 debido a la polisomía del cromosoma 9 mostró asociación respecto a una menor supervivencia libre de progresión.

El gen de la ciclina D1 se localiza en el locus 11q13 y es uno de los oncogenes más comúnmente amplificados y sobreexpresados en el cáncer vesical (Bringuiet, et al. 1996). La ciclina D1 se considera un factor pronóstico de supervivencia en pacientes con cáncer de vejiga músculo infiltrante (Tut, et al. 2001). En tumores no músculo infiltrantes, el valor de la ciclina D1 es controvertido (Sgambato, et al. 2002; Shin, et al.

1997). Nuestros resultados muestran que la ganancia y alta ganancia de *CCND1* se asocia un menor tiempo libre de progresión tumoral en el análisis univariante. Resultados similares fueron obtenidos por Zaharieva et al (Zaharieva, et al. 2003) en tumores T1 con ganancia de *CCND1*. Sin embargo, en el análisis multivariante, observamos que la ganancia de *CCND1* pierde importancia frente a la alta ganancia de *CMYC* y 9p21 en tumores T1. La ganancia de 9p21 se muestra como marcador pronóstico independiente de progresión en tumores T1G3, la alta ganancia de 9p21 le confiere al tumor un riesgo de progresión a músculo infiltrantes de 8,21 veces superior.

La ganancia relativa y la amplificación de *CCND1* fueron los únicos marcadores asociados a una peor supervivencia, pero no la ganancia o alta ganancia de *CCND1*. Esto nos podría indicar que el incremento de copias de *CCND1* respecto al cromosoma, debido a reorganizaciones o fenómenos de amplificación, tiene un peor pronóstico que el incremento de número de copias debido a una polisomía del cromosoma 11. El riesgo de muerte específica por tumor era 3,64 veces mayor en pacientes con amplificación de *CCND1*. Según Zaharieva et al (Zaharieva, et al. 2003), este peor pronóstico podría ser debido al alto nivel de inestabilidad por la cual las aberraciones estructurales de cualquiera de los genes o regiones genómicas podrían servir como marcadores subrogados.

Watters et al.(Watters, et al. 2002) propusieron que la amplificación o alteraciones de *CMYC/CCND1* en tumores superficiales de vejiga podrían tener relevancia clínica promoviendo y prediciendo progresión a tumores músculo infiltrante. Nosotros encontramos que la alta ganancia de *CMYC* estaba asociada a un tiempo menor libre de progresión, pero no la ganancia de menos de 5 copias.

En conclusión, este trabajo confirma que la pérdida de 9p21 es una alteración frecuente en el cáncer de vejiga. Esta alteración se encuentra en una frecuencia semejante en tumores Ta y T1, afecta al gen *CDKN2A* y correlaciona con una menor expresión o ausencia de expresión de proteína p16. A diferencia de otros estudios, además de las pérdidas de centrómero 9 y 9p21, nosotros encontramos en algunos de los tumores ganancia de 9p21, que se reflejaba en una expresión de p16 aumentada. La ganancia de 9p21 proviene de la polisomía del cromosoma 9 y predice un menor tiempo libre de progresión, así como lo hacen la ganancia y la alta ganancia de

CCND1 y *CMYC*, respectivamente. La ganancia de 9p21 ha demostrado ser un buen marcador pronóstico independiente de progresión en tumores T1, especialmente en tumores T1G3. Nuestros resultados sugieren que *EGFR* podría ser un marcador pronóstico independiente de recurrencia en tumores Ta, pero especialmente de los TaG2. Este estudio también resalta la importancia de un minucioso análisis de los resultados de FISH al evaluar el potencial pronóstico de los marcadores analizados.

5.4. ¿REPRESENTAN LOS PACIENTES CON CÁNCER DE VEJIGA SUPERFICIAL UN GRUPO A CONSIDERAR PARA EL SCREENING DE CÁNCER DE PULMÓN?

El cáncer de vejiga ocupa el segundo lugar entre las neoplasias genitourinarias con una alta prevalencia en los países industrializados. Tanto los tumores de vejiga como los de pulmón se incluyen entre las diez neoplasias más frecuentes en ambos sexos. Así, en Estados Unidos se diagnostican 171.000 nuevos casos de cáncer de pulmón y 57.000 de vejiga cada año (Doll and Peto 1981; Kantor and McLaughlin 1985). En Europa se diagnostican 66.000 nuevos casos de cáncer de vejiga al año y su distribución es irregular siendo más frecuente en las regiones del Sur. (Black, et al. 1997; Skov, et al. 1991). En España se diagnostican 18.500 nuevos casos de cáncer de pulmón y 14.500 casos de cáncer de vejiga cada año. España está a la cabeza de los países europeos en cuanto a la incidencia de cáncer de pulmón y ocupa el segundo lugar en cuanto a la mortalidad debida a esta patología.

Ambos tipos de tumor comparten como factor de riesgo común, el tabaco. Fumar constituye el factor de riesgo más importante para ambas neoplasias en Europa (Kuper, et al. 2002).

Teniendo en cuenta lo antes mencionado y el hecho de que estudios epidemiológicos han demostrado que alrededor de 8 años después del diagnóstico, los pacientes con carcinomas de vejiga superficiales presentan un riesgo elevado a sufrir un segundo tumor primario (Mydlo, et al. 2001; Mydlo and Gerstein 2001), centramos nuestro trabajo en el estudio de la incidencia de cáncer de pulmón en pacientes con cáncer de vejiga no músculo infiltrante.

En nuestro grupo de estudio se observó una frecuencia de cáncer de próstata y pulmón superior a la observada en la población general. La aparición de segundas neoplasias en pacientes con cáncer de vejiga ya se había descrito previamente (El-

Hakim, et al. 2004; Mathers, et al. 2008; Miyazaki, et al. 2008; Rusthoven, et al. 2008; Singh, et al. 2008; Vainrib and Leibovitch 2007), de hecho se ha observado un aumento en la prevalencia de pacientes con dos o más tumores primarios en las últimas décadas (Mydlo, et al. 2001; Mydlo and Gerstein 2001; Salminen, et al. 1994).

El riesgo de padecer cáncer de pulmón, como segunda neoplasia, en los pacientes del presente estudio es diez veces superior al de la población general de Cataluña y significativamente mayor al de otros trabajos previos (El-Hakim, et al. 2004; Miyazaki, et al. 2008; Rusthoven, et al. 2008; Salminen, et al. 1994; Vainrib and Leibovitch 2007). Cabe destacar el hecho de que los pacientes de nuestro grupo fueron seleccionados por la presencia de cáncer de vejiga no músculo infiltrante. Debido a que las segundas neoplasias primarias aparecen tras un largo periodo, es esperable que los pacientes con cáncer de vejiga no avanzados, sean más susceptibles a desarrollar cáncer de pulmón que aquellos con un tumor de vejiga más agresivo (Rusthoven, et al. 2008). En el caso de los tumores superficiales, la larga supervivencia de estos pacientes puede ser lo suficientemente elevada para la aparición de un segundo tumor primario.

La presencia de más de un tumor primario en un mismo paciente puede deberse a la interacción de factores endógenos y exógenos (Vainrib and Leibovitch 2007). Tal y como se ha dicho, Los tumores de vejiga y pulmón están relacionados por un factor de riesgo común, el tabaco. Los pacientes con ambos tumores primarios de nuestro estudio eran fumadores o presentaban alta exposición al tabaco. Se ha estimado que alrededor del 65% de los cánceres de vejiga en hombre y el 20-30% en mujer tienen su origen en el tabaco. El tabaco se considera la causa de cáncer de pulmón en el 80-90% de los hombres afectados y en el 55-80% en las mujeres (Levi 1999). La distribución geográfica del cáncer de pulmón y vejiga son muy similares en España (Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer 2005). Además, en un estudio casos control se demostró que el riesgo de cáncer vesical era mayor en fumadores, que en población control (Samanic, et al. 2006).

Se ha descrito que el cese del hábito de fumar tabaco, antes o después del diagnóstico se asocia a una disminución del riesgo de cáncer y recurrencia en los tumores uroteliales no músculo invasivos (Strope and Montie 2008). Además, el tabaco incrementa el riesgo de desarrollar múltiples tumores primarios (Engeland, et al. 1997). En consecuencia, la historia del hábito tabáquico y el cese de dicho hábito pueden tener un efecto beneficioso no solo en el desarrollo del cáncer de vejiga

superficial, sino también en el desarrollo de otros tumores primarios posteriores, especialmente de pulmón, en pacientes con cáncer de vejiga superficial.

El cáncer de vejiga superficial presenta largos periodos libres de enfermedad y buen pronóstico. El hecho de que los pacientes con cáncer de vejiga no músculo infiltrante presenten un riesgo incrementado de desarrollar cáncer de pulmón, pone de manifiesto la importancia de realizar un exhaustivo seguimiento médico de estos pacientes. Además hemos de tener en cuenta que en nuestro grupo de pacientes con ambas neoplasias primarias, la causa de la muerte fue siempre el cáncer de pulmón.

Podemos concluir que el seguimiento de estos pacientes durante los cinco años posteriores al tumor de vejiga, independientemente de la presencia o no de tumor vesical, es importante ya que durante este periodo es cuando se diagnóstica el cáncer de pulmón.

Nosotros consideramos que se debería de incluir una revisión anual para la detección y prevención del cáncer de pulmón, en los pacientes aquejados de cáncer de vejiga. Esta propuesta se ve reforzada por el hecho de que en el grupo de pacientes con ambas neoplasias, la muerte se produjo siempre a causa del tumor de pulmón.

6. Conclusiones

1. Los carcinomas uroteliales de vejiga presentan un perfil característico de desequilibrios genómicos con ganancias en 1q, 8q, 11q, 16p, 17q, 18p, 19, 20q, Xq y pérdidas en 4q, 8p, 9p, 9q, 11p, 11q, 13q, 18q e Y. Las ganancias en 5p, 6p, 10p y las pérdidas en 5q y 6q aumentan su frecuencia de forma significativa a lo largo de la progresión tumoral.
2. El perfil de amplificaciones génicas en tumores de vejiga incluye preferentemente las regiones: 1q21q24, 5p12pter, 6p22, 17q25, 19q13, y 20q13.
3. Los tumores de vejiga músculo infiltrantes con alteraciones en el cromosoma 5 presentan un elevado número de desequilibrios con alrededor de un 28% de la fracción del genoma alterada
4. El gen *E2F3* es uno de los genes diana del amplicón 6p22. En un subgrupo de tumores de vejiga, la amplificación de este gen está asociada a la pérdida de funcionalidad del retinoblastoma
5. La amplificación y sobreexpresión de *SKP2* y *CKS1* es frecuente en los tumores de vejiga músculo infiltrantes y correlaciona negativamente con la expresión de p27 y pRB
6. Los genes *E2F3*, *SKP2* y *CKS1* funcionan como oncogenes relacionados con la progresión del cáncer de vejiga
7. Los tumores de vejiga no músculo infiltrantes y en especial T1G3 muestran una inestabilidad cromosómica elevada que puede estar en el origen de las numerosas alteraciones numéricas que presentan estos tumores.
8. La alteración de los centrosomas es un fenómeno común en los tumores de vejiga no músculo infiltrantes. Este fenómeno puede observarse *in vivo* en muestras parafinadas.
9. Existe una correlación entre las alteraciones de los centrosomas y la inestabilidad cromosómica. La coalescencia de centrosomas supernumerarios está asociada a la formación de husos mitóticos bipolares.
10. La amplificación de *CCND1* en forma de HSR y DM puede aparecer de forma simultánea dentro de un mismo tumor de vejiga.

11. Se observa una estrecha correlación entre la fragmentación de la HSR y la aparición de DMs dentro del mismo tumor. Estos DMs pueden ser eliminados mediante extrusión en micronúcleos.
12. Los pacientes cuyos tumores presentaron amplificación de *CCND1* en forma de DM, mostraron un tiempo de supervivencia significativamente más corto, en nuestro grupo de estudio.
13. La alta ganancia de *EGFR* asociada a la polisomía del cromosoma 7 es un marcador independiente de recurrencia en tumores no músculo infiltrantes, principalmente en tumores Ta y especialmente en tumores TaG2.
14. La alta ganancia de 9p21 y *CMYC* son marcadores independientes de progresión en tumores T1. En tumores T1G3, la ganancia de 9p21 es el único marcador pronóstico independiente de progresión.
15. El riesgo a padecer cáncer de pulmón en pacientes con cáncer de vejiga no músculo infiltrante es 10,27 veces superior al observado en la población general de Cataluña.

7. Bibliografía

1973. World Health Organization: Histological typing of urinary bladder tumors. Geneva.
1978. Union Internacional Contre le Cancer: TNM Classification of malignant tumors. Geneva.
- Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR and others. 1993. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 260:812-6.
- Aguilera A, Gomez-Gonzalez B. 2008. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet* 9:204-17.
- Andersen CL, Gruszka-Westwood A, Ostergaard M, Koch J, Jacobsen E, Kjeldsen E, Nielsen B. 2004. A narrow deletion of 7q is common to HCL, and SMZL, but not CLL. *Eur J Haematol* 72:390-402.
- Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. 1998. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* 50:197-263.
- Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer CNdE, Instituto de Salud Carlos III. 2005. La situación del cáncer en España. Ministerio de Sanidad y Consumo.
- Baffa R, Letko J, McClung C, LeNoir J, Vecchione A, Gomella LG. 2006. Molecular genetics of bladder cancer: targets for diagnosis and therapy. *J Exp Clin Cancer Res* 25:145-60.
- Baker DJ, Chen J, van Deursen JM. 2005. The mitotic checkpoint in cancer and aging: what have mice taught us? *Curr Opin Cell Biol* 17:583-9.
- Bakhoun SF, Compton DA. 2009. Cancer: CINful centrosomes. *Curr Biol* 19:R642-5.
- Basto R, Brunk K, Vinadogrova T, Peel N, Franz A, Khodjakov A, Raff JW. 2008. Centrosome amplification can initiate tumorigenesis in flies. *Cell* 133:1032-42.
- Bignell GR, Huang J, Greshock J, Watt S, Butler A, West S, Grigorova M, Jones KW, Wei W, Stratton MR and others. 2004. High-resolution analysis of DNA copy number using oligonucleotide microarrays. *Genome Res* 14:287-95.
- Black RJ, Bray F, Ferlay J, Parkin DM. 1997. Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990. *Eur J Cancer* 33:1075-107.
- Blais A, Dynlacht BD. 2004. Hitting their targets: an emerging picture of E2F and cell cycle control. *Curr Opin Genet Dev* 14:527-32.
- Blaveri E, Brewer JL, Roydasgupta R, Fridlyand J, DeVries S, Koppie T, Pejavar S, Mehta K, Carroll P, Simko JP and others. 2005a. Bladder cancer stage and outcome by array-based comparative genomic hybridization. *Clin Cancer Res* 11:7012-22.
- Blaveri E, Simko JP, Korkola JE, Brewer JL, Baehner F, Mehta K, DeVries S, Koppie T, Pejavar S, Carroll P and others. 2005b. Bladder cancer outcome and subtype classification by gene expression. *Clin Cancer Res* 11:4044-55.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279:349-52.

- Boehm M, Yoshimoto T, Crook MF, Nallamshetty S, True A, Nabel GJ, Nabel EG. 2002. A growth factor-dependent nuclear kinase phosphorylates p27(Kip1) and regulates cell cycle progression. *Embo J* 21:3390-401.
- Bond J, Roberts E, Springell K, Lizarraga SB, Scott S, Higgins J, Hampshire DJ, Morrison EE, Leal GF, Silva EO and others. 2005. A centrosomal mechanism involving CDK5RAP2 and CENPJ controls brain size. *Nat Genet* 37:353-5.
- Bornstein G, Bloom J, Sitry-Shevah D, Nakayama K, Pagano M, Hershko A. 2003. Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase. *J Biol Chem* 278:25752-7.
- Borras JM, Pinol JL, Izquierdo A, Borras J. 2008. [Analysis of cancer incidence, survival and mortality according to the main tumoral localizations, 1985-2019: Lung cancer]. *Med Clin (Barc)* 131 Suppl 1:53-7.
- Boyer JC, Yamada NA, Roques CN, Hatch SB, Riess K, Farber RA. 2002. Sequence dependent instability of mononucleotide microsatellites in cultured mismatch repair proficient and deficient mammalian cells. *Hum Mol Genet* 11:707-13.
- Bringuier PP, Tamimi Y, Schuurig E, Schalken J. 1996. Expression of cyclin D1 and EMS1 in bladder tumours; relationship with chromosome 11q13 amplification. *Oncogene* 12:1747-53.
- Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B. 1998. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 392:300-3.
- Camps J, Armengol G, del Rey J, Lozano JJ, Vauhkonen H, Prat E, Egozcue J, Sumoy L, Knuutila S, Miro R. 2006. Genome-wide differences between microsatellite stable and unstable colorectal tumors. *Carcinogenesis* 27:419-28.
- Camps J, Grade M, Nguyen QT, Hormann P, Becker S, Hummon AB, Rodriguez V, Chandrasekharappa S, Chen Y, Difilippantonio MJ and others. 2008. Chromosomal breakpoints in primary colon cancer cluster at sites of structural variants in the genome. *Cancer Res* 68:1284-95.
- Castellanos E, Dominguez P, Gonzalez C. 2008. Centrosome dysfunction in *Drosophila* neural stem cells causes tumors that are not due to genome instability. *Curr Biol* 18:1209-14.
- Caussinus E, Gonzalez C. 2005. Induction of tumor growth by altered stem-cell asymmetric division in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet* 37:1125-9.
- Cimini D. 2008. Merotelic kinetochore orientation, aneuploidy, and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1786:32-40.
- Cimini D, Howell B, Maddox P, Khodjakov A, Degrossi F, Salmon ED. 2001. Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells. *J Cell Biol* 153:517-27.
- Cimini D, Wan X, Hirel CB, Salmon ED. 2006. Aurora kinase promotes turnover of kinetochore microtubules to reduce chromosome segregation errors. *Curr Biol* 16:1711-8.
- Cordon-Cardo C. 2008. Molecular alterations associated with bladder cancer initiation and progression. *Scand J Urol Nephrol Suppl*:154-65.
- Coupland SE, Bechrakis N, Schuler A, Anagnostopoulos I, Hummel M, Bornfeld N, Stein H. 1998. Expression patterns of cyclin D1 and related proteins regulating

- G1-S phase transition in uveal melanoma and retinoblastoma. *Br J Ophthalmol* 82:961-70.
- Czerniak B, Li L, Chaturvedi V, Ro JY, Johnston DA, Hodges S, Benedict WF. 2000. Genetic modeling of human urinary bladder carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 27:392-402.
- Chandhok NS, Pellman D. 2009. A little CIN may cost a lot: revisiting aneuploidy and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 19:74-81.
- Chen B, van den Brekel MW, Buschers W, Balm AJ, van Velthuysen ML. 2003. Validation of tissue array technology in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 25:922-30.
- Chow NH, Cairns P, Eisenberger CF, Schoenberg MP, Taylor DC, Epstein JI, Sidransky D. 2000. Papillary urothelial hyperplasia is a clonal precursor to papillary transitional cell bladder cancer. *Int J Cancer* 89:514-8.
- Chow NH, Chan SH, Tzai TS, Ho CL, Liu HS. 2001. Expression profiles of ErbB family receptors and prognosis in primary transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Clin Cancer Res* 7:1957-62.
- Dalbagni G, Presti J, Reuter V, Fair WR, Cordon-Cardo C. 1993. Genetic alterations in bladder cancer. *Lancet* 342:469-71.
- Debatisse M, Coquelle A, Toledo F, Buttin G. 1998. Gene amplification mechanisms: the role of fragile sites. *Recent Results Cancer Res* 154:216-26.
- Dimova DK, Dyson NJ. 2005. The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene* 24:2810-26.
- Doll R, Peto R. 1981. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 66:1191-308.
- Duesberg P. 2007. Chromosomal chaos and cancer. *Sci Am* 296:52-9.
- Dyrskjot L, Thykjaer T, Kruhoffer M, Jensen JL, Marcussen N, Hamilton-Dutoit S, Wolf H, Orntoft TF. 2003. Identifying distinct classes of bladder carcinoma using microarrays. *Nat Genet* 33:90-6.
- Eble J.N. SG, Epstein J.I., Sesterhenn I.A. 2004. Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Lyon.
- El-Hakim A, Smith AD, Weiss G. 2004. Patients with bladder and lung cancer: a long-term outcome analysis. *BJU Int* 93:1225-7.
- Engeland A, Borge T, Haldorsen T, Tretli S. 1997. Use of multiple primary cancers to indicate associations between smoking and cancer incidence: an analysis of 500,000 cancer cases diagnosed in Norway during 1953-93. *Int J Cancer* 70:401-7.
- Fadl-Elmula I. 2005. Chromosomal changes in uroepithelial carcinomas. *Cell Chromosome* 4:1.
- Feber A, Clark J, Goodwin G, Dodson AR, Smith PH, Fletcher A, Edwards S, Flohr P, Falconer A, Roe T and others. 2004. Amplification and overexpression of E2F3 in human bladder cancer. *Oncogene* 23:1627-30.
- Feinberg AP, Tycko B. 2004. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 4:143-53.
- Florl AR, Schulz WA. 2008. Chromosomal instability in bladder cancer. *Arch Toxicol* 82:173-82.

- Friedrich MG, Blind C, Milde-Langosch K, Erbersdobler A, Conrad S, Loning T, Hammerer P, Huland H. 2001. Frequent p16/MTS1 inactivation in early stages of urothelial carcinoma of the bladder is not associated with tumor recurrence. *Eur Urol* 40:518-24.
- Frolov MV, Huen DS, Stevaux O, Dimova D, Balczarek-Strang K, Elsdon M, Dyson NJ. 2001. Functional antagonism between E2F family members. *Genes Dev* 15:2146-60.
- Fujiwara T, Bandi M, Nitta M, Ivanova EV, Bronson RT, Pellman D. 2005. Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature* 437:1043-7.
- Fukasawa K. 2007. Oncogenes and tumour suppressors take on centrosomes. *Nat Rev Cancer* 7:911-24.
- Ganem NJ, Godinho SA, Pellman D. 2009. A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature* 460:278-82.
- Ganoth D, Bornstein G, Ko TK, Larsen B, Tyers M, Pagano M, Hershko A. 2001. The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCF(Skp2)-mediated ubiquitinylation of p27. *Nat Cell Biol* 3:321-4.
- Gascoigne KE, Taylor SS. 2008. Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimetabolic drugs. *Cancer Cell* 14:111-22.
- Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* 11:4241-57.
- Geigl JB, Langer S, Barwisch S, Pflieger K, Lederer G, Speicher MR. 2004. Analysis of gene expression patterns and chromosomal changes associated with aging. *Cancer Res* 64:8550-7.
- Geigl JB, Obenauf AC, Schwarzbraun T, Speicher MR. 2008. Defining 'chromosomal instability'. *Trends Genet* 24:64-9.
- George B, Datar RH, Wu L, Cai J, Patten N, Beil SJ, Groshen S, Stein J, Skinner D, Jones PA and others. 2007. p53 gene and protein status: the role of p53 alterations in predicting outcome in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol* 25:5352-8.
- Gisselsson D, Hoglund M. 2005. Connecting mitotic instability and chromosome aberrations in cancer--can telomeres bridge the gap? *Semin Cancer Biol* 15:13-23.
- Goldman R, Shields PG. 2003. Food mutagens. *J Nutr* 133 Suppl 3:965S-973S.
- Gonzalez C. 2008. Centrosome function during stem cell division: the devil is in the details. *Curr Opin Cell Biol* 20:694-8.
- Gonzalvo ML, Hayashida T, Bender CM, Pao MM, Tsai YC, Gonzales FA, Nguyen HD, Nguyen TT, Jones PA. 1998. The role of DNA methylation in expression of the p19/p16 locus in human bladder cancer cell lines. *Cancer Res* 58:1245-52.
- Grana X, Reddy EP. 1995. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* 11:211-9.
- Habuchi T, Takahashi T, Kakinuma H, Wang L, Tsuchiya N, Satoh S, Akao T, Sato K, Ogawa O, Knowles MA and others. 2001. Hypermethylation at 9q32-33 tumour

- suppressor region is age-related in normal urothelium and an early and frequent alteration in bladder cancer. *Oncogene* 20:531-7.
- Hanahan D, Folkman J. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86:353-64.
- Hanks S, Coleman K, Reid S, Plaja A, Firth H, Fitzpatrick D, Kidd A, Mehes K, Nash R, Robin N and others. 2004. Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in BUB1B. *Nat Genet* 36:1159-61.
- Hastings PJ, Lupski JR, Rosenberg SM, Ira G. 2009. Mechanisms of change in gene copy number. *Nat Rev Genet* 10:551-64.
- He Y, Armanious MK, Thomas MJ, Cress WD. 2000. Identification of E2F-3B, an alternative form of E2F-3 lacking a conserved N-terminal region. *Oncogene* 19:3422-33.
- Hecht SS. 1999. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 91:1194-210.
- Heidenblad M, Lindgren D, Jonson T, Liedberg F, Veerla S, Chebil G, Gudjonsson S, Borg A, Mansson W, Hoglund M. 2008. Tiling resolution array CGH and high density expression profiling of urothelial carcinomas delineate genomic amplicons and candidate target genes specific for advanced tumors. *BMC Med Genomics* 1:3.
- Hengst L, Reed SI. 1996. Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science* 271:1861-4.
- Hershko D, Bornstein G, Ben-Izhak O, Carrano A, Pagano M, Krausz MM, Hershko A. 2001. Inverse relation between levels of p27(Kip1) and of its ubiquitin ligase subunit Skp2 in colorectal carcinomas. *Cancer* 91:1745-51.
- Hershko DD. 2008. Oncogenic properties and prognostic implications of the ubiquitin ligase Skp2 in cancer. *Cancer* 112:1415-24.
- Hopman AH, Kamps MA, Speel EJ, Schapers RF, Sauter G, Ramaekers FC. 2002. Identification of chromosome 9 alterations and p53 accumulation in isolated carcinoma in situ of the urinary bladder versus carcinoma in situ associated with carcinoma. *Am J Pathol* 161:1119-25.
- Hoque MO, Lee CC, Cairns P, Schoenberg M, Sidransky D. 2003. Genome-wide genetic characterization of bladder cancer: a comparison of high-density single-nucleotide polymorphism arrays and PCR-based microsatellite analysis. *Cancer Res* 63:2216-22.
- Hui R, Campbell DH, Lee CS, McCaul K, Horsfall DJ, Musgrove EA, Daly RJ, Seshadri R, Sutherland RL. 1997. EMS1 amplification can occur independently of CCND1 or INT-2 amplification at 11q13 and may identify different phenotypes in primary breast cancer. *Oncogene* 15:1617-23.
- Hurst CD, Fiegler H, Carr P, Williams S, Carter NP, Knowles MA. 2004. High-resolution analysis of genomic copy number alterations in bladder cancer by microarray-based comparative genomic hybridization. *Oncogene* 23:2250-63.
- Hurst CD, Tomlinson DC, Williams SV, Platt FM, Knowles MA. 2008. Inactivation of the Rb pathway and overexpression of both isoforms of E2F3 are obligate events in bladder tumours with 6p22 amplification. *Oncogene* 27:2716-27.

- Inui N, Kitagawa K, Miwa S, Hattori T, Chida K, Nakamura H, Kitagawa M. 2003. High expression of Cks1 in human non-small cell lung carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* 303:978-84.
- Ioachim E. 2008. Expression patterns of cyclins D1, E and cyclin-dependent kinase inhibitors p21waf1/cip1, p27kip1 in colorectal carcinoma: correlation with other cell cycle regulators (pRb, p53 and Ki-67 and PCNA) and clinicopathological features. *Int J Clin Pract* 62:1736-43.
- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. 1993. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363:558-61.
- Ishida N, Hara T, Kamura T, Yoshida M, Nakayama K, Nakayama KI. 2002. Phosphorylation of p27Kip1 on serine 10 is required for its binding to CRM1 and nuclear export. *J Biol Chem* 277:14355-8.
- Ishida N, Kitagawa M, Hatakeyama S, Nakayama K. 2000. Phosphorylation at serine 10, a major phosphorylation site of p27(Kip1), increases its protein stability. *J Biol Chem* 275:25146-54.
- Jacobs PA, Brunton M, Court Brown WM, Doll R, Goldstein H. 1963. Change of human chromosome count distribution with age: evidence for a sex differences. *Nature* 197:1080-1.
- Jebar AH, Hurst CD, Tomlinson DC, Johnston C, Taylor CF, Knowles MA. 2005. FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene* 24:5218-25.
- Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ. 2004. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 54:8-29.
- Jin C, Jin Y, Gisselsson D, Wennerberg J, Wah TS, Stromback B, Kwong YL, Mertens F. 2006. Molecular cytogenetic characterization of the 11q13 amplicon in head and neck squamous cell carcinoma. *Cytogenet Genome Res* 115:99-106.
- Jin Y, Hoglund M, Jin C, Martins C, Wennerberg J, Akervall J, Mandahl N, Mitelman F, Mertens F. 1998. FISH characterization of head and neck carcinomas reveals that amplification of band 11q13 is associated with deletion of distal 11q. *Genes Chromosomes Cancer* 22:312-20.
- Jin Y, Stewenius Y, Lindgren D, Frigyesi A, Calcagnile O, Jonson T, Edqvist A, Larsson N, Lundberg LM, Chebil G and others. 2007. Distinct mitotic segregation errors mediate chromosomal instability in aggressive urothelial cancers. *Clin Cancer Res* 13:1703-12.
- Johansson B, Mertens F, Mitelman F. 1996. Primary vs. secondary neoplasia-associated chromosomal abnormalities--balanced rearrangements vs. genomic imbalances? *Genes Chromosomes Cancer* 16:155-63.
- Junker K, van Oers JM, Zwarthoff EC, Kania I, Schubert J, Hartmann A. 2008. Fibroblast growth factor receptor 3 mutations in bladder tumors correlate with low frequency of chromosome alterations. *Neoplasia* 10:1-7.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Citro G, Sauter G, DeVries S, Kerschmann R, Carroll P, Waldman F. 1995. Identification of gains and losses of DNA sequences in primary bladder cancer by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 12:213-9.

- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. 1992. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258:818-21.
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D. 1994. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 10:231-43.
- Kantor AF, McLaughlin JK. 1985. Second cancer following cancer of the urinary system in Connecticut, 1935-82. *Natl Cancer Inst Monogr* 68:149-59.
- Kawakami K, Enokida H, Tachiwada T, Nishiyama K, Seki N, Nakagawa M. 2007. Increased SKP2 and CKS1 gene expression contributes to the progression of human urothelial carcinoma. *J Urol* 178:301-7.
- Kim WJ, Bae SC. 2008. Molecular biomarkers in urothelial bladder cancer. *Cancer Sci* 99:646-52.
- King RW. 2008. When 2+2=5: the origins and fates of aneuploid and tetraploid cells. *Biochim Biophys Acta* 1786:4-14.
- Kinzler K, Vogelstein B. 2002. *The genetic basis of human cancer*. edn 2 ed. Toronto: McGraw-Hill. 3-821 p.
- Knowles MA. 1998. Molecular genetics of bladder cancer: pathways of development and progression. *Cancer Surv* 31:49-76.
- Knowles MA. 2001. What we could do now: molecular pathology of bladder cancer. *Mol Pathol* 54:215-21.
- Knowles MA. 2008. Molecular pathogenesis of bladder cancer. *Int J Clin Oncol* 13:287-97.
- Knowlton AL, Lan W, Stukenberg PT. 2006. Aurora B is enriched at merotelic attachment sites, where it regulates MCAK. *Curr Biol* 16:1705-10.
- Koo SH, Kwon KC, Ihm CH, Jeon YM, Park JW, Sul CK. 1999. Detection of genetic alterations in bladder tumors by comparative genomic hybridization and cytogenetic analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 110:87-93.
- Kruger S, Mess F, Bohle A, Feller AC. 2003. Numerical aberrations of chromosome 17 and the 9p21 locus are independent predictors of tumor recurrence in non-invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Int J Oncol* 23:41-8.
- Kuper H, Boffeta P, Adami HO. 2002. Tobacco use and cancer causation: association by tumour type. *J Intern Med* 252:206-24.
- Kuttler F, Mai S. 2007. Formation of non-random extrachromosomal elements during development, differentiation and oncogenesis. *Semin Cancer Biol* 17:56-64.
- Langner C, von Wasielewski R, Ratschek M, Rehak P, Zigeuner R. 2004. Expression of p27 and its ubiquitin ligase subunit Skp2 in upper urinary tract transitional cell carcinoma. *Urology* 64:611-6.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396:643-9.
- Leone G, DeGregori J, Yan Z, Jakoi L, Ishida S, Williams RS, Nevins JR. 1998. E2F3 activity is regulated during the cell cycle and is required for the induction of S phase. *Genes Dev* 12:2120-30.

- Leone G, Nuckolls F, Ishida S, Adams M, Sears R, Jakoi L, Miron A, Nevins JR. 2000. Identification of a novel E2F3 product suggests a mechanism for determining specificity of repression by Rb proteins. *Mol Cell Biol* 20:3626-32.
- Levi F. 1999. Cancer prevention: epidemiology and perspectives. *Eur J Cancer* 35:1912-24.
- Lim G, Karaskova J, Beheshti B, Vukovic B, Bayani J, Selvarajah S, Watson SK, Lam WL, Zielenska M, Squire JA. 2005. An integrated mBAND and submegabase resolution tiling set (SMRT) CGH array analysis of focal amplification, microdeletions, and ladder structures consistent with breakage-fusion-bridge cycle events in osteosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 42:392-403.
- Masuda TA, Inoue H, Sonoda H, Mine S, Yoshikawa Y, Nakayama K, Nakayama K, Mori M. 2002. Clinical and biological significance of S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2) gene expression in gastric carcinoma: modulation of malignant phenotype by Skp2 overexpression, possibly via p27 proteolysis. *Cancer Res* 62:3819-25.
- Mathers MJ, Zumbo J, Wyler S, Roth S, Gerken M, Hofstadter F, Klotz T. 2008. Is there evidence for a multidisciplinary follow-up after urological cancer? An evaluation of subsequent cancers. *World J Urol* 26:251-6.
- Matsumura Y, Ananthaswamy HN. 2004. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol* 195:298-308.
- Maucuer A, Ozon S, Manceau V, Gavet O, Lawler S, Curmi P, Sobel A. 1997. KIS is a protein kinase with an RNA recognition motif. *J Biol Chem* 272:23151-6.
- Mellon K, Wright C, Kelly P, Horne CH, Neal DE. 1995. Long-term outcome related to epidermal growth factor receptor status in bladder cancer. *J Urol* 153:919-25.
- Mhaweck-Fauceglia P, Cheney RT, Schwaller J. 2006. Genetic alterations in urothelial bladder carcinoma: an updated review. *Cancer* 106:1205-16.
- Mhaweck P, Greloz V, Oppikofer C, Szalay-Quinodoz I, Herrmann F. 2004. Expression of cell cycle proteins in T1a and T1b urothelial bladder carcinoma and their value in predicting tumor progression. *Cancer* 100:2367-75.
- Mitelman F. 2008. www.Mitelmansdatabase.org.
- Miyazaki K, Satoh H, Kagohashi K, Kurishima K, Ishikawa H, Ohtsuka M, Sekizawa K. 2008. Lung cancer patients with previous or simultaneous urologic cancers. *Med Oncol* 25:443-6.
- Montagnoli A, Fiore F, Eytan E, Carrano AC, Draetta GF, Hershko A, Pagano M. 1999. Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes Dev* 13:1181-9.
- Morales C, Garcia MJ, Ribas M, Miro R, Munoz M, Caldas C, Peinado MA. 2009. Dihydrofolate reductase amplification and sensitization to methotrexate of methotrexate-resistant colon cancer cells. *Mol Cancer Ther* 8:424-32.
- Morgan DO. 1995. Principles of CDK regulation. *Nature* 374:131-4.
- Mostofi, Sorbin, Torloni. 1973. Histological typing of urinary bladder tumors. International histological classification of tumors. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Motokura T, Arnold A. 1993. Cyclin D and oncogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 3:5-10.
- Musacchio A, Salmon ED. 2007. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:379-93.

- Mydlo JH, Agins JA, Donohoe J, Grob BM. 2001. A review of urologic cancer patients with multiple primary malignancies. *World J Urol* 19:240-3.
- Mydlo JH, Gerstein M. 2001. Patients with urologic cancer and other nonurologic malignancies: analysis of a sample and review of the literature. *Urology* 58:864-9.
- Nakamura H, Saji H, Idiris A, Kawasaki N, Hosaka M, Ogata A, Saijo T, Kato H. 2003. Chromosomal instability detected by fluorescence in situ hybridization in surgical specimens of non-small cell lung cancer is associated with poor survival. *Clin Cancer Res* 9:2294-9.
- Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA, Matsumoto M, Nakamichi I, Kitagawa K, Shirane M, Tsunematsu R, Tsukiyama T, Ishida N and others. 2000. Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. *Embo J* 19:2069-81.
- Namazie A, Alavi S, Olopade OI, Pauletti G, Aghamohammadi N, Aghamohammadi M, Gornbein JA, Calcaterra TC, Slamon DJ, Wang MB and others. 2002. Cyclin D1 amplification and p16(MTS1/CDK4I) deletion correlate with poor prognosis in head and neck tumors. *Laryngoscope* 112:472-81.
- Narayanan V, Mieczkowski PA, Kim HM, Petes TD, Lobachev KS. 2006. The pattern of gene amplification is determined by the chromosomal location of hairpin-capped breaks. *Cell* 125:1283-96.
- Nelsen CJ, Kuriyama R, Hirsch B, Negron VC, Lingle WL, Goggin MM, Stanley MW, Albrecht JH. 2005. Short term cyclin D1 overexpression induces centrosome amplification, mitotic spindle abnormalities, and aneuploidy. *J Biol Chem* 280:768-76.
- Nigg EA. 2002. Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat Rev Cancer* 2:815-25.
- Nishiyama H, Takahashi T, Kakehi Y, Habuchi T, Knowles MA. 1999. Homozygous deletion at the 9q32-33 candidate tumor suppressor locus in primary human bladder cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 26:171-5.
- Nocito A, Kononen J, Kallioniemi OP, Sauter G. 2001. Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research. *Int J Cancer* 94:1-5.
- Oeggerli M, Tomovska S, Schraml P, Calvano-Forte D, Schafroth S, Simon R, Gasser T, Mihatsch MJ, Sauter G. 2004. E2F3 amplification and overexpression is associated with invasive tumor growth and rapid tumor cell proliferation in urinary bladder cancer. *Oncogene* 23:5616-23.
- Orenes-Pinero E, Barderas R, Rico D, Casal JI, Gonzalez-Pisano D, Navajo J, Algaba F, Piulats JM, Sanchez-Carbayo M. Serum and tissue profiling in bladder cancer combining protein and tissue arrays. *J Proteome Res* 9:164-73.
- Orlow I, Lacombe L, Hannon GJ, Serrano M, Pellicer I, Dalbagni G, Reuter VE, Zhang ZF, Beach D, Cordon-Cardo C. 1995. Deletion of the p16 and p15 genes in human bladder tumors. *J Natl Cancer Inst* 87:1524-9.
- Ormandy CJ, Musgrove EA, Hui R, Daly RJ, Sutherland RL. 2003. Cyclin D1, EMS1 and 11q13 amplification in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 78:323-35.
- Orntoft TF, Wolf H. 1998. Molecular alterations in bladder cancer. *Urol Res* 26:223-33.
- Pedrazzini E, Mamaev N, Yakovleva T, Sukhikh T, Salido M, Sole F, Prat E, Camps J, Miro R, Slavutsky I. 2003. Genomic rearrangements involving rDNA and

- centromeric heterochromatin in vulvar epidermoid carcinoma cell line A-431. *Cancer Genet Cytogenet* 143:50-8.
- Pihan GA, Purohit A, Wallace J, Knecht H, Woda B, Quesenberry P, Doxsey SJ. 1998. Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res* 58:3974-85.
- Pihan GA, Wallace J, Zhou Y, Doxsey SJ. 2003. Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas. *Cancer Res* 63:1398-404.
- Pinkel D, Albertson DG. 2005. Comparative genomic hybridization. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6:331-54.
- Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y and others. 1998. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 20:207-11.
- Placer J, Espinet B, Salido M, Sole F, Gelabert-Mas A. 2005. Correlation between histologic findings and cytogenetic abnormalities in bladder carcinoma: a FISH study. *Urology* 65:913-8.
- Prat E, Bernues M, Caballin MR, Egozcue J, Gelabert A, Miro R. 2001. Detection of chromosomal imbalances in papillary bladder tumors by comparative genomic hybridization. *Urology* 57:986-92.
- Prat E, Del Rey J, Camps J, Ponsa I, Lloreta J, Egozcue J, Gelabert A, Campillo M, Miro R. 2008. Genomic imbalances in urothelial cancer: intratumor heterogeneity versus multifocality. *Diagn Mol Pathol* 17:134-40.
- Prat E, Rey JD, Ponsa I, Nadal M, Camps J, Plaja A, Campillo M, Algaba F, Gelabert A, Miro R. 2009. Comparative Genomic Hybridization Analysis Reveals New Different Subgroups in Early-Stage Bladder Tumors. *Urology*.
- Primdahl H, Nielsen AL, Larsen S, Andersen E, Ipsen M, Lajer C, Vestermark LW, Andersen LJ, Hansen HS, Overgaard M and others. 2006. Changes from 1992 to 2002 in the pretreatment delay for patients with squamous cell carcinoma of larynx or pharynx: a Danish nationwide survey from DAHANCA. *Acta Oncol* 45:156-61.
- Quintyne NJ, Reing JE, Hoffelder DR, Gollin SM, Saunders WS. 2005. Spindle multipolarity is prevented by centrosomal clustering. *Science* 307:127-9.
- Rajagopalan H, Lengauer C. 2004. Aneuploidy and cancer. *Nature* 432:338-41.
- Rajagopalan H, Nowak MA, Vogelstein B, Lengauer C. 2003. The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 3:695-701.
- Rebacz B, Larsen TO, Clausen MH, Ronnest MH, Loffler H, Ho AD, Kramer A. 2007. Identification of griseofulvin as an inhibitor of centrosomal clustering in a phenotype-based screen. *Cancer Res* 67:6342-50.
- Ribal MJ, Alcaraz A, Mengual L, Carrio A, Lopez-Guillermo A, Mallofre C, Palou J, Gelabert A, Villavicencio H. 2004. Chromosomal high-polysomies predict tumour progression in T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 45:593-9.
- Ricke RM, van Ree JH, van Deursen JM. 2008. Whole chromosome instability and cancer: a complex relationship. *Trends Genet* 24:457-66.

- Richter J, Beffa L, Wagner U, Schraml P, Gasser TC, Moch H, Mihatsch MJ, Sauter G. 1998. Patterns of chromosomal imbalances in advanced urinary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 153:1615-21.
- Richter J, Jiang F, Gorog JP, Sartorius G, Egenter C, Gasser TC, Moch H, Mihatsch MJ, Sauter G. 1997. Marked genetic differences between stage pTa and stage pT1 papillary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 57:2860-4.
- Richter J, Wagner U, Schraml P, Maurer R, Alund G, Knonagel H, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser TC, Sauter G. 1999. Chromosomal imbalances are associated with a high risk of progression in early invasive (pT1) urinary bladder cancer. *Cancer Res* 59:5687-91.
- Rieger-Christ KM, Mourtzinou A, Lee PJ, Zaghera RM, Cain J, Silverman M, Libertino JA, Summerhayes IC. 2003. Identification of fibroblast growth factor receptor 3 mutations in urine sediment DNA samples complements cytology in bladder tumor detection. *Cancer* 98:737-44.
- Rigola MA. 2003. Detecció i identificació de desequilibris cromosòmics constitucionals i adquirits mitjançant l'aplicació de la tècnica d'hibridació genòmica comparada. Bellaterra: Universitat Autònoma de Barcelona.
- Roelofs H, Schuurin E, Wiegant J, Michalides R, Giphart-Gassler M. 1993. Amplification of the 11q13 region in human carcinoma cell lines: a mechanistic view. *Genes Chromosomes Cancer* 7:74-84.
- Roh M, Franco OE, Hayward SW, van der Meer R, Abdulkadir SA. 2008. A role for polyploidy in the tumorigenicity of Pim-1-expressing human prostate and mammary epithelial cells. *PLoS One* 3:e2572.
- Rusthoven KE, Flaig TW, Raben D, Kavanagh BD. 2008. High incidence of lung cancer after non-muscle-invasive transitional cell carcinoma of the bladder: implications for screening trials. *Clin Lung Cancer* 9:106-11.
- Sahai H, Khurshid A. 1993. Confidence intervals for the ratio of two Poisson means. *Math. Sci* 18:43-50.
- Saigusa K, Hashimoto N, Tsuda H, Yokoi S, Maruno M, Yoshimine T, Aoyagi M, Ohno K, Imoto I, Inazawa J. 2005. Overexpressed Skp2 within 5p amplification detected by array-based comparative genomic hybridization is associated with poor prognosis of glioblastomas. *Cancer Sci* 96:676-83.
- Salminen E, Pukkala E, Teppo L. 1994. Bladder cancer and the risk of smoking-related cancers during followup. *J Urol* 152:1420-3.
- Samanic C, Kogevinas M, Dosemeci M, Malats N, Real FX, Garcia-Closas M, Serra C, Carrato A, Garcia-Closas R, Sala M and others. 2006. Smoking and bladder cancer in Spain: effects of tobacco type, timing, environmental tobacco smoke, and gender. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15:1348-54.
- Sanchez-Carbayo M, Cordon-Cardo C. 2007. Molecular alterations associated with bladder cancer progression. *Semin Oncol* 34:75-84.
- Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Lozano JJ, Haab BB, Cordon-Cardo C. 2006. Profiling bladder cancer using targeted antibody arrays. *Am J Pathol* 168:93-103.
- Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Lozano JJ, Li W, Charytonowicz E, Belbin TJ, Prystowsky MB, Ortiz AR, Childs G, Cordon-Cardo C. 2003. Gene discovery in bladder cancer progression using cDNA microarrays. *Am J Pathol* 163:505-16.

- Sandberg AA, Berger CS. 1994. Review of chromosome studies in urological tumors. II. Cytogenetics and molecular genetics of bladder cancer. *J Urol* 151:545-60.
- Sauter G, Algaba F, Amin M, Busch C, Chevillet J, Gasser T, Grignon DJ, Hostädter F, Lopez-Beltran A, Epstein JI. 2004. Non Invasive urothelial neoplasias. WHO classification of non invasive papillary urothelial tumors. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn I, editors. World Health organisation classification of tumors. Pathology and genetics: tumors of the urinary system and male genital organs. Lyon: IARC. 90-150 p.
- Schraml P, Bucher C, Bissig H, Nocito A, Haas P, Wilber K, Seelig S, Kononen J, Mihatsch MJ, Dirnhofer S and others. 2003. Cyclin E overexpression and amplification in human tumours. *J Pathol* 200:375-82.
- Schwab M. 1998. Amplification of oncogenes in human cancer cells. *Bioessays* 20:473-9.
- Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Maner S, Massa H, Walker M, Chi M and others. 2004. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 305:525-8.
- Seeliger MA, Breward SE, Friedler A, Schon O, Itzhaki LS. 2003. Cooperative organization in a macromolecular complex. *Nat Struct Biol* 10:718-24.
- Sgambato A, Migaldi M, Faraglia B, De Aloysio G, Ferrari P, Ardito R, De Gaetani C, Capelli G, Cittadini A, Trentini GP. 2002. Cyclin D1 expression in papillary superficial bladder cancer: its association with other cell cycle-associated proteins, cell proliferation and clinical outcome. *Int J Cancer* 97:671-8.
- Shapira M, Ben-Izhak O, Linn S, Futerman B, Minkov I, Hershko DD. 2005. The prognostic impact of the ubiquitin ligase subunits Skp2 and Cks1 in colorectal carcinoma. *Cancer* 103:1336-46.
- Sherr CJ, Roberts JM. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13:1501-12.
- Shi B, Zhang K, Zhang J, Chen J, Zhang N, Xu Z. 2008. Relationship between patient age and superficial transitional cell carcinoma characteristics. *Urology* 71:1186-90.
- Shih Ie M, Wang TL. 2005. Apply innovative technologies to explore cancer genome. *Curr Opin Oncol* 17:33-8.
- Shin KY, Kong G, Kim WS, Lee TY, Woo YN, Lee JD. 1997. Overexpression of cyclin D1 correlates with early recurrence in superficial bladder cancers. *Br J Cancer* 75:1788-92.
- Simon R, Burger H, Semjonow A, Hertle L, Terpe HJ, Bocker W. 2000. Patterns of chromosomal imbalances in muscle invasive bladder cancer. *Int J Oncol* 17:1025-9.
- Singer MJ, Mesner LD, Friedman CL, Trask BJ, Hamlin JL. 2000. Amplification of the human dihydrofolate reductase gene via double minutes is initiated by chromosome breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7921-6.
- Singh A, Kinoshita Y, Rovito PM, Jr., Landas S, Silberstein J, Nsouli I, Wang CY, Haas GP. 2008. Higher than expected association of clinical prostate and bladder cancers. *J Urol* 179:S2-5.

- Sitry D, Seeliger MA, Ko TK, Ganoth D, Breward SE, Itzhaki LS, Pagano M, Hershko A. 2002. Three different binding sites of Cks1 are required for p27-ubiquitin ligation. *J Biol Chem* 277:42233-40.
- Skov T, Sprogel P, Engholm G, Frolund C. 1991. Cancer of the lung and urinary bladder in Denmark, 1943-87: a cohort analysis. *Cancer Causes Control* 2:365-9.
- Speicher MR, Carter NP. 2005. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet* 6:782-92.
- Sporn MB. 1996. The war on cancer. *Lancet* 347:1377-81.
- Spruck C, Strohmaier H, Watson M, Smith AP, Ryan A, Krek TW, Reed SI. 2001. A CDK-independent function of mammalian Cks1: targeting of SCF(Skp2) to the CDK inhibitor p27Kip1. *Mol Cell* 7:639-50.
- Stevens C, La Thangue NB. 2004. The emerging role of E2F-1 in the DNA damage response and checkpoint control. *DNA Repair (Amst)* 3:1071-9.
- Storchova Z, Pellman D. 2004. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:45-54.
- Strope SA, Montie JE. 2008. The causal role of cigarette smoking in bladder cancer initiation and progression, and the role of urologists in smoking cessation. *J Urol* 180:31-7; discussion 37.
- Sutterluty H, Chatelain E, Marti A, Wirbelauer C, Senften M, Muller U, Krek W. 1999. p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells. *Nat Cell Biol* 1:207-14.
- Tanaka H, Yao MC. 2009. Palindromic gene amplification--an evolutionarily conserved role for DNA inverted repeats in the genome. *Nat Rev Cancer* 9:216-24.
- Thompson SL, Compton DA. 2008. Examining the link between chromosomal instability and aneuploidy in human cells. *J Cell Biol* 180:665-72.
- Tighe A, Johnson VL, Albertella M, Taylor SS. 2001. Aneuploid colon cancer cells have a robust spindle checkpoint. *EMBO Rep* 2:609-14.
- Torres EM, Sokolsky T, Tucker CM, Chan LY, Boselli M, Dunham MJ, Amon A. 2007. Effects of aneuploidy on cellular physiology and cell division in haploid yeast. *Science* 317:916-24.
- Trimarchi JM, Lees JA. 2002. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:11-20.
- Tut VM, Braithwaite KL, Angus B, Neal DE, Lunec J, Mellon JK. 2001. Cyclin D1 expression in transitional cell carcinoma of the bladder: correlation with p53, waf1, pRb and Ki67. *Br J Cancer* 84:270-5.
- Tzai TS, Chen HH, Chan SH, Ho CL, Tsai YS, Cheng HL, Dai YC, Lin JS, Yang WH, Chow NH. 2003. Clinical significance of allelotyping for urothelial carcinoma. *Urology* 62:378-84.
- Vainrib M, Leibovitch I. 2007. Urological implications of concurrent bladder and lung cancer. *Isr Med Assoc J* 9:732-5.
- Valent A, Benard J, Clause B, Barrois M, Valteau-Couanet D, Terrier-Lacombe MJ, Spengler B, Bernheim A. 2001. In vivo elimination of acentric double minutes containing amplified MYCN from neuroblastoma tumor cells through the formation of micronuclei. *Am J Pathol* 158:1579-84.

- Vaziri H, Benchimol S. 1998. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol* 8:279-82.
- Veltman JA, Fridlyand J, Pejavar S, Olshen AB, Korkola JE, DeVries S, Carroll P, Kuo WL, Pinkel D, Albertson D and others. 2003. Array-based comparative genomic hybridization for genome-wide screening of DNA copy number in bladder tumors. *Cancer Res* 63:2872-80.
- Wang DS, Rieger-Christ K, Latini JM, Moinzadeh A, Stoffel J, Pezza JA, Saini K, Libertino JA, Summerhayes IC. 2000. Molecular analysis of PTEN and MXI1 in primary bladder carcinoma. *Int J Cancer* 88:620-5.
- Wang H, Bauzon F, Ji P, Xu X, Sun D, Locker J, Sellers RS, Nakayama K, Nakayama KI, Cobrinik D and others. Skp2 is required for survival of aberrantly proliferating Rb1-deficient cells and for tumorigenesis in Rb1^{+/-} mice. *Nat Genet* 42:83-8.
- Wang XC, Tian LL, Tian J, Wu HL, Meng AM. 2009. Overexpression of Cks1 is associated with poor survival by inhibiting apoptosis in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 135:1393-401.
- Watters AD, Latif Z, Forsyth A, Dunn I, Underwood MA, Grigor KM, Bartlett JM. 2002. Genetic aberrations of c-myc and CCND1 in the development of invasive bladder cancer. *Br J Cancer* 87:654-8.
- Weinberg RA. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81:323-30.
- Williams SV, Sibley KD, Davies AM, Nishiyama H, Hornigold N, Coulter J, Kennedy WJ, Skilleter A, Habuchi T, Knowles MA. 2002. Molecular genetic analysis of chromosome 9 candidate tumor-suppressor loci in bladder cancer cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 34:86-96.
- Woerner SM, Benner A, Sutter C, Schiller M, Yuan YP, Keller G, Bork P, Doeberitz MK, Gebert JF. 2003. Pathogenesis of DNA repair-deficient cancers: a statistical meta-analysis of putative Real Common Target genes. *Oncogene* 22:2226-35.
- Wright WE, Pereira-Smith OM, Shay JW. 1989. Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol* 9:3088-92.
- Wu XR. 2005. Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nat Rev Cancer* 5:713-25.
- Yamamoto Y, Matsuyama H, Kawauchi S, Furuya T, Liu XP, Ikemoto K, Oga A, Naito K, Sasaki K. 2006. Biological characteristics in bladder cancer depend on the type of genetic instability. *Clin Cancer Res* 12:2752-8.
- Yokoi S, Yasui K, Mori M, Iizasa T, Fujisawa T, Inazawa J. 2004. Amplification and overexpression of SKP2 are associated with metastasis of non-small-cell lung cancers to lymph nodes. *Am J Pathol* 165:175-80.
- Zaharieva BM, Simon R, Diener PA, Ackermann D, Maurer R, Alund G, Knonagel H, Rist M, Wilber K, Hering F and others. 2003. High-throughput tissue microarray analysis of 11q13 gene amplification (CCND1, FGF3, FGF4, EMS1) in urinary bladder cancer. *J Pathol* 201:603-8.
- Zhao J, Richter J, Wagner U, Roth B, Schraml P, Zellweger T, Ackermann D, Schmid U, Moch H, Mihatsch MJ and others. 1999. Chromosomal imbalances in noninvasive papillary bladder neoplasms (pTa). *Cancer Res* 59:4658-61.

Zhao X, Li C, Paez JG, Chin K, Janne PA, Chen TH, Girard L, Minna J, Christiani D, Leo C and others. 2004. An integrated view of copy number and allelic alterations in the cancer genome using single nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Res* 64:3060-71.

