

ESTUDI DELS DESEQUILIBRIS CROMOSÒMICS EN TUMORS SÒLIDS EPITELIALS ESPORÀDICS I FAMILIARS.

Memòria presentada per

Esther Prat i Pedrola

Per optar al títol de

Doctora en Biologia

Tesi realitzada sota la direcció de

Dra. Rosa Miró Ametller

Dr. Antoni Gelabert Mas

al Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia.
Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Rosa Miró Ametller

Antoni Gelabert Mas

Esther Prat Pedrola

Bellaterra, desembre de 2005

Al Tomás

Al Pol

Als meus pares

A la Balbi

Els estudis que constitueixen la base d'aquesta tesi doctoral s'han realitzat amb el suport d'una beca per part de l'Institut Municipal d'Investigacions Mèdiques a Esther Prat i Pedrola entre els anys 1999-2003. A més a més també ha gaudit d'un ajut per part de "Laboratorios INDAS" entre els anys 2004-2005.

El treball ha estat finançat pels següents projectes d'investigació:

SAF 96/117

FIS 00/0735

FIS G03/174

FIS PI020263

Fundació La Marató de TV3

CIRIT 2001 SGR-00201

ÍNDEX

	I
<i>ÍNDIX</i>	I
Abreviatures	V
Articles inclosos	VII
Relació de taules	IX
Relació de figures	XI
<u>INTRODUCCIÓ</u>	1
1. INTRODUCCIÓ GENERAL	3
2. CÀNCER DE BUFETA	5
2.1 GENERALITATS	5
2.2 TIPUS CEL·LULARS	7
2.3 PATRÓ DE CREIXEMENT	8
2.4 CLASSIFICACIÓ HISTOPATOLÒGICA	8
2.5 CARACTERÍSTIQUES CLÍNICO-PATOLÒGIQUES	10
2.5.1 Diagnòstic i tractament	10
2.5.2 Factors de pronòstic clínic	11
2.6 MULTIFOCALITAT EN EL CÀNCER D'UROTÈLI	12
2.7 GENÈTICA DELS TUMORS UROTÈLIALS	15
2.7.1 Estudis citogenètics	15
2.7.2 Estudis moleculars	25
2.8 MODELS DE PROGRESSIÓ DELS TUMORS DE BUFETA	32
3. CÀNCER RENAL	38
3.1 GENERALITATS	38
3.2 TIPUS CEL·LULARS	39
3.3 PATRÓ DE CREIXEMENT	40
3.4 CLASSIFICACIÓ DELS TUMORS RENALS	40
3.5 CLASSIFICACIÓ HISTOPATOLÒGICA	42
3.6 GENÈTICA DELS TUMORS RENALS	44
3.7 CARCINOMA RENAL DE TIPUS FAMILIAR O HEREDITARI	48
3.7.1 Carcinoma renal papil·lar hereditari	49
4. CÀNCER COLORECTAL	51
4.1 GENERALITATS	51

4.2 CLASSIFICACCIÓ I ESTADIS DEL CÀNCER COLORECTAL	52
4.3 SÍNDROMES HEREDITARIS: UNA BASE PER A LA COMPRESIÓ DEL CÀNCER COLORECTAL	55
4.4 VIES DE PROGRESSIÓ DEL CÀNCER COLORECTAL	57
4.5 CITOGENÈTICA DEL CÀNCER COLORECTAL	61
<i>PREMISSA I OBJECTIUS</i>	65
<i>MATERIAL I MÈTODES</i>	69
1 MOSTRES	71
2 TÈCNiques	80
2.1 EXTRACCIÓ DE DNA	80
2.1.1 Extracció de DNA de teixit congelat	80
2.1.2 Extracció de DNA de teixit parafinat	85
2.2 QUANTIFICACIÓ DEL DNA	88
2.2.1 Gels d'agarosa	88
2.2.2 Fluorimetria	92
2.3 HIBRIDACIÓ GENÒMICA COMPARADA (CGH)	95
2.4 HIBRIDACIÓ <i>IN SITU</i> FLUORESCENT (FISH)	105
2.4.1 Sondes locus específiques i sondes centromèriques	105
2.5 COMBINACIÓ DE LA TINCIÓ AMB BLAU DE TOLUÏDINA I FISH	111
2.6 TÈCNiques DE CULTIU CEL·LULAR I BANDEIG CROMOSÒMIC	113
2.6.1 Cultiu cel·lular	113
2.6.1.1 Cultiu de tumors primaris	113
2.6.2 Bandeig cromosòmic: bandes G	115
2.7 NOMENCLATURA	118
<i>RESULTATS</i>	119
Treball- 1	121
Treball- 2	131
Treball- 3	137
Treball- 4	163
Treball- 5	185
Treball- 6	193
<i>DISCUSSIÓ</i>	203
1. ALGUNES CONSIDERACIONS SOBRE LA TÈCNICA DE CGH	205
2. ALTERACIONS GENÒMIQUES EN TUMORS UROTELIALS	207
Dany genòmic i estadis tumorals	208

Alteracions més freqüents. Alteracions diferencials entre estadis tumorals	209
Amplificacions gèniques	215
11q13 i ciclina D1	216
Delecions en homozigosi	217
3. TUMORS UROTELIALS SUPERFICIALS O D'INVASIÓ MÍNIMA: TA vs T1	218
Diferències quantitatives segons estadis i graus tumorals	218
Diferències quantitatives i qualitatives: subtipus dins dels tumors superficials	219
4. TUMORS SINCRÒNICS: CLONALITAT I VIES D'EVOLUCIÓ	223
Relació clonal	225
Vies d'evolució	227
5. TUMORS RENALS PAPIL·LARS DE TIPUS FAMILIAR. MULTIPLES TUMORS I PATRONS D'EVOLUCIÓ COMUNS	229
<i>MET</i> : duplicació de l'al·lel mutat i duplicació de l'al·lel normal	229
Coincidència en el patró d'alteracions citogenètiques. patrons d'evolució comuns	231
6. VIES D'EVOLUCIÓ GENÈTICA COMUNS EN TUMORS DE PACIENTS AFECTATS DE POLIPOSI ADENOMATOSA FAMILIAR	232
<u>CONCLUSIONS</u>	239
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	243
<u>AGRAÏMENTS</u>	273

ABREVIATURES

A	adenina
B	bufeta
BCG	immunoteràpia intravesical amb el <u>B</u> acil <u>C</u> almette- <u>G</u> uérin
BDC	carcinoma de túbuls col·lectors o ducte de Bellini (<i>Bellini duct carcinoma</i>)
BFB	cicles de trencament-fusió-pont (<i>breakage-fusion-bridge</i>)
BrEt	bromur d'etidi
BMN	biòpsia múltiple normalitzada
Cat	catàleg
CEIC	comitè ètic i d'investigació clínica
cenM-FISH	hibridació <i>in situ</i> fluorescent multiplex centromèrica
CEP	sondes centromèriques (<i>chromosome enumeration probe</i>)
CGH	hibridació genòmica comparada (<i>comparative genomic hybridization</i>)
CIN	inestabilitat cromosòmica (<i>chromosome instability</i>)
CIS	carcinoma <i>in situ</i>
CO ₂	hidròxid de carboni
DAPI	4'6-diamidin-2-fenilindol
dATP	desoxiadenina-5'-trifosfat
dCTP	desoxicitosina-5'-trifosfat
DEMEM	dulbecco's modified eagle medium
dGTP	desoxiguanina-5'-trifosfat
DNA	àcid desoxiribonucleic (<i>desoxiribonucleic acid</i>)
dNTPs	desoxiribonucleòsid-5'-trifosfat
DOP-PCR	PCR amb <i>primers</i> d'oligonucleòtids degenerats (<i>degenerated oligonucleotide-primed-PCR</i>)
dTTP	desoxitimidina-5'-trifosfat
dUTP	desoxiuridina-5'-trifosfat
EDTA	àcid etilendiaminotetraacètic
EtOH	etanol
Ex.	exemple
FAP	poliposi adenomatosa familiar (<i>Familial Adenomatous Polyposis</i>)
FISH	hibridació <i>in situ</i> fluorescent
FITC	fluoresceïna isotiocianat
GTG	bandes <u>G</u> obtingudes amb <u>T</u> ripsina i <u>G</u> iemsa
H ₂ O	aigua
ICO	Institut Català d'Oncologia
ISCN	<i>International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature</i>
HCl	àcid clorhídric
HM	Hospital del Mar
HNPCC	càncer de colon hereditari no polipósic (<i>Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer</i>).
HPRC	càncer renal papil·lar de tipus familiar o hereditari
KH ₂ PO ₄	dihidrogenfosfat de potasi
KCl	clorur de potasi

LSI	sondes locus especificques (<i>locus specific identifier</i>)
M	múltiple
M-FISH	hibridació <i>in situ</i> fluorescent multiplex
MgCl ₂	clorur de magnesi
MCB	bandeig multicolor (<i>multicolor banding</i>)
MMR	reparació d'errors en l'aparellament de bases del DNA (<i>mismatch repair</i>)
MSI	inestabilitat de microsatèl·lits (<i>microsatellite instability</i>)
Na ₂ HPO ₄	monohidrogenfosfat de sodi
NaCl	clorur sòdic
NP-40	Nonidet P-40
O/N	tota la nit (<i>overnight</i>), equival a 10-15 hores
pb	parell de bases
P	pelvis renal
PBS	tampó fosfat salí
PCR	reacció en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
PRC	carcinoma renal papil·lar (<i>papillary renal carcinoma</i>)
p/v	relació pes/volum
PV	Fundació Puigvert
Rb	retinoblastoma
RCC	carcinoma renal de cèl·lules clares (<i>renal cell carcinoma</i>)
RNA	àcid ribonucleic (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAsa	ribonucleasa
rpm	revolucions per minut
RT	temperatura ambient (<i>room temperature</i>)
RT-PCR	reacció en cadena de la polimerasa per transcripció reversa
RTU	resecció transuretral
SKY-FISH	cariotipat espectral (<i>Spectral Karyotyping</i>)
SSC	clorur de sodi - citrat de sodi (<i>sodium chloride- sodium citrate buffer</i>)
SSCP	polimorfismes conformacionals de cadena simple (<i>single strand conformation polymorphism</i>)
stM-FISH	hibridació <i>in situ</i> fluorescent multiplex subtelomèrica
T	timina
TAE	Tris-Acetic-EDTA
TCC	carcinoma d'uroteli de cèl·lules transicionals
Tis	carcinoma <i>in situ</i>
TNE	són les inicials dels compostos que el formen: Tris+NaCl+EDTA
TNM	sistema de classificació de tumors, afectació a ganglis i presència de metàstasi
Tris	trihidroximetilaminometà
TSG	gens supressors de tumors (<i>tumor supressor gene</i>)
U	únic
UV	radiació ultraviolada
V	volts
v/v	relació volum/volum
WHO	<i>World Health Organization</i>

ARTICLES INCLOSOS

El resultat dels estudis que constitueixen aquesta tesi doctoral han estat recollits en les següents publicacions:

- **Prat E**, Bernués M, Caballín MR, Egozcue J, Gelabert A, Miró R. Detection of chromosomal imbalances in papillary bladder tumors by comparative genomic hybridization.

Urology 2001 May;57(5):986-92.

- **Prat E**, Camps J, del Rey J, Egozcue J, Miró R, Gelabert A, Algaba F. Combination of toluidine blue staining and in situ hybridization to evaluate paraffin tissue sections.

Cancer Genetics and Cytogenetics 2004 Nov;155(1):89-91.

- **Prat E**, Camps J, del Rey J, Ponsa I, Egozcue J, Caballín MR, Gelabert A, Campillo M, Algaba F, Miró R. CGH analysis reveals different subgroups in early stage bladder tumors.

Genes Chromosomes and Cancer (Enviat).

- **Prat E**, del Rey J, Camps J, Ponsa I, Lloreta J, Egozcue J, Gelabert A, Campillo M, Miró R. The clonal relationship between synchronous urothelial tumors is similar to that observed among the subclones of the same tumor.

Cancer Letters. (Enviat Ref. CAN-D-05-00388).

- **Prat E**, Bernués M, del Rey J, Camps J, Ponsa I, Algaba F, Egozcue J, Caballín MR, Gelabert A, Miró R. Common pattern of unusual chromosome abnormalities in hereditary papillary renal carcinoma.

Cancer Genetics and Cytogenetics. (Acceptat Ref. MM-4801-05)

- Tarafa G, **Prat E**, Risques RA, González S, Camps J, Grau M, Guinó E, Moreno V, Esteller M, Herman JG, Germà JR, Miró R, Peinado MA, Capellà G. Common genetic evolutionary pathways in familial adenomatous polyposis tumors.

Cancer Research 2003 Sep 15;63(18):5731-7.

RELACIÓ DE TAULES

Introducció:

Taula I: Classificació TNM dels carcinomes de bufeta.

Taula II: Resum dels gens més representatius implicats en el càncer de bufeta.

Taula III: Taula de classificació dels carcinomes renals (TNM).

Taula IV: Síndromes hereditaris més importants que afecten al ronyó, provocant l'aparició de tumors.

Taula V: Taula de classificació dels carcinomes colorectals (TNM).

Material i mètodes:

Taula VI: Pacients amb tumors de cèl·lules transicionals de bufeta (extracció de DNA feta a partir de mostres congelades).

Taula VII: Pacients amb tumors de cèl·lules transicionals de bufeta (extracció de DNA feta a partir de mostres parafinades).

Taula VIII: Pacients amb tumors de cèl·lules transicionals urotelials sincrònics.

Taula IX: Pacients amb carcinomes renals papil·lars de tipus familiar o hereditari (HPRC).

Taula X: Pacients amb poliposi adenomatosa familiar (FAP).

Discussió:

Taula XI: Relació dels tumors d'uroteli estudiats.

Taula XII: Desequilibris cromosòmics més freqüents, en relació amb els diversos estadis tumorals.

Taula XIII: Gens que presenten expressió diferencial en tumors de bufeta superficials *versus* infiltrants.

Taula XIV: Relació de dany genòmic en funció del estadi i grau tumoral, en tumors urotelials.

Taula XV: Alteracions observades per CGH en 68 tumors urotelials superficials.

Taula XVI: Relació dels diferents estadis i graus tumorals dins de diferents grups.

Taula XVII: Alteracions observades per CGH en els tumors múltiples sincrònics.

RELACIÓ DE FIGURES

Introducció:

Figura 1: Esquema de la progressió de la carcinogènesi vesical.

Figura 2: Adaptació del model proposat per Sandberg (1992).

Figura 3: Model citogenètic-molecular proposat per Knowles (1998).

Figura 4: Model citogenètic molecular proposat per Richter i col. (1998).

Figura 5: Model citogenètic proposat per Höglund i col. (2001).

Figura 6: Model citogenètic molecular proposat per Wu (2005).

Figura 7: Classificació dels tumors renals segons Thoenes i col. (1986).

Figura 8: Representació esquemàtica dels diferents subtipus de tumors renals en relació a la seva localització a la nefrona i al túbul col·lector, i alteracions genètiques que els caracteritzen.

Figura 9: Esquema comparatiu dels diferents sistemes de classificació dels tumors colorectals.

Figura 10: Esquema de la relació genotip-fenotip, en funció del punt on es produeix la mutació d'*APC*.

Figura 11: Esquema de l'acumulació de mutacions i inestabilitat cromosòmica en el càncer colorectal.

Material i mètodes:

Figura 12: Quantificació mitjançant gels d'agarosa.

Figura 13: Comprovació de la reacció de *Nick Translation* mitjançant un gel d'agarosa.

Figura 14: Esquema del mètode de CGH.

Figura 15: Imatges que s'observen al microscopi com a resultat del mètode de CGH.

Figura 16: Imatges de diferents tumors estudiats amb la sonda locus específica del gen de la Ciclina D1 i del centròmer del cromosoma 11.

Figura 17: Imatge de cariotip amb bandes G.

Discussió:

Figura 18: Desequilibris cromosòmics més freqüents, d'una recopilació d'aproximadament 350 tumors urotelials de cèl·lules transicionals de tipus papil·lar.

Figura 19: Exemple d'un arbre filogenètic d'un cas de tumors múltiples sincrònics.

Figura 20: Exemples d'esdeveniments que indicarien l'existència d'una relació clonal entre tumors sincrònics d'un mateix pacient.

Figura 21: Proposta de via d'evolució dels tumors de bufeta.

Figura 22: Desequilibris genètics en adenomes i carcinomes de pacients afectats de FAP.

INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ GENERAL

El càncer és un conjunt de malalties que es caracteritzen per ser el resultat de l'acumulació de múltiples alteracions en el DNA. Aquests danys es van adquirint progressivament al llarg de la vida i porten a la cèl·lula a un creixement descontrolat i excessiu. En els teixits normals es manté un equilibri entre la taxa de creixement de cèl·lules noves i la mort de cèl·lules velles. En el cas de càncer aquest equilibri s'altera; bé com a conseqüència de la pèrdua per part de les cèl·lules de la seva capacitat apoptòtica (mecanisme mitjançant el qual les cèl·lules velles o amb anomalies s'autodestruïen), o bé com a resultat d'un creixement descontrolat per part de les cèl·lules.

Aquest augment gradual en el nombre de cèl·lules amb capacitat per dividir-se, crea una massa creixent de teixit que es coneix amb el nom de tumor o neoplàsia. Si la taxa de divisió cel·lular és relativament alta i no hi ha senyals d'apoptosi, el tumor creixerà ràpidament de mida; si les cèl·lules es divideixen més lentament, el creixement del tumor serà més lent.

Posteriorment aquestes cèl·lules poden adquirir capacitat invasiva, el que els permet "escapar" del seu lloc natural, colonitzar i proliferar en altres teixits i òrgans. Aquest procés és conegut amb el nom de metastasi.

Existeixen aproximadament uns 200 tipus de cèl·lules diferents en el nostre organisme, si bé en principi qualsevol d'elles podria potencialment originar un tumor, en realitat se sap que el 90% dels tumors estan generats a partir de cèl·lules epitelials; els càncers que tenen aquest origen s'anomenen carcinomes. Altres tipus de tumors són els sarcomes, derivats de cèl·lules del teixit connectiu o muscular; les leucèmies, limfomes i mielomes originats a partir de cèl·lules sanguínies; i els neuroblastomes i gliomes que es deriven de cèl·lules del sistema nerviós.

Es pensa que les cèl·lules epitelials mantenen durant més temps la capacitat de dividir-se, i aquest seria un dels motius que explicaria perquè la majoria de tumors tenen aquest origen; a més a més hem de tenir en compte que les cèl·lules epitelials es troben recobrint les superfícies externes i internes del organisme, de manera que aquestes cèl·lules estan més exposades a l'acció de diferents agents que poden alterar el seu comportament.

Les característiques biològiques que permeten als tumors créixer, proliferar i fins i tot metastatitzar, són com ja s'ha dit conseqüència de canvis en el genoma; com poden ser canvis epigenètics, mutacions puntuals, delecions, insercions, inversions, duplicacions, translocacions i amplificacions.

Actualment s'han pogut identificar més de 100 gens relacionats amb l'aparició de tumors. Segons la seva funció aquests gens es classifiquen en: oncògens i gens supressors de tumors.

Oncògens: Tenen com a funció regular la proliferació i diferenciació cel·lular. En el seu estat normal s'anomenen protooncogens i codifiquen els components dels mecanismes de control del creixement normal de la cèl·lula. Són gens dominants i només els cal una mutació per a la seva activació. Un cop alterats, s'activen de forma constitutiva, mantenint així el senyal mitogènic permanentment actiu.

Gens supressors de tumors (TSG, de l'anglès: *tumor suppressor gene*): Tenen com a funció principal frenar la proliferació cel·lular. L'activació d'aquests gens dona lloc a una pèrdua en el control del creixement que desencadena la formació del tumor. Són gens recessius i per tant es requereix la pèrdua de funció dels dos al·lels per a la seva inactivació.

Hi ha però altres tipus de gens que no pertanyen a aquestes dues categories, i que també juguen un paper important en l'aparició o en el manteniment de les neoplàsies: gens reparadors del DNA, gens reguladors de l'apoptosi, gens de la telomerasa i gens reguladors de l'angiogènesi.

2. CÀNCER DE BUFETA

2.1 GENERALITATS



Les primeres descripcions sobre el càncer de bufeta urinària daten del segle XIX, on es detalla la presència d'aquest tipus de càncer en obrers que utilitzaven colorants del tipus anilines.

Els tumors de bufeta o tumors vesicals, són deguts al desenvolupament anormal d'un grup de cèl·lules pertanyent als teixits que formen la bufeta urinària.

Histològicament, més del 90% dels carcinomes de bufeta són tumors urotelials i presenten característiques idèntiques als carcinomes urotelials originats a altres àrees de les vies urinàries (pelvis renal, urèters, ductes prostàtics o uretra). El carcinoma de bufeta és però una malaltia molt heterogènia, ja que presenta des de tumors superficials papil·lars ben diferenciats fins a tumors sèssils poc diferenciats i invasius.

Epidemiologia: El càncer de bufeta representa el 3.2% de tots els càncers i és el setè càncer més comú al món, amb un nombre aproximat de 336.000 casos nous cada any. En el cas dels homes és el segon en freqüència entre els càncers urogenitals, per darrera del càncer de pròstata. En el cas de les dones ocupa el primer lloc, dins dels càncers urogenitals.

Al 1995 es va estimar que en els països de la Unió Europea, es presentaven 84.000 casos nous a l'any, i es produïen unes 31.000 morts com a conseqüència d'aquesta malaltia. La seva incidència té una clara tendència a anar augmentant, ja que s'estima un creixement (en el cas dels homes) de entre el 5-20% cada 5 anys.

Diferències entre poblacions: La incidència és el doble a la població caucàsica blanca que a la negra, encara que la mortalitat és molt més elevada en aquest segon grup, cosa que fa que finalment la mortalitat acabi essent similar entre les dues ètnies.

Diferències entre sexes: A Espanya, la relació home:dona és de 3.5:1, tot i que darrerament la xifra de dones amb càncer de bufeta està augmentant a causa del increment de dones fumadores i a la incorporació d'aquestes al món laboral i industrial.

Supervivència: L'avenç important que s'ha produït en els darrers anys, tant pel que fa a un ràpid diagnòstic, com per la millora en els tractaments, ha fet que la supervivència (5 anys) es situï entre 60-80%.

Edat: Pel que fa a la edat d'aparició, el patró habitual és el d'una persona més gran de 50 anys, havent un pic màxim entre els 60 i 70 anys.

Etiologia: Les causes que originen aquesta malaltia són nombroses, però s'han identificat alguns factors que li confereixen una certa predisposició:

- Anilines o amines aromàtiques (presents en colorants industrials): a l'igual que la majoria de carcinògens químics, requereixen d'una activació metabòlica per donar lloc a espècies reactives que s'uneixen al DNA. L'acuciació d'aquestes amines aromàtiques està a càrrec d'alguns enzims, la distribució dels quals és polimòrfica dins la població.
- Tabac: el risc de càncer de bufeta és de 2 a 4 vegades més elevat en fumadors i augmenta amb el nombre de cigarrets i amb la duració d'aquest hàbit. A més el risc és 2-3 vegades més elevat en fumadors de tabac negre que en fumadors de tabac ros, això possiblement és a causa de que el tabac negre conté concentracions elevades d'aminas aromàtiques que són, com ja s'ha dit, un factor específic de risc.
- Infeccions urinàries repetides: hi ha una major incidència de càncer de bufeta en regions amb elevada prevalença d'infeccions pel paràsit *Schistosoma haematobium*. També altres infeccions de les vies urinàries, podrien causar irritació de l'epiteli, factor que es pensa podria incrementar el risc de càncer vesical.
- Exposició a determinats contaminants de l'aigua potable: compostos organo-clorats que es formen en la cloració de l'aigua (per ex: trihalometans, arsènic).
- La dieta.
- Ingesta hídrica: una ingesta hídrica escassa provocaria una acumulació de metabòlits en la orina, reduiria la freqüència d'orinar augmentant així el contacte dels carcinògens amb l'epiteli vesical.
- La contaminació atmosfèrica.
- Alguns medicaments: per exemple la ciclofosfamida, produeix un metabòlit anomenat acroleïna, que augmenta 9 vegades el risc a desenvolupar càncer vesical.

Sintomatologia: Pel que fa als símptomes que es donen quan es pateix aquesta malaltia, els més habituals són l'hematúria (presència de sang a l'orina) i el síndrome miccional irritatiu. Tot i que a més es poden acompanyar (depenen de la mida de la tumoració) de dolor suprapúbic després d'orinar, o bé de dificultat per orinar.

Es tracta d'una malaltia amb un curs clínic variable, el que obliga a un seguiment diagnòstic i terapèutic permanent.

2.2 TIPUS CEL·LULARS

La majoria de tumors vesicals s'originen a l'uroteli, és a dir, al teixit epitelial que cobreix la part interna de la bufeta i de quasi tot el tracte urinari incloent pelvis renal, urèters i uretra proximal. Els tumors derivats de teixit muscular o conjuntiu són poc freqüents.

D'acord amb el tipus cel·lular, els carcinomes de bufeta. Es classifiquen de la següent manera:

Carcinoma de cèl·lules transicionals (TCC) (de l'anglès: *transitional cell carcinoma*). És el tipus més freqüent, un 90% del total de tumors de bufeta són carcinomes de cèl·lules transicionals.

Està compost de cèl·lules derivades de l'epiteli de transició propi de la mucosa urotelial. S'acostuma a desenvolupar inicialment cap a la llum de la bufeta, però també pot envair la paret vesical i infiltrar finalment als òrgans propers i fins i tot disseminar-se per altres òrgans. De fet podem diferenciar dues varietats de carcinoma transicional: el superficial i el infiltrant.

El carcinoma transicional superficial (aproximadament el 75 % dels casos) està format per cèl·lules de característiques semblants a les de la mucosa vesical normal, i generalment no són infiltrants tot i que tenen una proporció de recurrència molt elevada (50-80% dels casos).

El carcinoma transicional infiltrant (el 25%), està format per cèl·lules més indiferenciades i amb gran capacitat invasora, penetren en la capa muscular de la bufeta i es difonen a distància a través dels vasos limfàtics i sanguinis.

Carcinoma de cèl·lules escamoses. És un tipus de carcinoma menys freqüent, representa 3-4% dels tumors de bufeta. Està compost per cèl·lules escamoses, semblants a les de la pell. Els diferents graus de queratinització i els ponts intracel·lulars marquen la seva diferenciació. És el tipus que es presenta més sovint després d'irritacions cròniques, i acostuma a evolucionar molt ràpidament, està relacionat amb infeccions pel paràsit *Schistosoma haematobium*.

Carcinoma de cèl·lules glandulars o adenocarcinomes. És un tipus de carcinoma de bufeta molt poc freqüent, representa menys d'un 2% dels tumors de bufeta. Es dona més habitualment en homes que en dones, en una proporció aproximada de 2'6:1. El pic d'incidència es situa al voltant dels 60 anys.

Carcinoma indiferenciat. Es caracteritza perquè està format per cèl·lules sense les característiques distintives que corresponen als teixits desenvolupats.

Les cèl·lules poden ser fusiformes o gegants, rebent el nom de carcinoma de fus cel·lular o sarcomatoide i carcinoma de cèl·lules gegants.

Existeix una relació directa entre el grau de diferenciació del tumor i la freqüència amb que es presenta: 10-60% dels tumors superficials de bufeta, 60% dels carcinomes d'estadi tumoral pT1G3, entre 50-80% associat a tumors infiltrants.

2.3 PATRÓ DE CREIXEMENT

Els diferents patrons de creixement que es poden observar en els tumors urotelials són:

Papil·lar. És el patró de creixement que es troba de manera més habitual, representa el 70% del total de tumors urotelials. Les cèl·lules epitelials es disposen al voltant d'un eix fibroconectiu, les papil·les.

Sòlid. També anomenat sèssil o nodular infiltrant. Representa aproximadament un 10% del total. Té pitjor pronòstic.

Mixta. Amb característiques papil·lars i sòlides ahora. És poc freqüent, però més habitual que el patró sòlid, representa un 20% del total.

Pla. També anomenat carcinoma *in situ* (CIS o Tis) o carcinoma intraepitelial, no és papil·lar ni infiltrant i es troba limitat a la mucosa.

2.4 CLASSIFICACIÓ HISTOPATOLÒGICA

El sistema de classificació es fonamenta bàsicament en dos aspectes, l'estadi d'invasió del tumor i el grau de diferenciació tumoral, és la classificació TNM.

Estadi: La T ens indica el grau d'infiltració del tumor, és a dir fins a quin nivell o capa del teixit arriba el mateix. La N ens dóna informació sobre el grau d'afectació dels ganglis. La M ens informa sobre si hi ha o no metàstasi.

En funció d'aquests diferents paràmetres s'obté tot el ventall de possibilitats que s'indiquen a continuació a la taula I, i que es veuen esquematitzades a la figura 1.

Taula I: Classificació TNM dels carcinomes de bufeta.

T	Tumor primari
TX	El tumor primari no es pot evaluar
T0	No hi ha evidència de tumor primari
Ta	Carcinoma papil·lar no invasiu
Tis	Carcinoma in situ: " tumor pla"
T1	El tumor envaeix el teixit connectiu subepitelial
T2	El tumor envaeix el muscle
T2a	El tumor envaeix el muscle superficial (meitat interior)
T2b	El tumor envaeix el muscle profund (meitat exterior)
T3	El tumor envaeix el teixit perivesical:
T3a	Microscòpicament
T3b	Macroscòpicament (massa extravesimal)
T4	El tumor envaeix qualsevol dels òrgans adjacents: pròstata, úter, vagina, paret pelviana o paret abdominal
T4a	El tumor envaeix la pròstata, l'úter o la vagina
T4b	El tumor envaeix la paret pelviana o la paret abdominal
N	Ganglis limfàtics regionals
NX	Els ganglis limfàtics no es poden valorar
N0	No hi ha signes de metastasi als ganglis limfàtics regionals
N1	Metàstasi de 2 cm o menys a un únic gangli limfàtic
N2	Metàstasi a un únic gangli limfàtic, amb un tamany més gran de 2 cm pero menys de 5 cm, o a múltiples ganglis limfàtics el conjunt dels quals no superi els 5 cm de dimensió
N3	Metàstasi a ganglis limfàtics amb una mida superior a 5 cm
M	Distància de la metastasi
MX	No es pot evaluar si hi ha metastasi allunyada
M0	No hi ha metastasi allunyada
M1	Hi ha metastasi allunyada

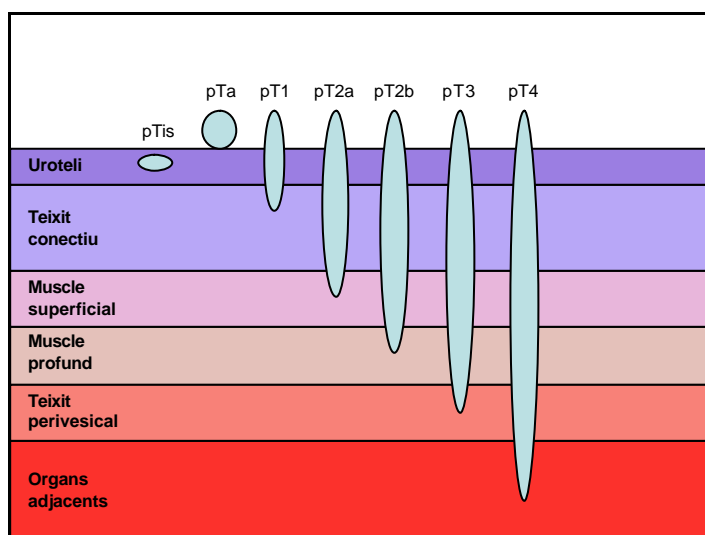


Figura 1: Esquema de la progressió de la carcinogènesi vesical.

Grau: El grau és un dels factors de pronòstic més rellevants en qualsevol patologia tumoral. En el cas dels tumors de bufeta, és un factor molt important de progressió i de mortalitat però no de recurrència. El grau de diferenciació cel·lular es divideix en:

- Grau X: No es pot avaluar el grau de diferenciació.
- Grau 1 o grau baix: Ben diferenciat; cèl·lules amb lleugera anaplàsia.
- Grau 2 o grau mitjà: Cèl·lules moderadament diferenciadades, és a dir amb anaplàsia moderada.
- Grau 3-4 o alt grau: Cèl·lules pobrament diferenciadades o indiferenciadades.

Actualment es tendeix a gradar els tumors com GX (quan no es poden gradar), i alt o baix grau en la resta de casos.

2.5 CARACTERÍSTIQUES CLÍNICO-PATOLÒGIQUES

2.5.1 DIAGNÒSTIC I TRACTAMENT

Dins dels TCC urotelials hi ha una gran heterogeneïtat, que es manifesta també en l'evolució clínica. De manera general es distingeixen dues formes de presentació d'aquests tumors, els tumors superficials i els tumors infiltrants, el tractament dels quals està clarament diferenciat.

Els tumors superficials (pTa i pT1), representen el 75% dels casos de càncer de bufeta. El tractament quirúrgic indicat és la resecció transuretral (RTU) acompanyat en moltes ocasions d'una biòpsia múltiple normalitzada (BMN). Després de realitzar aquesta intervenció, associada o no a instil·lacions de BCG (Bacil Calmette-Guérin) i/o quimioteràpia endovesical (aquesta es realitza en els casos d'alt grau); prop d'un 50-80% dels pacients experimenten posteriors recidives també de tipus superficial. D'altra banda, en aproximadament una quarta part dels pacients, la malaltia progressarà i les recidives posteriors passaran a ser infiltrants (de Braud et al. 2002). És per això que s'ha proposat la possibilitat de realitzar cistectomia radical i una posterior derivació urinària en casos de tumors superficials prèviament seleccionats (Huguet et al. 2005).

Dins dels carcinomes superficials s'ha de fer menció al carcinoma *in situ* (pTis) que es habitualment més agressiu que la resta de superficials, i presenta també un risc de progressió més elevat.

La resta de tumors, aproximadament un 25%, són inicialment infiltrants (pT2-T4). El tractament quirúrgic indicat és molt més agressiu, ja que es realitza una cirurgia radical, d'aquesta manera s'evita la disseminació. L'opció en el cas de que el pacient sigui una dona és realitzar una cistectomia radical, és a dir extracció de tota la bufeta, i en el cas dels homes es realitza una cistoprostatectomia, intervenció en la que s'extrau

la bufeta i la pròstata en una sola intervenció. Hi ha diverses possibilitats a l'hora de fer la derivació urinària posterior a la cistectomia, aquesta amplia varietat la podem definir a trets generals de dos formes diferents, tot i que cal tenir present que hi ha un gran ventall de metodologies i tècniques diverses a seguir dins de cada un d'elles. Una opció consisteix en anastomosar els dos urèters a un segment d'intestí prim, i d'aquí fer una sortida a la superfície corporal; una altra possibilitat és crear una "bufeta nova" a partir d'un segment d'intestí el qual farà la funció de bufeta.

Tot i amb aquestes cirurgies radicals, aproximadament la meitat dels pacients desenvoluparan metàstasis en un període aproximadament de dos anys.

2.5.2 FACTORS DE PRONÒSTIC CLÍNIC

Tumors superficials: La possibilitat de progressió a tumor infiltrant està associada tant al grau com a l'estadi, que són els dos factors pronòstics clàssics més importants. Pel que fa a l'estadi, aproximadament el 6% dels tumors pTa i el 30% de pT1 progressen a infiltrants. El risc de progressió en relació amb el grau és del 6% en el cas dels G1, 12% en el cas dels G2, i el 30% en el cas dels G3. Si combinem ambdós factors (grau i estadi), el grup amb pitjor pronòstic són els pT1G3 amb un risc de progressió d'aproximadament del 50% (Mulders et al. 1994).

El cas dels pTis és més complexa donat que aquest és habitualment més agressiu que la resta de tumors superficials i també presenta de manera general un risc de progressió més elevat. De totes maneres podem distingir tres "tipus" de pTis amb unes característiques i un pronòstic diferent: el pTis unifocal, que és el que presenta una agressivitat més baixa; el pTis multifocal que està associat en més d'un 50% a casos de progressió; i el pTis associat a tumor infiltrant, que és el que presenta un pitjor pronòstic (Kiemeney et al. 1994a).

Hi ha però altres factors que influencien en un mal pronòstic:

- La presència d'invasió vascular o limfàtica.
- La presència de multifocalitat.
- La presència de recidives en els 3 primers mesos de seguiment.
- La mida del tumor.
- La presència de displàsia a altres zones de la bufeta.

Tumors infiltrants: El factor pronòstic més important en pacients als que se'ls hi ha realitzat una cistectomia radical és el grau d'afectació ganglionar, que és histològicament positiu en un 15-25% dels casos. La supervivència (a 5 anys) de pacients amb afectació ganglionar, és d'una mitjana inferior al 15%. Els pacients amb

N1 són l'únic grup que presenten una supervivència superior a aquesta mitjana, que és del 35% (Vieweg et al. 1994) els pacients amb N2 o N3, tenen una probabilitat de supervivència inferior al 10%, i el 70% d'aquests pacients moren durant el primer any.

En aquest grup, l'estadi tumoral és un factor important: en pacients que presentaven un tumor pT2 el percentatge de supervivència és proper al 60% passats 5 anys, mentre que en els pT3-T4 és del 10-30%. A més a més cal tenir en compte que la majoria de tumors pT3b-T4 estan associats a afectació ganglionar. A diferència dels tumors superficials, en aquest grup el grau histològic aporta poca informació, ja que tots solen ser d'alt grau.

Altres factors a tenir en compte són: la infiltració prostàtica i l'obstrucció ureteral secundària.

2.6 MULTIFOCALITAT EN EL CÀNCER D'UROTÈLI

Una característica del 30% dels tumors urotelials és la multifocalitat o multiplicitat de lesions (Kiemenev et al. 1993).

Quan parlem de tumors multifocals estem fent referència al número de tumors que hi ha a la bufeta, aquest pot ser molt variable, però sempre parlem d'un mínim de dos, encara que no hi ha un nombre màxim. Molts autors han analitzat la multifocalitat en relació amb la recurrència, però s'han trobat resultats contradictoris. Sembla però que la multiplicitat incrementa el risc de progressió (Kiemenev et al. 1994b; Millan-Rodriguez et al. 2000).

Tot i la gran quantitat de treballs que s'han publicat respecte aquest tema (veure revisió de Hafner et al. 2002), hi ha encara alguns dubtes sobre l'origen d'aquests carcinomes múltiples i els mecanismes que permeten la seva disseminació. Podem definir bàsicament dues teories que intenten donar una explicació a l'aparició tant de tumors urotelials sincrònics, com dels tumors metacrònics (anomenats habitualment recidives).

L'efecte de camp: Aquesta teoria parteix de la idea de l'existència en determinats individus d'una mucosa urotelial inestable; de manera que l'epiteli transicional d'aquests individus tindria certa tendència a desenvolupar tumors, tant sincrònics (presència de més d'un tumor simultàniament) com metacrònics (l'individu aniria desenvolupant tumors al llarg de la seva vida) (Yao and Rubin 1994).

El fet de què quan un individu presenta un tumor urotelial, amb certa freqüència aquest acostumi a anar acompanyat d'altres lesions (hiperplàsies, displàsies, carcinomes *in situ*, etc.) que presenten també alteracions genètiques, donaria força a la hipòtesis de l'existència d'una mucosa inestable que al entrar en contacte amb algun

carcinogen, produiria la transformació de diferents cèl·lules d'aquest epitelí a malignes, originant diferents tumors de manera independent, encara que es donessin de forma simultània (Czeraniak et al. 2000; Hartmann et al. 2002).

Origen monoclonal: Aquesta teoria proposa un origen comú per tots els tumors uroepitelials d'un mateix individu. L'origen dels diferents tumors seria un únic tumor inicial del que s'haurien després cèl·lules tumorals, que posteriorment es fixarien en altres punts del tracte urinari i desenvoluparien els altres tumors (Sidransky et al. 1992). Hi ha però alguns autors (Simon et al. 2001) que proposen una alternativa a aquest mecanisme, que seria que les cèl·lules procedents del tumor inicial migren a través de l'epitelí vesical.

Com ja s'ha comentat anteriorment, amb la finalitat d'esbrinar quin és l'origen d'aquesta multiplicitat, s'han publicat un gran nombre de treballs en els que s'ha utilitzat una gran variabilitat de metodologies amb les quals s'ha estudiat tant els tumors com, en alguns dels casos, la mucosa que aparentment era normal; i els resultats obtinguts d'aquests estudis són contradictoris.

Una de les metodologies més utilitzades per part de diferents autors ha estat l'estudi de **mutacions de TP53**, aportant dades a favor de l'efecte de camp ((Petersen et al. 1993; Yoshimura et al. 1995; Goto et al. 1997;); entre altres), i també a favor d'un origen monoclonal (Habuchi et al. 1993b; Xu et al. 1996; Dalbagni et al. 2001). Alguns d'aquests estudis detecten monoclonalitat no només en tumors de bufeta sinó també en altres situats al tracte urinari superior.

Una possible explicació d'aquests resultats clarament contradictoris, és el fet que les mutacions de TP53 es produeixen de manera tardana pel que fa al desenvolupament d'aquests tumors.

També s'han analitzat les **mutacions de FGFR3**, en tumors exclusivament metacrònics. Van Tilborg i col (2000) van analitzar 15 tumors superficials de baix grau dels quals 10 presentaven mutacions idèntiques, per tant aquest resultat recolzaria la teoria de la monoclonalitat.

Una altra tècnica àmpliament emprada en l'estudi d'aquests tumors ha estat la **pèrdua d'heterozigositat (LOH)** (de l'anglès: *loss of heterozygosity*) de múltiples marcadors, de manera que permet detectar un patró específic de pèrdues al·lèliques. Aquest és un bon sistema per analitzar regions cromosòmiques que es perden de manera primerenca en el procés de la carcinogènesi, és per això que les pèrdues d'heterozigositat del cromosoma 9 són d'especial interès, ja que les delecions d'aquest cromosoma es produeixen en un elevat percentatge de tumors urotelials en els primers passos del procés de carcinogènesi. La majoria d'aquests estudis es decanten per la via de la monoclonalitat (Miyao et al. 1993; Takahashi et al. 1998; van Tilborg et al.

2000; Hafner et al. 2001), encara que també n'hi ha que es decanten per l'efecte de camp (Stoehr et al. 2000).

En els casos en els que s'analitzaren mostres de mucosa procedents de peces de cistectomia, es van observar nombroses pèrdues d'heterozigositat a la mucosa normal, displàsia, etc. fet que donaria suport a la hipòtesi d'un efecte de camp (Czerniak et al. 2000; Muto et al. 2000), s'ha de tenir en compte però que les mostres escollides en aquests treballs provenen de bufetes amb tumors invasius i que per tant no es pot descartar la possibilitat de que en realitat s'estiguin valorant cèl·lules descamades procedents del tumor. Quan aquests estudis s'han realitzat en tumors superficials, es detecta un percentatge baix de LOH a la mucosa normal (Junker et al. 2003; Stoehr et al. 2005).

Estudis citogenètics, realitzats per Fald-Elmula i col. (1999) descriuen alteracions cromosòmiques idèntiques en diferents tumors d'un mateix pacient, fet que els porta a afirmar que aquests tumors tenien un origen comú, és a dir, un origen clonal tant en casos de tumors sincrònics com metacrònics, i que la presència de diferents tumors es deu a un despreniment de cèl·lules tumorals i la posterior implantació en una altra regió de l'uroteli o de la bufeta.

L'anàlisi d'**inactivació del cromosoma X** és un dels mètodes més fiable pel que fa a estudis de clonalitat. El problema d'aquesta metodologia es centra en que només es poden estudiar els tumors urotelials procedents de dones (on un dels dos cromosomes X s'inactiva en etapes primerenques del desenvolupament embrionari), mentre que la majoria de pacients que presenten tumors de bufeta són homes i per tant això limita els estudis que es poden realitzar utilitzant aquesta tècnica. Els resultats obtinguts han demostrat un patró d'inactivació idèntic, ja que s'inactiva sempre el mateix cromosoma X, a tots els tumors de la mateixa pacient, ja siguin sincrònics o metacrònics (Sidransky et al. 1992; Li and Cannizzaro 1999).

La tècnica de **FISH** (de l'anglès: *fluorescent in situ hybridization*) també ha estat escollida per alguns autors (Steidl et al. 2002; Cianciulli et al. 2003) per a analitzar tant tumors com mucosa. Tot i que els resultats que s'han obtingut amb aquesta tècnica són bastant concordants pel que fa al patró d'alteracions, les conclusions apunten cap a hipòtesis diferents. Mentre que Steidl i col. (2002) donarien suport a la hipòtesis de relació clonal, Cianciulli i col. (2003) es decantarien per la hipòtesis de l'efecte de camp. La tècnica de hibridació genòmica comparada, **CGH** (de l'anglès: *comparative genomic hybridization*) va ser emprada per Simon i col. (2001) per estudiar la clonalitat de 32 tumors procedents de 6 pacients als que se'ls hi havia realitzat una cistectomia. Aprofitant que disposaven de tota la bufeta, també van estudiar mostres de mucosa situades al costat dels tumors. Aquests autors no només van concloure que l'origen de

la multiplicitat era monoclonal, ja que els tumors d'un mateix pacient compartien entre 7 i 13 desequilibris cromosòmics idèntics, sinó que a més a més amb anàlisis immunohistoquímics van detectar cèl·lules portadores de la proteïna p53 mutada en la mucosa no tumoral, fet que els va portar a proposar que les cèl·lules migren a través de l'epiteli vesical (Simon et al. 2001).

2.7 GENÈTICA DELS TUMORS UROTELIALS

La genètica dels tumors urotelials és molt complexa i a diferència d'altres tipus de tumors no hi ha una via definida d'alteracions que ens serveixi de guia alhora d'estudiar la seva evolució. És per això que hi ha molts estudis, tant citogenètics com moleculars, que han aportat gran quantitat de dades sobre alteracions genètiques, proteïnes reguladores, molècules d'adhesió cel·lular, etc. per tal d'intentar esbrinar quina o quines vies d'evolució hi ha en aquests tipus de tumors, i quins gens, proteïnes o cromosomes i estan implicats.

2.7.1 ESTUDIS CITOGENÈTICS

Els canvis cromosòmics proporcionen un coneixement bàsic de la tumorigènesi, ja que poden estar reflectint l'activació d'oncògens o la inactivació de gens supressors de tumors involucrats en l'inici, la progressió o metàstasi del càncer urotelial.

La citogenètica d'aquests tumors és molt complexa. Se sap que hi ha una bona correlació entre les alteracions en la ploïdia del DNA i l'estadi tumoral, el grau histològic del tumor i la taxa de supervivència dels pacients amb TCC. Aquests tumors de bufeta són aneuploides en un 40-50% dels casos (Sasaki et al. 1992). En estadis inicials s'acostumen a observar cariotips diploides amb una o diverses anomalies, però a mida que l'estadi va avançant, la citogenètica d'aquests tumors també es complica, de manera que ja trobem cariotips pseudo-tetraploides amb un elevat nombre de marcadors. Hi ha una important diferència pel que fa a la quantitat d'alteracions entre tumors pTa i pT1, mentre que l'augment d'aquestes deixa de ser significatiu a l'hora de comparar pT1 i pT2-T4 (Sauter et al. 1997; Fadl-Elmula 2005).

S'ha observat que certes anomalies cromosòmiques es correlacionen amb un risc elevat de recurrència i progressió tumoral (Sandberg et al. 1986; Falor and Ward-Skinner 1988; Fadl-Elmula 2005).

Els TCC de bufeta, tot i ser un tipus de tumor molt heterogeni, presenta una sèrie d'alteracions cromosòmiques, més o menys complexes, força recurrents com són: -9, +7, -11 o del(11p), del(13q), del(17p) i reorganitzacions dels cromosomes 1, 5 i 10 (Sandberg and Berger 1994; Gibas and Gibas 1997; Fadl-Elmula et al. 2000; Wu 2005;

Fadl-Elmula 2005). D'altra banda, dades obtingudes a partir d'experiments de CGH, indiquen que els guanys cromosòmics que s'observen de manera més reiterada serien: 1q, 8q, 20q i 11q, i pèrdues dels cromosomes 9, 8p i 11p (Kallioniemi et al. 1995; Richter et al. 1998, 1999; Simon et al. 2000).

No es coneixen alteracions cromosòmiques exclusives dels TCC de bufeta, però la repetició d'algunes d'elles fa pensar que aquestes juguen un paper decisiu en la carcinogènesi d'aquests tumors. A continuació s'analitzaran les alteracions d'alguns cromosomes, els quals tenen una especial rellevància i implicació en la tumorigènesi vesical.

Cal tenir en compte que alhora de fer una revisió de la bibliografia existent en citogenètica dels tumors de bufeta, es pot trobar certa informació contradictòria de manera que a vegades podem trobar regions cromosòmiques que per regla general es guanyen, però que en algun estudi es posa de manifest la pèrdua d'aquella regió, o bé a la inversa.

Cromosoma 1: Mai s'ha trobat com a única alteració en tumors de bufeta, ja que quasi sempre que es observat va acompanyant pèrdues del cromosoma 9; en algunes ocasions s'ha trobat també acompanyant d'alteracions del cromosoma 11, es per això que podríem dir que les alteracions del cromosoma 1 es troben com a alteració primerenca en els tumors de bufeta, però de manera secundària (Fadl-Elmula et al. 2000). Guanys de 1q s'han descrit de manera més freqüent a tumors pT1 que a pTa, és per aquest motiu que alguns autors relacionen aquest guany amb la progressió tumoral (Fadl-Elmula 2005).

Els reordenaments d'aquest cromosoma són un fet freqüent en els tumors de bufeta, tot i que aquest fet no és exclusiu d'aquests tumors, ja que es troben presents a quasi qualsevol tipus de càncer; les alteracions estructurals més freqüents acostumen a ser delecions o duplicacions. Gibas i col. (1984) van detectar preferentment pèrdues de 1p22 i 1p32, mentre que posteriorment aquestes mateixes bandes s'han descrit com a guanys en estudis realitzats per CGH juntament amb altres guanys com són: 1q31 (Kallioniemi et al. 1995) i 1q22-q24 (Richter et al. 1998; Koo et al. 1999).

També s'han descrit amplificacions en aquest cromosoma a 1p22-p32 (Terracciano et al. 1999), i a 1q21-q24 (Richter et al. 1997, 1998; Hovey et al. 1998; Simon et al. 1998, 2000). Hem de tenir present que dins d'aquesta última regió, i concretament a 1q22-q24 es troben localitzats els oncògens *SKI* i *TRK*.

Utilitzant CGH en microxips de DNA, s'han trobat guanys a 1q24.2 i 1q25.1, i nivells elevats d'amplificació a 1q12 (Veltman et al. 2003).

Cromosoma 5: Aquest és el cromosoma que més habitualment presenta alteracions estructurals en els tumors de bufeta (Fadl-Elmula et al. 2000). En estudis de citogenètica clàssica és habitual trobar reorganitzacions d'aquest cromosoma, ja sigui la deleció de braços llargs o la formació d'un isocromosoma de braços curts, la qual es troba en el 35% dels casos (Gibas et al. 1984). A més a més, diversos autors associen la presència d'isocromosoma 5p amb fenotips tumorals més agressius (Hovey et al. 1998; Fadl-Elmula et al. 2000).

Com ja s'ha apuntat, el guany de 5p seria un fenomen habitual en els tumors de bufeta (Koo et al. 1999; Fadl-Elmula et al. 2000), tot i que també s'han descrit amplificacions a diverses bandes: 5p11-p13, 5p15 i a 5q21 (Richter et al. 1999; Simon et al. 1998, 2000).

Recentment Zheng i col. (2004), i gràcies a la utilització de diferents tècniques, van observar que a la banda amplificada de 5p15, i concretament 5p15.1-p15.31, es troba una bateria de 7 gens, un dels quals és *TRIO*. L'amplificació d'aquest gen presenta una forta correlació amb graus i estadis avançats en els tumors de bufeta.

El guany de 5p i la pèrdua de 5q es troben sovint associats (Voorter et al. 1995; Koo et al. 1999), tot i que s'observen de manera més freqüent en tumors pTaG3 que en pTaG2 (Zhao et al. 1999). A més a més altres estudis han relacionat la deleció de 5q amb estadis invasius (Dalbagni et al. 1993; Richter et al. 1999). Richter i col. (1998), en estudis realitzats per CGH, van relacionar el guany de 5p juntament amb altres alteracions com són -5q, -6q, -15q, +7p i +Xq amb mal pronòstic, ja que eren significativament més freqüents a pT2-T4 que a pT1.

La pèrdua del braç llarg del cromosoma 5 s'ha observat, també, en un elevat percentatge (43%) en estudis realitzats mitjançant CGH en línees cel·lulars de càncer de bufeta (Hurst et al. 2004).

També hi ha publicats estudis de LOH a 5q (Knowles et al. 1992; von Knobloch et al. 2000), que apunten a dos regions crítiques: 5q22-q23 i 5q33-q34, les quals estarien relacionades amb el grau dels tumors.

Cromosoma 7: La trisomia d'aquest cromosoma és una alteració freqüent en els tumors de bufeta i ha estat descrita com a única anomalia en alguns casos (Berrozpe et al. 1990), tot i que el més freqüent és que vagi associada a altres alteracions cromosòmiques. La trisomia 7 com a única alteració s'ha descrit també en altres tipus de càncers com són: ronyó, colon, cervell i pulmó (revisió de Sandberg i Berger (1994)). Waldman i col. (1991) van observar que hi havia una correlació entre l'augment en el nombre de cromosomes 7 i el grau tumoral, especialment en estadis i graus avançats. Posteriorment, Simon i col. (2000) per mitjà d'estudis de CGH van

associar el guany de 7p amb estadis tumorals tardans. Aquests autors van determinar que aquesta alteració era de dos a tres vegades més freqüent en els tumors pT2-T4, suggerint que podia tractar-se d'un esdeveniment tardà en el procés del càncer de bufeta. Aquests mateixos autors descriuen en diferents treballs amplifícacions en diferents bandes d'aquest cromosoma: 7q36 i 7q21-q31 (Simon et al. 1998, 2000). Estudis posteriors realitzats emprant la tècnica de CGH en microxips, mostren guanys concretament a 7q21.11 (Veltman et al. 2003).

Sandberg i Berger (1994) van trobar el guany del cromosoma 7 com la alteració més freqüentment detectada (per davant del +8, +4 i del +20) en estudis realitzats amb FISH. S'ha de tenir present que a 7p12 hi ha localitzat l'oncogèn *EGFR/ERBB1*, que es troba implicat en gran nombre de càncers, entre ells el de bufeta (Kim et al. 2001).

Cromosoma 8: Aquest és un cromosoma molt implicat en els tumors de bufeta, i a l'igual que en altres cromosomes el comportament dels seus braços resulta antagònic. Pel que fa a 8p, acostuma a presentar pèrdues. La deleció d'aquest braç s'ha trobat en un 25% dels casos, a més a més hi ha certa associació amb tumors d'elevat estadi i grau, ja que només un 10-12% dels pTa presenten pèrdues de 8p, en el cas dels pT1 aquest percentatge s'eleva fins un 24%, i en els pT2-T4 aquest ja arriba al 45-54%. Aquesta diferència fa suposar que a 8p hi ha situat algun gen supressor de tumors de gran importància pel desenvolupament del fenotip infiltrant en el càncer de bufeta (Knowles et al. 1993; Wagner et al. 1997; Richter et al. 1998, 1999; Fadi-Elmula 2005). Les delecions de 8p no només es relacionen amb l'estadi tumoral, sinó que també ho fan amb el grau, donat que la seva pèrdua és més freqüent en els pTaG3 que en els pTaG2 (Zhao et al. 1999). D'altra banda, cal tenir present que aproximadament un 50% dels tumors G3 presenten LOH a 8p (Takle and Knowles 1996). Aquestes dades suggereixen que les pèrdues d'aquest braç podrien estar relacionades amb el procés de progressió d'aquests tumors, més que amb el procés de carcinogènesis, en si.

Les delecions que s'han descrit de manera més freqüent en aquest cromosoma, han estat 8p12-pter (tot i que també s'han detectat amplifícacions a 8p12 (Richter et al. 1997; Simon et al. 2001), 8p21.3 i 8p22 (Knowles et al. 1993; Kallioniemi et al. 1995; Koo et al. 1999).

Concretament la regió de 8p22 es va considerar com a candidata de contenir un gen supressor de tumors (Takle and Knowles 1996; Wagner et al. 1997). Posteriorment s'ha vist que les pèrdues en aquesta regió es troben relacionades amb els gens *NAT1* i *NAT2* (Stacey et al. 1999). Les alteracions en aquests gens poden afectar les taxes d'acetilació, i s'ha observat que els individus amb fenotip acetil·lador lent presenten un risc més elevat de desenvolupar càncer vesical ocupacional o bé relacionat amb el

consum de tabac (Takle and Knowles 1996). La deleció de 8p22 augmenta en freqüència a mida que avança l'estadi tumoral, de manera que aquesta pèrdua es pot observar en un 9% dels pTa, en un 42% dels pT1 i en un 54% dels pT2-T4. També es presenta amb més freqüència en tumors amb un grau histològic elevat.

A més a més, s'han postulat altres regions a 8p que podrien contenir dianes d'interès en l'estudi de la carcinogènesi vesical, com són 8p11.2p12 o 8p11.2p21 (Takle and Knowles 1996; Choi et al. 2000; Adams et al. 2005).

En estudis realitzats amb CGH en microxips de DNA es troben regions freqüentment delecionades en aquest cromosoma com són 8p23.3, 8p23.1 i 8p21.3, observant pèrdues en homozigosi a la regió 8p23.1 (Veltman et al. 2003).

Pel que fa referència al braç llarg del cromosoma 8, aquest acostuma a presentar guanys en un 28% dels pT1 i alguns autors associen el guany de 8q amb la progressió del tumor (Wagner et al. 1997; Richter et al. 1997, 1999). S'han descrit també amplifícacions a 8q21-q22 (Kallioniemi et al. 1995; Richter et al. 1997, 1998; Simon et al. 2000) i a 8q24 (Richter et al. 1998; Terracciano et al. 1999). De fet l'amplificació de 8q24 es troba molt implicada en els TCC de bufeta (Sauter et al. 1995a), i s'ha observat que la prevalença d'aparició de +8q24 augmenta amb l'estadi i grau tumoral, de manera que es troba en un 10% dels pTa, en un 26% dels pT1 i en un 54% dels pT2-T4 (Wagner et al. 1997). Precisament en aquesta regió del cromosoma 8 es troba el gen: *MYC*. El locus de *MYC* està situat de manera contigua a la regió que es guanya en aquests tumors, tot i que no s'ha trobat una relació clara entre la sobre-expressió de la proteïna i els TCC. Per tant tot i que la seva localització cromosòmica es correspon a la regió guanyada, aquest gen sembla no estar especialment implicat en els TCC de bufeta (Sauter et al. 1995a; Zaharieva et al. 2005).

Pel que fa als resultats publicats per Veltman i col. (2003) emprant CGH en microxips, cal destacar els guanys de 8q21.3 i 8q22.2 (també van detectar amplifícacions d'aquesta última banda).

En el cas dels TCC de bufeta, sembla que hi ha una associació significativa entre les pèrdues del braç curt i els guanys del braç llarg del cromosoma 8, associació que també s'ha observat en el cas dels tumors de pròstata (Cher et al. 1994; Wagner et al. 1997). Concretament i en el cas de tumor de bufeta s'apunta a que el guany de 8q24 és altament freqüent en tumors que presenten la pèrdua de 8p22. Wagner i col. (1997) van anar més lluny en la valoració d'aquesta associació i van suggerir que les cèl·lules que presentessin una amplificació a 8q serien seleccionades positivament, per mitjà de la inactivació d'un possible gen supressor de tumors situat a 8p, de manera que el guany de 8q no tindria una significança per si mateix.

Per altra banda, la polisomia del cromosoma 8 s'ha relacionat amb l'estadi i el grau, així com la polisomia d'altres cromosomes com són el 7 i el 17 (Sauter et al. 1995a).

Cromosoma 9: La pèrdua d'aquest cromosoma és una de les alteracions més freqüents en càncer de bufeta. Sovint les pèrdues es produeixen tant en el braç curt com en el braç llarg i es donen en aproximadament el 50% dels tumors superficials de bufeta (Knowles 1999). Aquesta pèrdua reiterada es troba en diferents estadis i graus tumorals; fins i tot en aquells casos on el tumor presenta un elevat nombre cromosòmic, també es manifesta la pèrdua d'aquest cromosoma (Sandberg and Berger 1994; Fadl-Elmula 2005).

S'ha observat una elevada freqüència de pèrdues de 9q en tumors papil·lars, en comparació amb la freqüència que es presenta en tumors amb patró de creixement sòlid, això suggereix que aquesta alteració podria ser característica de tumors papil·lars (Dalbagni et al. 1993); per altra banda, també s'ha descrit que les delecions de 9p no semblen tenir una associació diferencial entre tumors papil·lars i sòlids (Richter et al. 1998). Hi ha però estudis que s'han realitzat mitjançant la tècnica de CGH, on s'ha posat de manifest que tant les pèrdues de 9q com els guanys de 11q13 eren les úniques alteracions que mostraven diferències significatives entre tumors sòlids i papil·lars (Richter et al. 1998, Koo et al. 1999).

Com s'exposarà a continuació, hi ha una gran quantitat d'estudis que aporten dades sobre la pèrdua d'aquest cromosoma, o com a mínim d'alguna de les seves regions; moltes d'aquestes dades indiquen que aquesta pèrdua és un esdeveniment primerenc dins la carcinogènesi vesical.

La monosomia del cromosoma 9 és un fet que es produeix entre un 35-50% (segons els estudis) en els TCC d'uroteli (Hopman et al. 1991; Waldman et al. 1991, Sauter et al. 1995b), s'ha descrit en tumors pTa (Dalbagni et al. 1993; Spruck et al. 1994) i a més a més aquesta alteració ha estat observada com a única anomalia citogenètica en alguns tumors de bufeta, tot i que sovint està associada a altres alteracions genètiques. Aquests fets fan suposar que aquesta pèrdua és un esdeveniment genètic primerenc en aquests tumors.

La pèrdua de funció d'un o més gens d'aquest cromosoma es considera per tant clau pel desenvolupament de la majoria dels TCC (Sandberg and Berger 1994). Hi ha però determinades regions que es troben alterades principalment en estadis primerencs, com són 9p22-p23, 9p11-p13, 9q12-q13, 9q21-q22 i 9q34 (Czerniak et al. 1999).

En estudis realitzats mitjançant LOH en 9q, es va observar que la pèrdua al·lèlica està present en el 65% dels TCC (Olumi et al. 1990), aquesta freqüència tan elevada que presenten els tumors de bufeta no s'ha observat en cap altre tumor epitelial, el que fa

pensar que a 9q podria estar localitzat un gen específic de càncer de bufeta. Aquesta pèrdua d'heterozigositat en el braç llarg d'aquest cromosoma s'observa a quasi tots els tumors pTa, mentre que si ens fixem en tumors infiltrants s'observa en menys del 50%, aquestes dades indicarien que probablement en aquest braç hi ha localitzat un gen supressor de tumors responsable del desenvolupament de tumors superficials, i que aquells tumors superficials que evolucionessin cap a infiltrants serien també portadors d'aquesta alteració. Els tumors infiltrants que no la presentessin seguirien altres vies d'evolució o bé derivarien d'altres alteracions neoplàsiques com pot ser un CIS. D'altra banda, Dalbagni i col. (1993) van realitzar un estudi de LOH en aquest tipus de tumors i en cap cas van observar la pèrdua de 9q, en aquests casos es va suggerir que alteracions a *TP53* en aquests tumors serien responsables de l'inici de la carcinogènesi (Dalbagni et al. 1993; Spruck et al. 1994). La pèrdua del cromosoma 9 és independent de la sobre-expressió de *TP53*, fet que suggereix que ambdues alteracions són conseqüència de mecanismes d'inestabilitat diferents (Sauter et al. 1995b).

Altres autors (Ruppert et al. 1993; Orlow et al. 1994) també han descrit que la majoria de tumors d'estadi pTa presenten alteracions a 9q, però d'altra banda van observar que els estadis pT1 presenten alteracions tant al braç llarg com al braç curt d'aquest cromosoma. Aquests resultats els van portar a suggerir que la pèrdua al·lèlica de 9p podia estar associada amb el desenvolupament de tumors superficials amb un comportament biològic més agressiu o bé amb una progressió més ràpida de la malaltia. S'ha de recordar que a 9p21 es localitzen els gens supressors de tumors *CDKN2A* i *CDKN2B*. Ambdós gens codifiquen per a proteïnes la funció de les quals és inhibir la fosforilació de la proteïna del retinoblastoma (pRB), la qual té un paper predominant en el control del cicle cel·lular (veure apartat destudis moleculars dels tumors urotelials, *RB1*). Delecions en homozigosi de 9p21.3 han estat descrites per mitjà d'estudis de CGH en microxips (Veltman et al. 2003).

Tenint en compte que els gens descrits es situen a 9p, cal pensar que com a mínim hi haurà un tercer gen supressor de tumors en aquest cromosoma situat a 9q. Habuchi i col. al 1995 van apuntar a que la regió candidata estaria a 9q13-q31. Posteriorment, Richter i col. (1998, 1999) mitjançant estudis de CGH van detectar pèrdues a una regió del braç llarg que delimitaria la descrita per Habuchi i col., i que es situava a 9q22-q23. Curiosament, sis anys abans Cairns i col. (1993) havien descrit dins d'aquesta regió un possible locus supressor a 9q22. Però aquesta no és la única regió del braç q que sembla estar implicada en la carcinogènesi de bufeta, ja que s'han descrit delecions en homozigosis a 9q32-q33 (Nishiyama et al. 1999b). Altres estudis han relacionat la pèrdua d'heterozigositat d'aquesta regió amb la recurrència, de manera que un 25%

dels casos que la manifesten posteriorment presenten recidives (Edwards et al. 2002). En aquesta regió del cromosoma 9 hi ha situat el gen *DBC1* que es postula per tant com un possible gen supressor de tumors (Nishiyama et al. 1999a). Un altre gen que es postula com candidat a gen supressor de tumors es *TSC1* situa a 9q34 (Van Tilborg et al. 1999).

Estudis de CGH en microxips han detectat pèrdues freqüents a 9q22.2, 9q22.32, 9q32 i 9q33.3 (Veltman et al. 2003).

A l'any 2000, Chow i col. van detectar la pèrdua d'heterocigositat a 9q en lesions hiperplàsiques de bufeta, aquest fet els va portar a concloure que la pèrdua del braç llarg d'aquest cromosoma era una alteració primerenca en el desenvolupament d'aquests tumors (Chow et al. 2000). Posteriorment Habuchi i col. (2001) van proposar que la hipermetilació d'aquesta regió podria ser també un fenomen implicat en el desenvolupament inicial dels TCC de bufeta.

La pèrdua del cromosoma 9 s'ha estudiat també per mitja d'anàlisis de FISH (Hopman et al. 1991) tot i que hem de tenir en compte que és una alteració que resulta en moltes ocasions infraestimada quan es realitzen aquests estudis, degut a que amb aquesta tècnica resulta més fàcil valorar els guanys que les pèrdues. Tot i així, autors com Wheelless i col. (1996) van demostrar que la presència d'una sola copia d'aquest cromosoma en cèl·lules procedents de rentats vesicals obtinguts després d'un tractament amb BCG de 6 setmanes de duració, fet que correlacionava significativament amb l'índex de recidives tumorals.

Tot i que com s'ha explicat fins ara aquest és un cromosoma que es caracteritza bàsicament per la seva pèrdua, també s'han descrit algunes amplificacions en tumors de bufeta a 9p21 i 9p24 (Sauter et al. 1995b; Simon et al. 2000).

Cromosoma 11: Aquest cromosoma és interessant perquè com es veurà a continuació presenta dades rellevants en molts sentits.

No s'han descrit mai tumors que presentin alteracions en aquest cromosoma com a única alteració, sinó que acostuma a acompanyar a pèrdues del cromosoma 9 (Fadl-Elmula et al. 2000).

S'han observat diverses translocacions en tumors de bufeta que afecten aquest cromosoma, algunes d'elles presentaven com a punt de trencament 11p15. Cal destacar que a 11p15 es troben localitzats els gens responsables del tumor de Wilm's (*WT1* i *WT2*), i *HRAS*, la qual cosa va fer pensar que aquests punts de trencament podrien estar implicats en el procés de carcinogènesi vesical, i de fet posteriorment, així s'ha demostrat com a mínim en el cas de *HRAS*. També s'han descrit

translocacions que afecten els braços llargs d'aquest cromosoma amb punts de trencament a 11q11-q23 (Sandberg and Berger 1994).

Una de les alteracions més freqüents que impliquen el cromosoma 11 és la pèrdua del braç curt; aquesta alteració es produeix entre un 21-55% dels TCC (Shipman et al. 1993), valor que oscil·la depenent de la tècnica utilitzada (anàlisis de cariotip, LOH, FISH o CGH). Estudis citogenètics van detectar que la pèrdua de 11p era més freqüent en tumors infiltrants que en els superficials (Gibas et al. 1984). Posteriorment Knowles i col. (1994) van associar també la pèrdua d'heterocigositat de 11p amb el grau i l'estadi tumoral.

La pèrdua de 11p13 en homozigosi s'ha descrit mitjançant estudis de CGH en microxips. Aquesta regió és important perquè conté els gens *TRAF6* i *RAG1*; la proteïna per la que codifica *TRAF* té un paper important com a regulador de la mort cel·lular i en respostes a processos d'estrès, mentre que el paper de la proteïna per la que codifica *RAG* està associat a processos de recombinació (Veltman et al. 2003).

Una revisió recent indica que la pèrdua de 11p és freqüent en els TCC urotelials (Fadl-Elmula 2005).

En el cas del cromosoma 11, a banda de la pèrdua 11p també és habitual la pèrdua de 11q (Kallioniemi et al. 1995; Voorter et al. 1995; Richter et al. 1999). En el cas de 11q cal destacar la regió 11q13, en la que s'han trobat diferents amplificacions (Richter et al. 1998; Koo et al. 1999), l'amplificació d'aquesta banda correlaciona amb l'amplificació del gen de la ciclina D1 (*CCND1*) (Bringuier et al. 1996; Huang et al. 2002), (gen del qual parlarem en més detall a l'apartat de estudis moleculars). Estudis recents relacionen amplificacions en aquesta banda amb altres gens que estarien implicats en el procés de carcinogènesi vesical, com són: *INT2*, *EMS1* i *PAK1* (Veltman et al. 2003).

Cromosoma 13: La deleció de 13q s'ha trobat en un 25% dels casos (Fadl-Elmula 2005). Knowles i col. (1994) van observar que les pèrdues al·lèliques a 13q estaven associades a tumors d'alt grau, tot i que poc abans ja s'havia descrit una associació amb l'estadi (Habuchi et al. 1993a). Posteriorment i emprant la tècnica de CGH, Kallioniemi i col. (1995) també van observar aquestes associacions entre la deleció de 13q, l'estadi i el grau. És per aquest motiu que diversos autors proposen la pèrdua del braç llarg del cromosoma 13 com a un element important a l'hora de la transició de tumors superficials a invasius (Dalbagni et al. 1993; Reznikoff et al. 1993; Fadl-Elmula 2005).

És interessant tenir en compte que les pèrdues al·lèliques de 13q es troben també freqüentment en els carcinomes *in situ* (CIS) (Rosin et al. 1995).

Cal recordar que en aquest cromosoma, concretament a 13q14.1-q14.2 es troba el gen del retinoblastoma, que juga un paper molt important en el control del cicle cel·lular (veure apartat estudis moleculars, *RB1*). Pèrdues d'heterozigositat d'aquest gen s'han descrit en el 90% de tumors urotelials infiltrants (Fadl-Elmula 2005).

Tot i que el interès principal d'aquest cromosoma en relació al càncer de bufeta sembla estar en la pèrdua de part de la seva informació, també s'han descrit per mitjà d'estudis realitzats per CGH, la amplificació d'algunes regions; 13q34 (Richter et al. 1997, 1998) i 13q21-q31 (Koo et al. 1999).

Cromosoma 17: Aquest cromosoma l'igual que en el cas d'altres cromosomes, presenta un comportament clarament diferencial de p i q, de manera que mentre que el 17p té tendència a perdre's, 17q té tendència a presentar guany i fins i tot amplificacions; a més a més el fet de mencionar aquest cromosoma va sempre relacionat amb el comportament de *TP53* (localitzat a 17p13.1) un gen àmpliament estudiat en processos de carcinogènesi, i del que es parlarà més àmpliament en l'apartat d'estudis moleculars dels tumors de bufeta.

La presència d'aquesta pèrdua es present en aproximadament el 40% dels tumors de bufeta (Fadl-Elmula 2005). Es troba implicat de manera més significativament en tumors infiltrants (79%) que en tumors superficials (20%). Fadl-Elmula i col. (2000) proposen que aquells casos de TCC superficials que presenten la pèrdua de 17p, podrien representar un subgrup dins dels superficials amb tendència a presentar un comportament clínic més agressiu en el futur. S'ha suggerit que la pèrdua de 17p, combinada amb mutacions de *TP53* de l'altre cromosoma 17 podrien ser els responsables d'aquest comportament més agressiu d'alguns (16-25%) tumors superficials de bufeta (Fadl-Elmula 2005).

S'ha trobat també associació entre la deleció del braç curt d'aquest cromosoma i el grau histològic; i la seva detecció en els casos de pTis podria ser un indicador de mal pronòstic (Dalbagni et al. 1993; Kallioniemi et al. 1995; Erbersdobler et al. 1998).

Sauter i col. (1994) van observar diferències significatives en la prevalença de delecions de 17p entre tumors vesicals pTa i pT1, mentre que entre pT1 i pT2-T4 no eren significatives, això sembla indicar que les pèrdues al·lèliques de 17p coincideixen amb el desenvolupament del fenotip infiltrant del càncer vesical.

En diversos estudis de LOH del cromosoma 17, s'ha vist que les regions que majoritàriament es troben afectades són: 17p12-p13, 17q11-q11 i 17q24-q25 (Olumi et al. 1990; Presti et al. 1991b).

Richter i col. (1998) van detectar per CGH el guany de 17q21 i 17q25 en un 29% de tumors (no van estudiar cap pTa); altres treballs descriuen amplificacions en diferents

bandes, algunes de les quals coincideixen amb les descrites per aquests autors: 17p11.2-p12 (Hurst et al. 2004), 17q11-q21 (Hovey et al. 1998; Richter et al. 1998; Simon et al. 1998, 2000), 17q22-q23 (Voorter et al. 1995; Koo et al. 1999) i 17q24-q25 (Simon et al. 2000). A aquesta informació cal afegir que a 17q21 es localitza el gen *ERBB2*; que s'expressa en tumors d'elevat estadi i grau (Coombs et al. 1991; Moriyama et al. 1991; Coogan et al. 2004; Gallucci et al. 2005).

La polisomia 17 és un fet freqüent que s'observa en un 40% de TCC i s'associa al grau i estadi tumoral, de fet augmenta a mida que augmenta el grau i l'estadi; i ja s'observen diferències significatives en la prevalença de la polisomia 17 entre pTa (19%) i els pT1 (78%).

Cromosoma Y: La pèrdua d'aquest cromosoma s'acostuma a trobar en el 50% de tumors de bufeta masculins. En el cas de tumors de bufeta femenins no es troba aquesta elevada incidència de pèrdua dels cromosomes sexuals, és per això que es va postular que aquesta pèrdua podia estar relacionada amb l'edat dels pacients més que amb el procés tumoral. Diversos estudis realitzats al respecte han obtingut resultats contradictoris; Sandberg (1977) va fer un estudi citogenètic del que va concloure que aquesta alteració no estava relacionada amb l'edat dels homes que patien càncer vesical, sinó amb el fet de patir aquesta malaltia. Per altra banda, uns anys després, Sauter i col. (1995c) utilitzant tècniques d'hibridació *in situ* fluorescent van observar la pèrdua d'aquest cromosoma en homes sans, suggerint que la detecció d'aquesta alteració no era indicativa de tumor.

Cal tenir present que la pèrdua d'aquest cromosoma és un esdeveniment molt habitual que s'observa en diferents estudis emprant diferents tècniques, com CGH i FISH (Sauter et al. 1995c; Richter et al. 1997; Simon et al. 2000).

S'ha suggerit que els homes que presenten càncer de bufeta amb la pèrdua del cromosoma Y, tenen una pitjor evolució i són més resistents a les teràpies. S'ha de tenir en compte però, que la majoria dels tumors (65%) amb aquesta alteració corresponia a estadis avançats de la malaltia i un cariotip complexa. Els casos en que aquesta alteració era única corresponien a tumors no invasius i de baix grau (Sandberg and Berger 1994).

2.7.2 ESTUDIS MOLECULARS

El camp de la biologia molecular també ha aportat nombroses dades relacionades amb el procés de la carcinogènesi. Tenen un especial interès les proteïnes implicades en el control del cicle cel·lular, ja que la progressió tumoral depèn en bona part de la

presència d'alteracions en el control de la proliferació; també són importants les proteïnes implicades en la via de la transducció de senyals, les molècules d'adhesió donat que estan implicades en els processos d'invasió d'altres teixits i en el desenvolupament de metàstasis, ja que la separació de les cèl·lules tumorals de la lesió primària, es considera un dels primers passos en el procés d'invasió d'altres teixits.

S'han publicat diversos treballs en els que es proposen recopilacions de gens que es trobarien alterats en el procés de carcinogènesi vesical (Sandberg 2002; Duggan et al. 2004), però aquests llistats creixen contínuament gràcies al treball d'un gran nombre de grups que fan recerca molecular dels tumors vesicals. A continuació es citaran part dels gens descrits fins avui dia relacionats amb la carcinogènesi vesical (Taula II):

Taula II: Resum dels gens més representatius implicats en el càncer de bufeta.

Cromosoma 1			
Banda	Símbol	Nom complert	Sinònims
1p36.3	<i>TP73</i>	tumor protein p73	p53-like transcription factor, p53-related protein, P73, tumor protein p73
1p13.3	<i>GSTM1</i>	Glutathione S-transferase Mu 1	glutathione S-transferase M1, GST1, GST class-mu 1, GSTM1-1, GSTM1a-1a, GSTM1b-1b, GTH4, GTM1, H-B, HB subunit 4, MGC26563, MU, MU-1
1p13.2	<i>NRAS1</i>	Transforming protein N-Ras	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog, N-ras, NRAS1
1q25.2-q25.3	<i>PTGS2</i>	Prostaglandin G/H synthase 2 precursor	COX2, COX-2, Cyclooxygenase-2, hCox-2, PGG/HS, PGHS-2, PGH synthase 2, PHS-2, PHS II, Prostaglandin-endoperoxide synthase 2, prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase), Prostaglandin H2 synthase 2
Cromosoma 3			
Banda	Símbol	Nom complert	Sinònims
3p25	<i>RAF1</i>	RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase	cRaf, CRAF, c-Raf, C-RAF, RAF, Raf-1, v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
3p14.2	<i>FHIT</i>	Bis(5'-adenosyl)-triphosphatase	AP3Aase, AP3AASE, AP3A hydrolase, Diadenosine 5',5'''-P1,P3-triphosphate hydrolase, Dinucleosidetriphosphatase, FRA3B, fragile histidine triad gene, Fragile histidine triad prote
Cromosoma 4			
Banda	Símbol	Nom complert	Sinònims
4p16.3	<i>FGFR3</i>	Fibroblast growth factor receptor 3 precursor	ACH, CEK2, FGFR-3, HSFGR3EX, JTK4
4q25	<i>EGF</i>	Pro-epidermal growth factor precursor	epidermal growth factor (beta-urogastrone), URG
Cromosoma 5			
Banda	Símbol	Nom complert	Sinònims
5p14-p15.1	<i>TRIO</i>	Triple functional domain protein	PTPRF interacting protein, triple functional domain (PTPRF interacting)
Cromosoma 6			
Banda	Símbol	Nom complert	Sinònims
6p23	<i>DEK</i>	DEK protein	D6S231E, DEK oncogene (DNA binding)
6p22.3	<i>SOX4</i>	Transcription factor SOX-4	EVI16, SRY (sex determining region Y)-box 4
6p22	<i>E2F3</i>	Transcription factor E2F3	E2F-3, E2F transcription factor 3, KIAA0075
6p21.1	<i>CDKN1A</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1	CAP20, CDK-interacting protein 1, CDKN1, CIP1, MDA6, MDA-6, Melanoma differentiation associated protein 6, p21, P21, PIC1, SDI1, WAF1

Continuació Taula II: Resum dels gens més representatius implicats en el càncer de bufeta.

Cromosoma 7			
Banda	Símbol	Nom complet	Sinònims
7p12	<i>EGFR</i>	Epidermal growth factor receptor precursor	ERBB, ERBB1, mENA, Receptor tyrosine-protein kinase ErbB-1
Cromosoma 8			
Banda	Símbol	Nom complet	Sinònims
8p23.1-p21.3	<i>NAT1</i>	Arylamine N-acetyltransferase 1	AAC1, Arylamide acetylase 1, MNAT, N-acetyltransferase 1 (arylamine N-acetyltransferase), N-acetyltransferase type 1, NAT-1
8p22	<i>NAT2</i>	Arylamine N-acetyltransferase 2	AAC2, Arylamide acetylase 2, N-acetyltransferase 2 (arylamine N-acetyltransferase), N-acetyltransferase type 2, NAT-2, PNAT
8p12	<i>FGFR1</i>	Basic fibroblast growth factor receptor 1 precursor	BFGFR, bFGF-R, CEK, c-fgr, C-FGR, FGFBR, FGFR-1, FLG, FLT2, Fms-like tyrosine kinase-2, H2, H3, H4, H5, KAL2, N-SAM
8p12-p11.2	<i>PPP2CB</i>	Serine/threonine protein phosphatase 2A, catalytic subunit, beta isoform	PP2A-beta, PP2CB
8p12-p11	<i>POLB</i>	DNA polymerase beta	EC 4.2.99.
8q24	<i>MYC</i>	Myc proto-oncogene protein	c-myc, c-Myc, Transcription factor p64, v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
Cromosoma 9			
Banda	Símbol	Nom complet	Sinònims
9p21	<i>CDKN2A</i>	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor A	ARF, CDK4I, CDKN2, CMM2, INK4, INK4a, MLM, MTS1, Multiple tumor suppressor 1, p14, p14ARF, p16, p16INK4, p16-INK4, p16-INK4a, p19, TP16
9p21	<i>CDKN2B</i>	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B	INK4B, MTS2, Multiple tumor suppressor 2, p14-INK4b, P15, p15-INK4b, TP15
9p13	<i>PAX5</i>	Paired box protein Pax-5	B-cell specific transcription factor, BSAP, paired box gene 5 (B-cell lineage specific activator)
9q11-q22	<i>ANXA1</i>	Annexin A1	annexin A1, Annexin I, ANX1, Calpactin II, Chromobindin 9, Lipocortin I, LPC1, P35, Phospholipase A2 inhibitory protein
9q21.3-q22	<i>GAS1</i>	Growth-arrest-specific protein 1 precursor	GAS-1, growth arrest-specific 1
9q22.1-q31	<i>PATCH</i>	Patched protein homolog 1	BCNS, HPE7, NBCCS, patched, patched homolog (Drosophila), PTC, PTC1, PTCH1
9q32-q33	<i>DBC1</i>	deleted in bladder cancer 1	DBCCR1, FAM5A, HGNC:2688
9q33	<i>GSN</i>	Gelsolin precursor	Actin-depolymerizing factor, ADF, AGEL, Brevin
9q34	<i>TSC1</i>	Hamartin	hamartin, KIAA0243, LAM, TSC, tuberous sclerosis 1, Tuberous sclerosis 1 protein
Cromosoma 10			
Banda	Símbol	Nom complet	Sinònims
10q23	<i>PTEN</i>	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase PTEN	BZS, MGC11227, MHAM, MMAC1, Mutated in multiple advanced cancers 1, phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1), PTEN1, TEP1
10q25.3-q26	<i>FGFR2</i>	Fibroblast growth factor receptor 2 precursor	BEK, BFR-1, CEK3, CFD1, ECT1, FGFR-2, JWS, Keratinocyte growth factor receptor 2, KGFR, KSAM, K-SAM, TK14, TK25
Cromosoma 11			
Banda	Símbol	Nom complet	Sinònims
11p15.5	<i>IGF2</i>	Insulin-like growth factor II precursor	IGF-II, insulin-like growth factor 2 (somatomedin A), Somatomedin A
11p15.5	<i>HRAS</i>	Transforming protein p21/H-Ras-1	c-H-ras, HRAS1, K-ras, N-ras, RASH1, v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
11q13	<i>FGF3</i>	INT-2 proto-oncogene protein precursor	FGF-3, Fibroblast growth factor-3, fibroblast growth factor 3 (murine mammary tumor virus integration site (v-int-2) oncogene homolog), HBGF-3, INT2
11q13	<i>CCND1</i>	G1/S-specific cyclin D1	BCL1, BCL-1 oncogene, cyclin D1, D11S287E, HGNC:988, PRAD1, PRAD1 oncogene, U21B31
11q13	<i>CTTN</i>	Src substrate cortactin	1110020L01Rik, Amplexin, cortactin, EMS1, Oncogene EMS1
11q22	<i>BIRC2</i>	Baculoviral IAP repeat-containing protein 2	API1, baculoviral IAP repeat-containing 2, cIAP1, C-IAP1, HIAP2, hiap-2, Hiap-2, HIAP2, IAP2, IAP homolog B, Inhibitor of apoptosis protein 2, MIHB, RNF48, TNFR2-TRAF signaling complex protein 2

Continuació Taula II: Resum dels gens més representatius implicats en el càncer de bufeta.

Cromosoma 11			
Banda	Símbol	Nom complert	Sinònims
11q22	<i>BIRC3</i>	Baculoviral IAP repeat-containing protein 3	AIP1, API2, Apoptosis inhibitor 2, baculoviral IAP repeat-containing 3, cIAP2, CIAP2, C-IAP2, HAIP1, HIAP1, hiap-1, HIAP-1, IAP1, IAP homolog C, Inhibitor of apoptosis protein 1, MALT2, MIHC, RNF49, TNFR2-TRAF signaling complex protein 1
Cromosoma 12			
Banda	Símbol	Nom complert	Sinònims
12p13.1-p12	<i>CDKN1B</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	CDKN4, Cyclin-dependent kinase inhibitor p27, KIP1, p27Kip1, P27KIP1
12p12.1	<i>KRAS</i>	Transforming protein p21	c-K-ras, C-K-RAS, Ki-Ras, Ki-RAS, KRAS1, KRAS2, K-Ras 2, K-RAS2A, K-RAS2B, K-RAS4A, K-RAS4B, RASK2, v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
12q13	<i>CDK4</i>	Cell division protein kinase 4	CMM3, cyclin-dependent kinase 4, Cyclin-dependent kinase 4, MGC14458, PSK-J3
12q13-q14	<i>MDM2</i>	Ubiquitin-protein ligase E3 Mdm2	Double minute 2 protein, hdm2, Hdm2, MGC71221, Oncoprotein Mdm2, p53-binding protein Mdm2
13q14.2	<i>RB1</i>	Retinoblastoma-associated protein	OSRC, P105-RB, PP110, RB, retinoblastoma 1 (including osteosarcoma)
Cromosoma 17			
Banda	Símbol	Nom complert	Sinònims
17p13.1	<i>TP53</i>	Cellular tumor antigen p53	Antigen NY-CO-13, Cys51Stop, p53, P53, Phosphoprotein p53, TRP53, tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome), Tumor suppressor p53
17q11.2	<i>NF1</i>	Neurofibromin	Neurofibromatosis-related protein NF-1, NFNS, VRNF, WSS
17q11.2-q12	<i>ERBB2</i>	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2 precursor	C-erbB-2, c-erb B2, HER2, HER-2, HER-2/neu, MLN 19, NEU, NEU proto-oncogene, NGL, p185erbB2, TKR1, Tyrosine kinase-type cell surface receptor HER2
17q11.2-q21.1	<i>CCL2</i>	Small inducible cytokine A2 precursor	chemokine (C-C motif) ligand 2, GDCF-2, GDCF-2 HC11, HC11, HSMCR30, MCAF, MCP1, MCP-1, MGC9434, Monocyte chemoattractant protein-1, Monocyte chemotactic and activating factor, Monocyte chemotactic protein 1, Monocyte secretory protein JE, SCYA2, SMC-CF
17q21.2	<i>KRT20</i>	Keratin, type I cytoskeletal 20	CK20, CK 20, Cytokeratin 20, K20, keratin 20, KRT21, MGC35423, Protein IT
17q25	<i>TIMP2</i>	Metalloproteinase inhibitor 2 precursor	CSC-21K, TIMP-2, tissue inhibitor of metalloproteinase 2, Tissue inhibitor of metalloproteinases -2
Cromosoma 18			
Banda	Símbol	Nom complert	Sinònims
18q21.1	<i>DCC</i>	Netrin receptor DCC precursor	Colorectal cancer suppressor, CRC18, CRCR1, deleted in colorectal carcinoma, Tumor suppressor protein DCC
18q21.1	<i>SMAD4</i>	Mothers against decapentaplegic homolog 4	Deletion target in pancreatic carcinoma 4, DPC4, hSMAD4, JIP, MADH4, Mothers against DPP homolog 4, SMAD 4
Cromosoma 19			
Banda	Símbol	Nom complert	Sinònims
19p13.2	<i>JUNB</i>	Transcription factor jun-B	jun B proto-oncogene
19q13.1	<i>UPK1A</i>	Uroplakin-1a	MGC14388, UPIa, UPIA, UPKa, UPKA, uroplakin 1A, Uroplakin Ia
19q12	<i>CCNE1</i>	G1/S-specific cyclin E1	CCNE, cyclin E1
Cromosoma 20			
Banda	Símbol	Nom complert	Sinònims
20q13.2	<i>ZNF217</i>	Zinc finger protein 217	ZABC1, zinc finger protein 217

A continuació es comentaran més àmpliament alguns gens i proteïnes amb especial rellevància en el càncer de bufeta:

Control del cicle cel·lular

TP53: Gen localitzat a 17p13. És el gen més àmpliament estudiat perquè fins a l'actualitat és el gen que es troba alterat amb major freqüència en les neoplàsies humanes, entre elles la de bufeta. (Vogelstein 1990; Hollstein et al. 1991; Levine et al. 1991). *TP53* es coneix com "el guardià del genoma" ja que és l'encarregat de mantenir la integritat genòmica en front als possibles danys que es puguin causar en el DNA; quan un dany es detecta augmenta la quantitat de proteïna provocant la detenció del cicle cel·lular (actua en la transició entre la fase G1 i la fase S), això permet que el dany es repari i impedeix la propagació del mateix; d'altra banda si el dany és massa important p53 indueix l'apoptosi. Les cèl·lules amb mutacions o pèrdues a *TP53* no poden portar a terme aquestes funcions amb la qual cosa són incapaces d'aturar el procés neoplàsic.

p53 funciona com un factor de transcripció, activant l'expressió dels gens que controlen la transició entre les diferents fases del cicle cel·lular, l'apoptosi, la reparació del DNA i l'angiogènesi (Chang et al. 1995; Balint and Vousden 2001).

La seva vida mitja és molt curta, per altra banda aquesta es perllonga de manera considerable quan presenta una mutació de tipus canvi de sentit, que és l'alteració més freqüent que pateix *TP53*, això fa que s'acumuli en el nucli de la cèl·lula, fet que fa que resulti fàcilment detectable per immunohistoquímica. Altres mètodes per detectar aquestes alteracions són l'estudi de polimorfismes conformacionals de cadenes simples (SSCP, de l'anglès: *Single Strand Conformation Polymorphism*), per RT-PCR i la seqüenciació de les regions codificants de *TP53*.

D'altra banda, Sidransky i col. (1991) van demostrar la relació entre les deleccions de 17p i les mutacions de *TP53*; de manera que el que aquests autors postulaven era que la mutació d'un dels al·lels de *TP53* i la posterior pèrdua de l'altre al·lel, eren una seqüència de fets lligats amb el caràcter agressiu dels tumors de bufeta.

Diferents estudis han relacionat la inactivació de *TP53* amb característiques clíniques, principalment amb alt grau i estadi tumoral avançat així com l'associació amb CIS (Holmang et al. 2001; Hartmann et al. 2002; Wu 2005). Altres estudis havien observat que la inactivació de *TP53* en pTis s'associava a progressió, i que aquest era l'únic factor pronòstic independent associat a una pitjor supervivència específica (Sarkis et al. 1994).

De totes maneres els resultats dels nombrosos estudis que s'han realitzat amb càncer de bufeta i *TP53* són en moltes ocasions contradictoris, pel que fa sobretot al intent d'establir relacions entre els nivells d'expressió i el pronòstic dels pacients, bé sigui en relació a un tractament o a la supervivència (Malats et al. 2005).

CCND1: El gen de la ciclina D1 (*CCND1*) es troba situat en el cromosoma 11, concretament a 11q13, aquesta és una regió que es troba guanyada o amplificada en un elevat percentatge de carcinomes urotelials d'alt grau.

A principis dels anys 90 es van descobrir les quinases dependents de ciclins (cdk), aquestes proteïnes treballen per mitjà de la seva unió amb les ciclins; de manera que promouen el pas de G1 a S, dins el cicle cel·lular. Aquests complexos són coneguts per fosforilar el producte del gen del retinoblastoma (*RB1*) i promoure d'aquesta manera el pas a la fase S; uns exemples d'aquests complexos són les unions de Cdk4 i ciclina D1, i Cdk2 i ciclina E. Amb aquesta fosforilació de la proteïna del retinoblastoma, el que s'aconsegueix és la inhibició de l'activitat supressora de la proliferació cel·lular.

Els factors de creixement indueixen l'expressió de ciclina D1, i regulen la unió d'aquesta amb cdk fosforilades. La ciclina E fosforila proteïnes relacionades amb la proteïna pRb.

La fosforilació i defosforilació de residus serina/treonina de cdk és un mecanisme de control d'aquest cicle.

S'han descrit múltiples inhibidors de les cdk com són *CDKN2A* (p16, p14arf) i *CDKN2B* (p15) (es troben localitzats a 9p21, com ja s'ha esmentat anteriorment, aquesta és una regió de freqüent pèrdua en tumors de bufeta), *CDKN2C* (p18) (localitzat a 1p32, aquest és un punt calent per la pèrdua d'heterocigositat), *CDKN1A* (p21) (localitzat a 6p21.1) i *CDKN1C* (p57) (localitzat en el cromosoma 11p, aquest també és un punt calent per la pèrdua d'heterocigositat).

L'expressió disminuïda de ciclina D1 s'ha associat a recidives de tumors superficials, de manera especial si es valora conjuntament amb p27 i ki-67 (Sgambato et al. 2002).

S'han descrit correlacions significatives entre el guany de *CCND1* i la pèrdua *TP53*, i també entre els guanys de *CCND1* i *E2F3* (Veltman et al. 2003).

CDKN2A (p16, p14arf): És un gen supressor de tumors localitzat a 9p21 que codifica per dos productes amb *splicing* alternatiu: p16 i p14arf (Sherr 2001). Participa en les vies del retinoblastoma i de *TP53* en el control del cicle cel·lular. Si bé les mutacions d'aquest gen són poc freqüents en tumors urotelials, s'han detectat pèrdues en heterozigosi i homozigosi en un 30-50% d'aquests tumors. S'ha observat també la inactivació del gen per metilació (Wu 2005).

CDKN1A (p21): Es troba localitzat a 6p21.1. És un gen supressor tumoral per la seva capacitat d'unió i inhibició de la activitat fosforilativa de les quinases dependents de ciclins.

L'expressió es troba regulada de manera directa per p53, de fet la parada del cicle cel·lular que provoca p53 quan es produeix un dany en el DNA, s'efectua a través de p21. El factor de creixement epidèrmic i el factor de creixement de fibroblasts poden també induir l'expressió de *CDKN1A* en les cèl·lules de carcinomes escamosos deficients en *TP53* (Cao et al. 2000). Aquest fet suggereix que tot i estar mutat *TP53*, l'expressió de *CDKN1A* podria estar conservada, i per tant també el control del cicle cel·lular.

Pel que fa a la relació de *CDKN1A* i el càncer de bufeta, Stein i col. (1998) van realitzar un estudi en pacients als que s'havia realitzat una cirurgia radical i després d'un seguiment perllongat, es va associar l'absència d'expressió de *CDKN1A* a una major probabilitat de recidiva i a una supervivència reduïda.

D'altra banda estudis d'immunohistoquímica han indicat que en carcinomes *in situ* l'existència d'un fenotip amb les proteïnes p53 i p21 mutades, representa un risc més elevat de recidives, progressió i mortalitat (Shariat et al. 2003).

RB1: El gen supressor del retinoblastoma es localitza en el cromosoma 13, concretament a 13q14, i es troba mutat en la majoria de casos de retinoblastoma, tumor del que rep el nom; es troba mutat també en un terç dels tumors de bufeta (Horowitz et al. 1990), també s'han identificat alteracions de l'expressió en un terç dels carcinomes de bufeta (Logothetis et al. 1992). S'ha vist que l'expressió alterada de *RB1* es correlaciona amb una major gravetat i la reducció de la supervivència del pacient (Cordon-Cardo et al. 1992).

Té un paper predominant en el control del cicle cel·lular, i codifica per una fosfoproteïna nuclear que regula la progressió a través de la fase G1 del cicle cel·lular. La proteïna quan no es troba fosforilada (forma activa) es predominant a la fase G1 i realitza un efecte supressor del creixement cel·lular; quan es fosforila per l'acció de diferents complexos com són Ciclina E/cdk2 o Ciclina D1/cdk4, es promou el pas de G1 a S, i per tant la progressió cel·lular.

En alguns estudis clínics la pèrdua d'expressió de *RB1* es va associar a alt grau i estadi avançat (Ishikawa et al. 1991). En estudis posteriors s'ha correlacionat aquesta pèrdua amb progressió en càncers de bufeta avançats (Logothetis et al. 1992) o bé amb una supervivència menor (Cordon-Cardo et al. 1992).

Tot i que a la literatura trobem resultats contradictoris, estudis realitzats per Cote i col. (1998) suggereixen la utilitat de combinar la informació de *RB1* i *TP53* com a marcadors de pronòstic del càncer de bufeta, de manera que quan ambdós són normals la taxa de recurrència és menor, mentre que quan ambdós estan alterats aquesta taxa augmenta significativament; van observar també que els pacients que

presentaven alterada únicament una de les proteïnes, presentaven taxes de recidiva intermèdies.

Vies de transducció de senyals

H-RAS: Va ser el primer oncogen identificat en els carcinomes urotelials, es troba localitzat a 11p15.5. Formant part d'una família d'oncògens que codifiquen per la proteïna p21, i que es troben amb freqüència activats en els tumors humans.

Aquest gen està implicat en el desenvolupament i la progressió del càncer de bufeta; i es troba alterat entre un 30-40% dels carcinomes urotelials (Wu 2005).

Alguns estudis han posat de manifest que la sobre-expressió de *H-RAS* és suficient per produir tumors urotelials, i que l'activació de la via d'aquest gen juga un paper fonamental en la tumorigènesi dels tumors papil·lars superficials de baix grau; aquests mateixos estudis apunten també que la hiperplàsia d'uroteli juga també un paper important com a precursora d'aquest mateix tipus de tumors (Zhang et al. 2001).

FGFR3: Localitzat a 4p16.3, és un receptor de tirosina quinases que pertany a una família de gens molt ben conservada, que es classifica en quatre subgrups (*FGFR1*, *2*, *3*, i *4*), els quals s'uneixen a factors de creixement de fibroblasts amb diferents afinitats. Aquests receptors de tirosines quinases regulen diversos processos cel·lulars entre ells el desenvolupament embrionari, creixement cel·lular, la diferenciació, la migració i l'angiogènesi, depenent del tipus cel·lular i del moment del desenvolupament (Ornitz and Itoh 2001; Bakkar et al. 2003).

Inicialment es van descriure mutacions a *FGFR3* relacionades amb problemes de desenvolupament ossi, el lligam amb processos de tumorigènesi és més recent, però afecta a una diversitat de tipus tumorals, com són els mielomes múltiples (10-15%), el càncer de cèrvix (<5%) i els carcinomes urotelials (aprox. 50%) (Cappellen et al. 1999; Li et al. 1999), encara que de manera poc freqüent també s'ha descrit en altres tipus de tumors. És per tant especialment important el seu paper en els tumors urotelials i més concretament en els papil·lars superficials de baix grau, ja que en un 70% d'aquests es troben mutacions d'aquest gen, mentre que en el cas dels invasius es troben mutacions només en un 10-20 % (Wu 2005).

Altres estudis (Bakkar et al. 2003) han posat de manifest que *FGFR3* presenta mutacions de manera preferent en tumors pTa i de baix grau, mentre que *TP53*, té una clara predominança en tumors invasius i en graus avançats, per tant aquests treballs proposen que les mutacions d'aquests gens marcarien dues vies independents en el

desenvolupament dels tumors urotelials (Bakkar et al. 2003; van Rhijn et al. 2004; Wu 2005).

Alguns estudis recents apunten a que el paper que juguen les mutacions de *FGFR3* dins els processos de carcinogènesi estarien relacionats amb la via de senyalització de Ras. Les mutacions de *HRAS* i *FGFR3* es produeixen en un 30-70% dels casos de tumors papil·lars superficials de baix grau, això indicaria que l'activació d'aquesta via podria ser responsable de la formació de la majoria d'aquests tumors, tot i que no està clar si ambdós gens es trobarien mutats de manera simultània, ja que en altres tumors epitelials s'ha vist que rarament es troben mutats alhora components d'una mateixa via de senyalització (Wu 2005).

A més a més de que *FGFR3* i altres receptors de tirosina quinases, com són *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB3* i *ERBB4* es troben habitualment sobre-expressats en carcinomes d'uroteli; és interessant destacar el fet que *ERBB3* i *ERBB4* s'han relacionat recentment amb tumors papil·lars superficials de baix grau (Memon et al. 2004), mentre que *EGFR* i *ERBB2* estan freqüentment associats amb tumors invasius, i fins i tot en alguns casos se'ls ha considerat com a marcadors de mal pronòstic (Messing 1992; Lipponen and Eskelinen 1994; Coogan et al. 2004).

Adhesió cel·lular

Les molècules d'adhesió, com ja s'ha dit anteriorment, tenen també un paper important ja que són les encarregades de mantenir tant la unió entre cèl·lules com la unió d'aquestes a la matriu extracel·lular. L'alteració d'aquestes molècules podria afavorir la invasió tumoral a altres teixits i a altres òrgans (metàstasi).

Un exemple clàssic d'aquest grup són les cadherines, els gens que codifiquen aquestes molècules es consideren gens supressors, i canvis en els seus nivells d'expressió o canvis en la seva funció es relacionen amb progressió tumoral.

La E-cadherina, actua com a supressor de la invasió i la metàstasi en cèl·lules tumorals epitelials. En tumors urotelials s'ha trobat una correlació entre la pèrdua d'expressió d'aquesta cadherina (analitzada per immunohistoquímica), i una major agressivitat tumoral, tant en els casos de tumors vesicals, com de pelvis renal i d'urèter. Hi ha estudis on es relaciona aquesta pèrdua també amb progressió i una menor supervivència (Bringuier et al. 1993; Ross et al. 1995; Gontero et al. 2004).

2.8 MODELS DE PROGRESSIÓ DELS TUMORS DE BUFETA

Com ja s'ha dit anteriorment, han estat molts els estudis tant de citogenètica com de genètica molecular que s'han realitzat, la informació que s'ha anat obtenint d'aquests estudis ha fet que al llarg del temps s'hagin proposat diferents models d'hipotètics de desenvolupament del càncer de bufeta (Reznikoff et al. 2000; Sandberg 2002; Wu 2005).

Una de les coses amb la que coincideixen bona part dels autors, és en el paper fonamental que té el cromosoma 9 en la proliferació cel·lular anormal en molts tumors de bufeta. La gran majoria situa les alteracions del cromosoma 9 (la pèrdua d'aquest cromosoma, o com a mínim la pèrdua del seu braç llarg) com un dels primers passos dins la carcinogènesi urotelial; tot i que encara avui no està definit quin és el esdeveniment genètic responsable de l'inici d'aquest càncer. El fet és que els esdeveniments que succeeixen a aquestes alteracions del cromosoma 9 tampoc no estan clars, i això ha fet que s'hagin proposat gran nombre de models d'evolució d'aquests tumors.

Sembla però que la majoria d'autors coincideixen en que el càncer de bufeta està associat de manera majoritària amb pèrdua de supressors tumorals, o amb la pèrdua d'heterozigositat de diversos gens, tot i que també (en menor freqüència) s'observen guanys, sobre-expressió o amplificacions de gens.

El que si s'observa de manera constant en els diferents esquemes és la participació de nombrosos esdeveniments genètics, en un procés que acabarà esdevenint en un tumor de bufeta.

Es poden trobar models que es basen exclusivament en dades moleculars, altres basats en dades citogenètiques, n'hi ha també que es basen en resultats obtinguts per mitjà de la hibridació genòmica comparada, també n'hi ha que utilitzen informació de diverses metodologies. Com a exemple d'aquesta diversitat de models hipotètics de progressió, tot seguit s'inclouran alguns models que representen part del ampli ventall que es pot trobar a la literatura.

El model de Sandberg (Sandberg 1992) mostra una única via de desenvolupament, i explica l'evolució de la carcinogènesi vesical com un procés lineal, d'acumulació d'alteracions; on el cromosoma 9 es trobaria associat a estadis inicials de la tumorigènesi, vinculant aquest cromosoma a la proliferació cel·lular, les alteracions s'anirien succeint de manera que l'aparició d'alteracions en els cromosomes 5, 18 i 6 serien claus per la progressió i metàstasi (Figura 2).

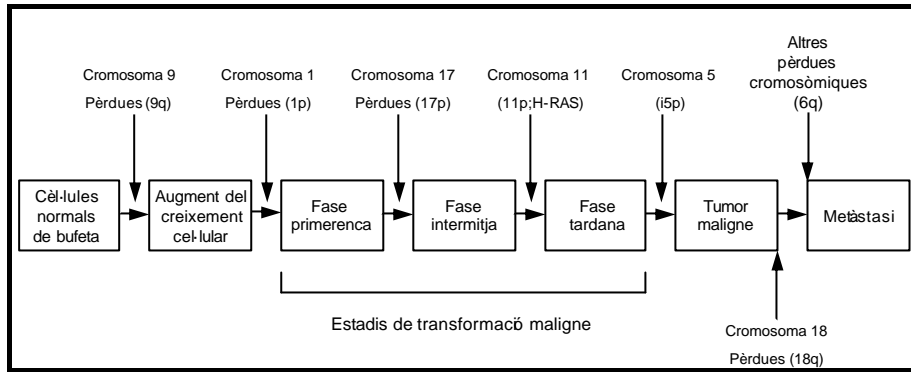


Figura 2: Adaptació del model proposat per Sandberg (1992).

El model proposat per Knowles (1998) mostra també dues vies d'evolució que conduïrien cap a la carcinogènesi vesical; les quals generarien tumors superficials amb diferents morfologies. L'ordre d'aparició de les alteracions genètiques determinaria el fenotip i la capacitat de progressió d'aquests tumors (Figura 3).

En aquest esquema l'autor hi reflecteix informació sobre la inactivació de *TP53* i *RB* per tal d'aportar informació de progressió, i de la possible resposta a la teràpia per part del pacients. Cal destacar que a nivell citogenètic predominen les pèrdues, de manera que aquest model es basa en la importància del paper de gens supressors i de la inactivació de diferents gens com a passos clau en aquest procés de carcinogènesi.

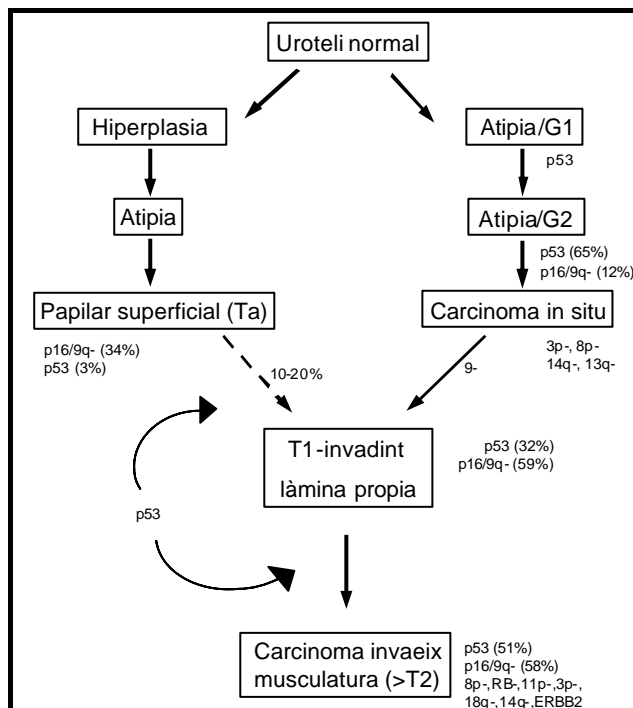


Figura 3: Model citogenètic-molecular proposat per Knowles (1998).

El model proposat per Richter i col. (1998) és força complexa i està basat en resultats obtinguts per mitjà d'hibridació genòmica comparada, per tal d'explicar el desenvolupament i la progressió dels tumors de bufeta. Cal destacar el gran nombre d'alteracions que s'hi observen. Les delecions de 5q, 6q i 15q i els guanys de 5p, 7p i Xq els presenten com significativament més freqüents en pT2-T4 que en els pT1, per tant aquests loci podrien contenir gens importants per la progressió del càncer de bufeta. També destaquen que la pèrdua del cromosoma 9 i el guany de 11q13 són significativament més freqüents en tumors papil·lars que en els sòlids, fet que els fa postular la importància d'aquestes alteracions en els diferents patrons de creixement (Figura 4).

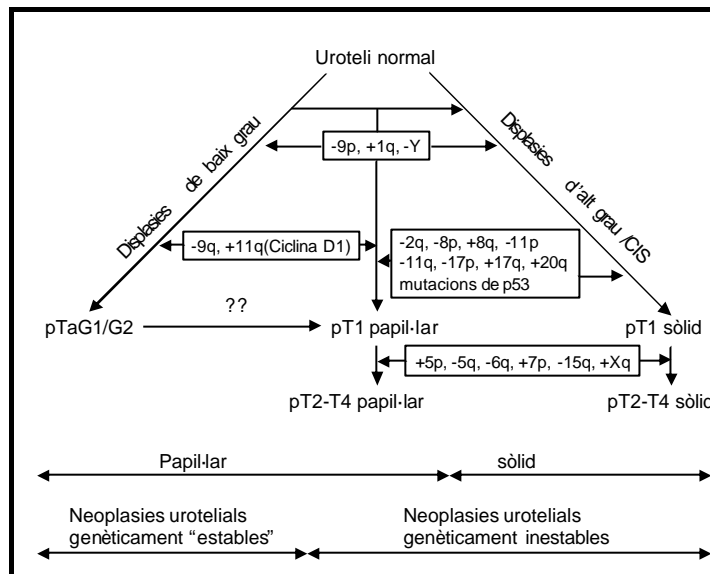


Figura 4: Model citogenètic molecular proposat per Richter i col. (1998).

El model proposat per Höglund i col. (2001a) mostra dues vies per el desenvolupament del càncer de bufeta (Figura 5). Una d'elles s'iniciaria amb la pèrdua del cromosoma 9 (seria la via que seguirien aquells tumors que debuten com pTa i que després progressen cap a infiltrants) seguida de $-11p$ i $+1q$; mentre que l'altra començaria amb el guany del cromosoma 7 (aquesta presentaria una correlació amb els estadis pT1-T3), seguida de $-8p$ i $+8q$. Tant la pèrdua del cromosoma 9 com el guany del 7 són esdeveniments que es produeixen de manera primerenca fet que indica que ambdues alteracions són, segons els autors, importants en els primers estadis de la tumorigènesi vesical. En els passos posteriors es troben involucrats un bon nombre de cromosomes tant en una via com en l'altra. Aquestes dues vies inicialment independents, convergrien en estadis avançats, ja que en aquests estadis el nombre d'alteracions acostuma a ser elevat.

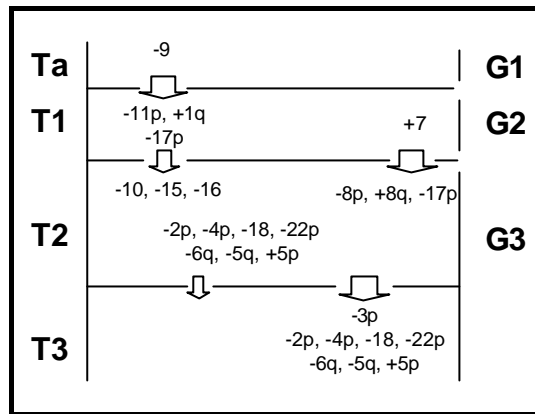


Figura 5: Model citogenètic proposat per Höglund i col. (2001).

El model proposat per Wu (Wu 2005) planteja dues possibles vies d'evolució. Una d'elles es caracteritzaria per mutacions de *H-RAS* (30-40%) i de *FGFR3* (70%) de manera primerenca. Posteriorment i associades a progressió es trobarien delecions de 8p, 11p, 13q i 14q. Una segona via caracteritzaria tumors invasius d'alt grau, i s'originaria a partir d'un carcinoma *in situ*, d'una displàsia severa, o bé *de novo*. La majoria dels tumors que anirien per aquesta via tindrien mutacions a *TP53* o bé a *RB1*; el 50% dels tumors que seguirien aquesta via, generarien metàstasi; per la qual cosa seria necessària la intervenció d'altres factors com ara alteracions en les molècules d'adhesió i factors de angiogènesi, entre altres (Figura 6).

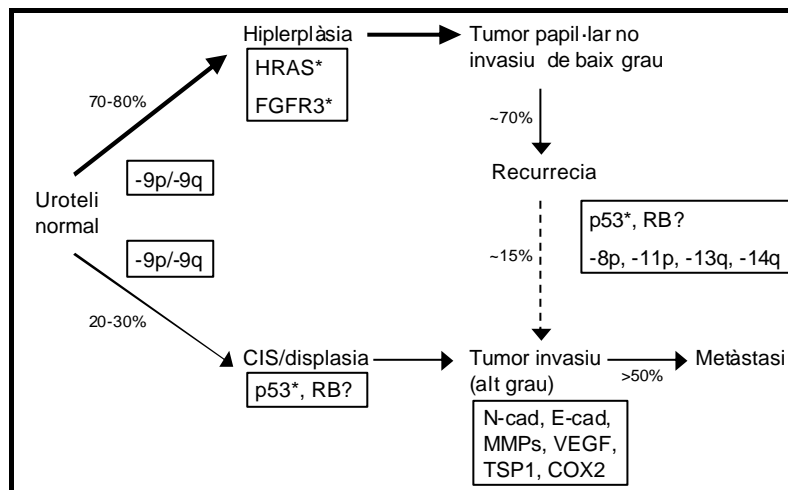


Figura 6: Model citogenètic molecular proposat per Wu (2005).

3. CÀNCER RENAL

3.1 GENERALITATS



El carcinoma renal fa referència a un grup de malalties que afecten l'epiteli dels túbuls renals i per tant, amb aquesta denominació s'exclouen els tumors de la pelvis renal i dels calzes.

El càncer renal es pot presentar, de forma esporàdica o de forma hereditària. La esporàdica és la forma més freqüent ja que representa un 95% del total de càncers renals.

Epidemiologia: El càncer renal representa al voltant del 2% de tots els càncers humans; amb un nombre aproximat de 190.000 casos nous diagnosticats, cada any al mon.

El carcinoma de cèl·lules renals, representa el 90% dels tumors renals que es donen en adults en membres dels dos sexes.

Es dona a tot el món, amb preferència en els països desenvolupats.

Diferències entre poblacions: La incidència és lleugerament superior a la població negra que a la població blanca.

Diferències entre sexes: És 1.6 vegades més freqüent en l'home que en la dona. En àrees industrialitzades passa a ser el 6^è tipus de càncer més comú, en homes juntament amb el limfoma de Hodgkin, mentre que en àrees poc desenvolupades baixa fins a la posició 16. En el cas de les dones es mou entre les posicions 12 i 17, en funció també del desenvolupament de cada regió.

Edat: L'edat d'aparició acostuma a ser entre els 50 i els 60 anys.

Etiologia: Les causes que originen aquesta malaltia són nombroses, però s'han identificat alguns factors que confereixen predisposició a patir-la:

- Edat avançada.
- Tabac (39% dels casos en els homes estan associats a aquest factor).
- Exposició a l'arsènic per processos industrials o per ingesta.
- Exposició a pesticides.
- Diabetis.
- Consum de cafè.
- Factors dietètics.
- Obesitat (la incidència del carcinoma renal en persones obesas és el doble que a la resta de la població).
- Hipertensió.

- Alguns estrògens indueixen tumors en els hàsters, però en humans no s'ha observat aquesta associació, tot i que es pensa que els estrògens podrien estar implicats en la inducció d'aquests tumors en individus obesos.
- Susceptibilitat genètica. La majoria de casos de tumors renals apareixen de forma esporàdica, però hi ha formes familiars (poc freqüents) que es caracteritzen per un patró d'herència autosòmica dominant.
- Contaminació ambiental.
- La llum ultraviolada.

Simptomatologia: Pel que fa als símptomes que es donen quan es pateix aquesta malaltia, els més habituals són l'hematúria (present en el 40-60% dels pacients), dolor lumbar (present en el 35-40% dels pacients), massa renal palpable (present en el 30% dels casos). De forma menys habitual es pot manifestar: hipertensió, febre, hipercalcèmia entre d'altres.

3.2 TIPUS CEL·LULARS

Habitualment s'utilitzen dos sistemes morfològics de classificació: un és el proposat per la WHO (World Health Organization Classification of Tumors) i un altre que està d'acord amb els criteris de Thoenes i col. (1986) i Störkel i col. (1995).

El criteris utilitzats a la classificació de WHO es basen en observacions macroscòpiques, histològiques i ultraestructurals. Aquest sistema distingeix entre adenomes, carcinomes i altres tipus de tumors, constituïts per cèl·lules clares, granulars, fusiformes, oncocítiques i tipus cel·lulars barrejats; però aporta poca informació sobre l'oncogènesi, la progressió i l'evolució clínica d'aquests tipus de tumors.

Thoenes i col. van proposar un sistema de classificació basat en observacions histoquímiques i en les tècniques de microscòpia electrònica; aquesta classificació assumeix que diferents subtipus de carcinomes renals deriven del diferent origen de les cèl·lules, en les diferents parts de la nefrona (Thoenes et al. 1986; Strökel 1995).

Un esquema d'aquesta classificació es pot observar a la Figura 7.

La nefrona es divideix en les següents parts:

- Glomèrul.
- Túbul proximal.
- Nansa de Henle.
- Túbul distal.
- Túbul col·lector.
- Ducte de Bellini.

Els diferents tipus cel·lulars que podem observar a la nefrona són:

- Cèl·lules clares.
- Cèl·lules granulars (possible variant de les cèl·lules clares).
- Cèl·lules basòfiles.
- Cèl·lules cromòfobes.
- Cèl·lules oncocítiques.
- Cèl·lules dels ductes col·lectors (de Bellini).
- Cèl·lules fusiformes.

3.3 PATRÓ DE CREIXEMENT

El patró de creixement és una dada que aporta gran informació sobre els tumors renals, ja que en l'actualitat i des de fa temps es considera un factor pronòstic.

Al 1976 Mancilla-Jiménez i col, van ser els primers en observar que els tumors que presentaven una arquitectura papil·lar tenien millor evolució que els que no la presentaven. Posteriorment, i gràcies a altres estudis, es van anar definint altres subgrups com són: els tubulars, els sòlids, els acinars o els mixtes. També s'ha observat una certa relació, que no sempre es compleix, entre el patró de creixement i el tipus cel·lular; de manera que les cèl·lules clares i les cèl·lules cromòfobes acostumen a tenir un creixement de forma compacta i sòlida, mentre que les cromofíl·liques i les del ducte de Bellini solen tenir una forma tubulopapil·lar, i les oncocítiques tenen forma acinar (Mancilla-Jiménez et al. 1976).

3.4 CLASSIFICACIÓ DELS TUMORS RENALS

La correlació entre les dades histopatològiques, citogenètiques i moleculars, ha permès arribar a una classificació *consensus* segons la qual els tumors renals es divideixen en els següents tipus:

Carcinoma renal de cèl·lules clares (RCC; de l'anglès: *renal cell carcinoma*):

S'origina a l'epiteli del túbul proximal és el més habituals i representa entre el 60-80% dels carcinomes renals, es coneix amb el nom de carcinoma de cèl·lules clares. Acostumen a ser tumors grans (amb un diàmetre mitjà de 8 cm) i amb certa freqüència són múltiples. Es caracteritzen citogenèticament per la pèrdua de 3p.

Carcinoma de cèl·lules cromofíl·liques: També s'origina a l'epiteli del túbul proximal, però és molt menys habitual que el tipus anterior (ja que representa entre 7-14% dels carcinomes renals); generalment presenta un patró de creixement papil·lar. El tipus 1 es caracteritza citogenèticament per la trisomia dels cromosomes 7 i 17, i per la

pèrdua del cromosoma Y en el cas dels adenomes; i per trisomies addicionals dels cromosomes 12, 16 i 20, en el cas dels carcinomes. El tipus 2 es caracteritza per la presència de translocacions entre els cromosomes X i 1, entre altres.

Oncocitoma renal: S'origina en el túbul col·lector, i representa el 5% dels carcinomes renals. Histològicament es caracteritza per estar format per cèl·lules de citoplasma intensament eosinòfil, granular i amb nuclis petits, homogenis i uniformes. Se'l considera de manera general benigne. Citogenèticament cal destacar que s'han descrit translocacions implicant els cromosomes: 1, 11, 13 i 22.

Carcinoma de cèl·lules cromòfobes: S'origina a l'igual que els oncocitomes en el túbul col·lector, i representa entre 5-10% dels carcinomes renals. El seu comportament clínic és similar al dels carcinomes de cèl·lules clares de baix grau, però presenta millor pronòstic que els tumors que s'originen en el túbul proximal. Es caracteritza citogenèticament per les pèrdues dels següents cromosomes: 1, 2, 6, 10, 13, 17, 21 i Y.

Carcinoma de túbuls col·lectors o ducte de Bellini (BDC; de l'anglès: *Bellini duct carcinoma*): S'origina en la regió medul·lar del túbul col·lector, el motiu pel qual se'l sol confondre amb TCC de pelvis renal. Representen entre 1-2% dels carcinomes renals, és un tumor molt agressiu i no és estrany que produeixi metàstasis. En general afecta pacients molt joves que no solen a sobreviure més de 18 mesos. Citogenèticament es caracteritza per la monosomia dels cromosomes 1, 6, 14, 15, i 22.

Carcinoma de fus cel·lular o sarcomatoide: representa entre 1-10% dels tumors renals, i es considera una forma morfològica derivada dels grups anteriors.

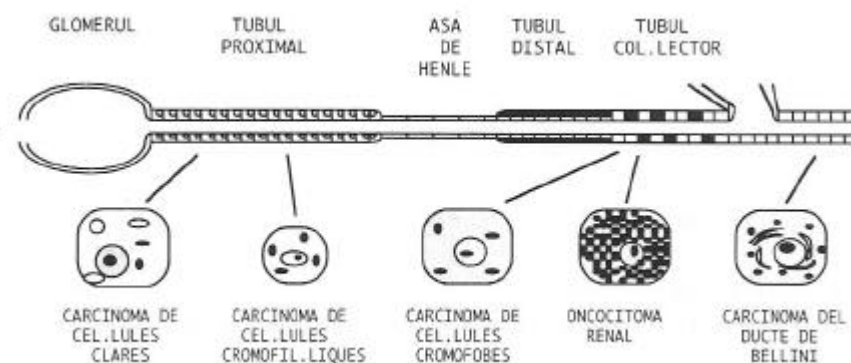


Figura 7: Classificació dels tumors renals segons Thoenes i col. (1986).

Tal i com ha quedat palès en aquesta classificació, el carcinoma renal manté una clara correlació entre la citogenètica, les dades moleculars i la histopatologia. Figura 8.

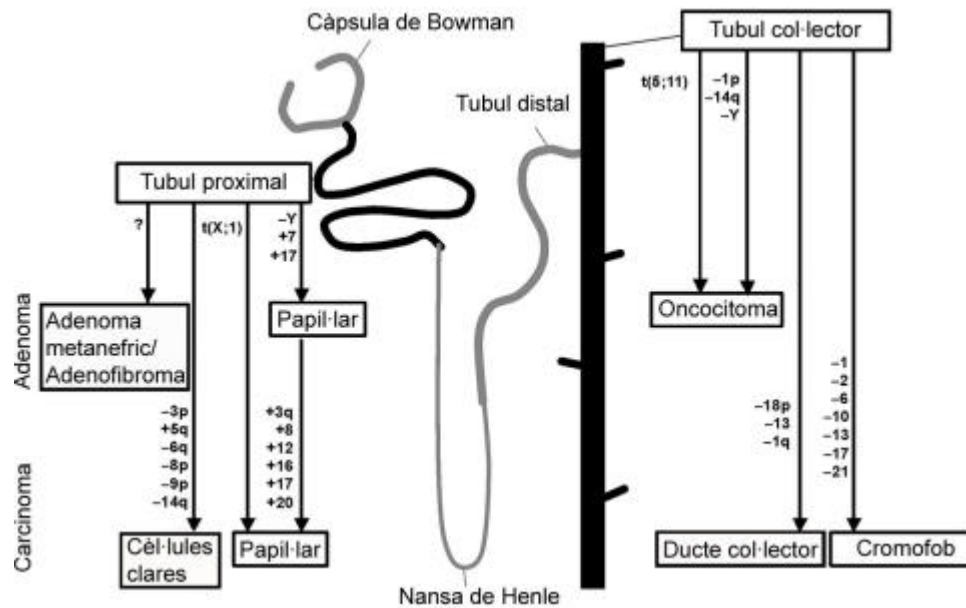


Figura 8: Representació esquemàtica dels diferents subtipus de tumors renals en relació a la seva localització a la nefrona i al túbul col·lector, i alteracions genètiques que els caracteritzen (Bodmer et al. 2002).

3.5 CLASSIFICACIÓ HISTOPATOLÒGICA

El sistema de classificació histopatològic que s'utilitza actualment es fonamenta bàsicament en dos aspectes, l'estadi d'invasió del tumor i el grau de diferenciació tumoral.

Estadi: L'estadi d'invasió es pot classificar seguint el sistema de classificació TNM; on la T ens indica el grau d'infiltració del tumor, és a dir fins a quin nivell o capa del teixit arriba el mateix. La N ens dóna informació sobre el grau d'afectació dels ganglis. La M ens dona informació sobre si hi ha o no metàstasi. Taula III.

Taula III: Taula de classificació dels carcinomes renals (TNM).

T	Tumor primari
TX	El tumor primari no es pot evaluar
T0	No hi ha evidència de tumor primari
T1	Tumor de 7 cm o menor, limitat al ronyó
T1a	Tumor de 4 cm o menor
T1b	Tumor de més de 4 cm, però menor de 7cm
T2	Tumor de més de 7 cm, limitat al ronyó
T3	El tumor s'extén per les venes principals o envaeix la glàndula adrenal o teixits perinefrítics, però sense travessar la fàscia de Gerota
T3a	Invasió de la glàndula adrenal o teixits perirenals, però sense atravesar la fàscia de Gerota
T3b	Invasió de la vena renal o vena cava o les parets al voltant del diafragma
T3c	Invasió de la vena cava supradiafragmàtica
T4	El tumor atravesa la fàscia de Gerota
N	Ganglis limfàtics regionals
NX	Els ganglis limfàtics regionals no es poden valorar
N0	No hi ha signes de metastasi als ganglis limfàtics regionals
N1	Metàstasi a un gangli limfàtic regional
N2	Metàstasi a més d'un únic gangli limfàtic regional
M	Distància de la metastasi
MX	No es pot evaluar si hi ha metastasi a distància
M0	No hi ha metastasi a distància
M1	Hi ha metastasi a distància

Grau: Els sistemes de gradació tumoral més utilitzats són aquells que es basen en el grau de diferenciació nuclear, ja que s'ha demostrat que és un factor pronòstic independent del estadi patològic. Hi ha diferents sistemes de gradació de la diferenciació nuclear, però el més utilitzat en l'actualitat és el sistema Fuhrman, que classifica les característiques nuclears en els següents grups (Fuhrman et al. 1982):

- Grau 1: Nucli de mida petit (10 μ), rodó i uniforme, amb el nuclèol absent i no prominent.
- Grau 2: Nucli de mida mitjà (15 μ), amb contorn una mica irregular i nucli petit (visible a 400x).
- Grau 3: Nucli de mida gran (20 μ), amb contorn irregular i nucli prominent (visible a 100x).
- Grau 4: Nucli de grau 3, amb presència de nuclis polilobulats, amb cromatina en grumolls grans i nuclèol visible amb facilitat.

La OMS però recomana seguir un sistema de tres graus. El grau I correspondrien a un tumor amb el menor grau d'anaplàsia cel·lular, compatible amb un diagnòstic de

malignitat, el grau III fa referència a un tumor amb el grau més sever d'anaplàsia cel·lular, i el grau II inclouria tots aquells tumors de grau intermedi entre els graus I i III.

3.6 GENÈTICA DELS TUMORS RENALS

Tant els estudis citogenètics com moleculars aporten informació clara i rellevant dels diferents tipus de tumors renals. Aquests estudis ens permeten no només poder fer una classificació d'aquests tumors, sinó que també aporten dades sobre l'evolució i el pronòstic dels pacients.

Els tumors renals més freqüentment estudiats tan a nivell citogenètic com molecular, han estat el carcinoma renal de cèl·lules clares i el nefroblastoma o tumor de Wilms, (tumor renal que afecta bàsicament a nens) seguits del carcinoma renal papil·lar i de l'oncocitoma (Sandberg 1980, 1990).

A continuació es presenta un resum per a cada un dels tipus de tumor renal amb les dades més rellevants tan de citogenètica, com de CGH, com també moleculars:

Carcinoma renal de cèl·lules clares

La majoria són esporàdics (Kovacs et al. 1987), tot i que hi ha casos familiars descrits a la literatura. El primer cas va ser descrit per Cohen i col. al (Cohen et al. 1979), es tractava d'una família afectada de càncer renal, en la que els membres que desenvolupaven tumors presentaven un cariotip constitucional amb la presència d'una translocació entre els cromosomes 3 i 8, t(3;8)(p21;q24). Posteriorment, la translocació es va definir de manera més precisa, com t(3;8)(p14.2;q24.13) (Wang and Perkins 1984). Estudis realitzats per Li i col. (1993) van semblar indicar que el gen responsable del càncer havia d'estar localitzat a 3p. Aquest és només el primer exemple descrit a la literatura de RCC familiar, i presenta en comú amb la resta que s'han descrit posteriorment (Pathak et al. 1982; Kovacs and Hoene 1988; Druck et al. 2001; Eleveld et al. 2001; Kanayama et al. 2001; Bodmer et al. 2002, 2003) el fet de que el cromosoma 3 (particularment la regió 3p13-pter) hi està implicat. Aquesta regió s'acostuma a perdre en els tumors fet que va fer pensar que un gen supressor hi estava localitzat. Diversos estudis moleculars que s'han realitzat han donat com a possibles candidats diversos gens amb activitat supressora: *VHL*, localitzat a 3p25-p26 (Decker et al. 1988) i responsable d'entre el 33-66% del casos esporàdics de RCC (Kim and Kaelin 2004), *HRCA1* localitzat a 3p14.2 (Boldog et al. 1993), *NRC-1* localitzat a 3p12 (Lott et al. 1998), *OGG1* localitzat a 3p25 (Audebert et al. 2000), *FHIT*

localitzat a 3p12-p14.2 (Velickovic et al. 2001), *RASSF1A* localitzat a 3p21.3 (Dreijerink et al. 2001).

La inactivació del gen *VHL* bé per LOH bé per mutació, està implicada en més del 30% dels casos esporàdics de RCC (Kim and Kaelin 2004). Altres estudis suggereixen que una de les causes de la pèrdua d'activitat d'aquest gen seria la hipermetilació de les illes CpG (Herman et al. 1994; Zbar 1995).

Altres regions que freqüentment estan implicades en LOH són 3p12-p14 i 3p21-p22 (van den Berg et al. 1996; Velickovic et al. 1999; Bodmer et al. 2002).

Queda clar que l'alteració citogenètica més freqüent, i que es considera característica d'aquest grup és la pèrdua del braç curt del cromosoma 3 i/o alteracions a nivell molecular que afecten a 3p.

S'ha observat una clara correlació entre l'augment de desdiferenciació nuclear, és a dir un augment del grau histològic, amb un increment d'alteracions citogenètiques, com són: +5q, +7, +10, -6q, -8p, -9 i -14q. Estudis realitzats amb CGH confirmen dades que la citogenètica convencional ja ens havia aportat, com -3p (com a alteració clarament més habitual) (Reutzel et al. 2001), -9p, -6q i +5q però també apareix -13q (Moch et al. 1996; Presti et al. 1996). Moch i col. (1996) utilitzant aquesta tècnica van observar una correlació entre les pèrdues de 9p i la recurrència del tumor. Utilitzant també la CGH, Gronwald i col. (1997) van descriure una correlació entre el guany de 1q i l'aparició de metàstasi.

També s'ha observat una correlació entre les pèrdues al·lèliques a 17p i la progressió dels tumors, indicant que alteracions de *TP53* serien les que estarien implicades en la progressió de la malaltia (Presti et al. 1991a; Reiter et al. 1993). Altres relacions que s'han trobat han estat les pèrdues al·lèliques del cromosoma 5q21 amb el grau histològic i la incidència de metàstasi (Morita et al. 1991).

Jiang i col. (2000) després de fer un estudi de 116 RCCs amb CGH, van proposar dues vies d'evolució; considerant la pèrdua de 3p com un pas inicial, una via es caracteritzava per la posterior pèrdua de 6p i guany de 17 mentre que l'altre via es caracteritzava per pèrdues de 9p, 13q i 18q. En els dos models la pèrdua de 8p apareixia com un esdeveniment tardà i independent de la resta.

Carcinoma renal papil·lar o carcinoma de cèl·lules cromofil·liques

Als anys vuitanta es diferencià per primera vegada entre RCC papil·lars (PRC) i no papil·lars, però no va ser fins al 1991 que Kovacs i col. (1991) van descriure citogenèticament els RCC papil·lars (PRC, de l'anglès: *papillary renal carcinomas*), suggerint que la combinació d'alteracions que els definia eren les trisomies 7 i 17. Altres trisomies que es podien presentar de manera addicional eren la 12 i la 16, les

quals serien responsables de la progressió. Uns anys més tard aquesta informació es va concretar per part d'aquests mateixos autors, els quals van afirmar que a nivell citogenètic aquests tumors es caracteritzen per la trisomia o tetrasomia del cromosoma 7 i la trisomia del cromosoma 17, i per la pèrdua del cromosoma Y en el cas dels adenomes, o per les trisomies addicionals dels cromosomes 3, 12, 16 i 20 en el cas dels carcinomes. És per això que aquestes últimes s'associen amb un comportament més agressiu del tumor (Kovacs 1993; Bentz et al. 1996).

Estudis amb CGH han posat de manifest el guany dels cromosomes 7 i 17 en un 50% dels casos, i dels cromosomes 16 i 20 en el 15% dels casos. També s'han detectat amplificacions en un tumor a 2q22-q33, 16q, 17q i X (Reutzel et al. 2001). Altres estudis emprant aquesta mateixa tècnica descriuen a més a més de les alteracions ja citades, pèrdues a 1p, 4q, 6q, 9p, 13q, X i Y així com guanys a 5q (Jiang et al. 1998; Rigola et al. 2002). La pèrdua d'heterozigositat a 9p13 s'associa amb baixa supervivència (Schraml et al. 2000).

En quasi el 30% d'aquests tumors es detecta inactivació de *PTEN/NMAC1*, gen supressor de tumors que es troba localitzat a 10q23 (Velickovic et al. 2002).

També s'han descrit casos de PRC familiars o hereditaris, encara que són rars. Aquests tenen en comú la implicació citogenètica de 7q31. A nivell molecular s'ha observat que l'oncogen implicat és *MET*, el qual es localitza en aquesta regió cromosòmica (Bernués et al. 1995; Corless et al. 1996; Zhuang et al. 1998). (Aquest tipus de tumor s'analitza amb més profunditat en l'apartat 3.7.1). Les mutacions d'aquest gen s'han detectat tant en casos familiars com en esporàdics (Schmidt et al. 1997, 1998).

Aquests tipus de tumors papil·lars caracteritzats per trisomies específiques i per mutacions en el gen *MET*, s'agrupen actualment dins el tipus 1 del carcinoma renal papil·lar.

Meloni i col (Meloni et al. 1993) van identificar un altre subtipus de PRC (tipus 2) que es caracteritzava per la presència d'una translocació entre els cromosomes X i 1, $t(X;1)(p11.2;q21)$, i pel fet de que tots els afectes eren homes. Tot i que posteriorment també es va detectar aquesta translocació en dones ((Shiple et al. 1995; Dal Cin et al. 1998; Kardas et al. 1998), entre altres).

S'han descrit a la literatura altres translocacions en els PRC: $t(X;17)(p11.2;q25)$ (Tomlinson et al. 1991; Hernandez-Martí et al. 1995). L'únic denominador comú present entre elles ha estat el punt de trencament del cromosoma X (Xp11.2).

Estudis moleculars posteriors han demostrat que com a producte de la translocació $t(X;17)$ es produeix un gen de fusió *RCC17*, localitzat a 17q25, el factor de transcripció del qual (*TFE3*) es troba a Xp11.2 (Heimann et al. 2001). En el cas de la translocació

t(X;1) es produeix una fusió de dos gens, *PRC* localitzat a 1q21.2 i *TFE3* localitzat a Xp11.2, resultant un altre gen que actua de forma negativa sobre la formació del fus mitòtic.

Oncocitoma renal

Un dels primers treballs que es va publicar sobre aquests tumors va ser el de Kovacs i col. (1989), en el que es descriu un patró de restricció del DNA mitocondrial com a característic d'aquest tipus de tumor i que el diferencia d'altres carcinomes amb característiques aparentment similars.

Citogenèticament són molt heterogenis, fet que ha comportat que es definissin dos subtipus:

Subtipus 1: Caracteritzat per la pèrdua dels cromosomes 1 i X/Y. També s'han descrit com a característiques, tot i que menys freqüents, les alteracions del cromosoma 22 i la trisomia del 12 (Dobin et al. 1992).

Estudis moleculars han corroborat la importància de la pèrdua del cromosoma 1 per aquests tipus de tumors, concretament de 1p, suggerint la localització d'un possible supressor de tumors en aquesta regió (Thrash-Bingham et al. 1996; Dal Cin et al. 2000). Tot i que la pèrdua de 1p és la més freqüent, sembla que altres alteracions com les detectades per un estudi de pèrdues al·lèliques, indicarien com habitual també pèrdues a 14q (Polascik et al. 1996; Presti et al. 1996).

Subtipus 2: Caracteritzat per reorganitzacions que inclouen la regió de 11q13. Exemple d'aquestes serien t(11;11)(q12;q13) (Walter et al. 1989; Dijkhuizen et al. 1997), o t(5;11)(q35;q13) (van den Berg et al. 1995).

Carcinoma de cèl·lules cromòfobes

Kovacs i Hoene als anys vuitanta van aportar les primeres dades citogenètiques d'aquests carcinomes en estudiar un tumor que destacava per el baix nombre de cromosomes que posseïa (34), això era degut a que presentava monosomies en un gran nombre de cromosomes: 1, 2, 3, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 17, 18 i 21 (Kovacs and Hoene 1988).

Estudis posteriors han demostrat que les monosomies més freqüents en aquests tipus de tumors són: 1, 2, 6, 10, 13, 17 i 21 (Speicher et al. 1994; Shuin et al. 1996).

D'altra banda estudis de LOH han donat una especial rellevància a 21q, tot i que també s'han observat pèrdues d'heterocigotitat a 1p, 2p, 6p, 10p, 13q i 17p (Schwerdtle et al. 1996).

S'han descrit mutacions de p53 en el 25% dels casos de carcinomes de cèl·lules cromòfobes (Contractor et al. 1997). La dada que més destaca és la inactivació del

gen supressor *PTEN/NMAC1* (10q23) que es troba en un 87.5% dels casos, la pèrdua d'aquest gen també es troba en altres tipus de carcinomes renals però en un percentatge molt menor (Velickovic et al. 2002). També destaca la pèrdua al·lèlica de 13q, que en aquests tumors es troba amb una freqüència molt elevada (86%) respecte a altres tumors renals com són el RCC amb un 8% (Schwerdtle et al. 1996).

Carcinoma de túbuls col·lectors o ducte de Bellini (BDC)

Hi ha molt poca informació a nivell genètic i molecular ja que aquests és un tumor molt rar.

Citogenèticament es caracteritzen per la monosomia dels cromosomes 1, 6, 14, 15, 22 i guanyats en el cromosoma 3 (Fuzesi et al. 1992).

A nivell molecular, s'ha descrit la pèrdua del gen del retinoblastoma en algun d'aquests tumors (Brooks et al. 1993).

S'han descrit pèrdues d'heterozigositat a 1q, 6p, 8p, 13q i a 21q (Schoenberg et al. 1995; Polascik et al. 1996); essent la regió de 1q la que presenta una freqüència més elevada. Posteriorment Steiner i col. (1996) van definir la regió mínima de deleció com 1q32.1-q32.2.

3.7 CARCINOMA RENAL DE TIPUS FAMILIAR O HEREDITARI

El ronyó és un òrgan afectat en diferents tipus de càncer sindròmics hereditaris. A la majoria d'ells un oncogen o un gen supressor de tumors està mutat a la línia germinal, i això fa possible la confirmació del diagnòstic. Taula IV.

Taula IV: Síndromes hereditaris més importants que afecten al ronyó, provocant l'aparició de tumors.

Síndrome	Cromosoma	Gen/Proteïna	Afectació renal
von Hippel-Lindau	3p25	<i>VHL</i> pVHL	Múltiple, Carcinoma renal de cèl·lules clares bilateral, quistes renals
Cancer renal hereditari papil·lar	7q31	<i>c-MET</i> HGF-R	Múltiple, carcinoma de cèl·lules renals papil·lar (PRC), bilateral Tipus -1
Leiomatosi hereditaria i RCC	1q42-43	<i>FH</i> FH	Carcinoma de cèl·lules renals papil·lar (PRC) No tipus -1
Birt-Hogg-Dubé	17p11.2	<i>BHD</i> Folliculina	Múltiple RCC, crom òfob, RCC convencional, oncocitoma híbrid, RCC papil·lar, Tumor oncocític
Esclerosi tuberosa	9q34 16p13	<i>TSC1</i> Hamartina <i>TSC2</i> Tuberina	Múltiple, angiomiolipom es bilaterals linfoanglioangioleiomiomatosi
Translocació constitucional del cromosoma 3	3	Desconegut	Múltiple, carcinoma renal de cèl·lules clares (CCRCC) bilaterals

Cada síndrome hereditari predisposa a un tipus diferent de càncer renal, i generalment els pacients desenvolupen múltiples tumors de forma bilateral, és a dir a tots dos ronyons.

Dins del ampli ventall de diferents tipus de tumors renals que hem vist ens centrarem en els pacients amb carcinoma renal de tipus familiar o hereditari amb patró de creixement papil·lar (HPRC) (marcat en gris a la taula IV). Aquests representen un 4% del total de casos de RCC (Linehan et al. 1995).

3.7.1 CARCINOMA RENAL PAPIL·LAR HEREDITARI

El carcinoma renal papil·lar hereditari és un síndrome que provoca l'aparició de tumors i presenta un patró d'herència autosòmic dominant.

El seu diagnòstic es basa precisament en el fet que es presentin tumors múltiples en tots dos ronyons, i s'estima que un 50% dels membres afectats d'una família desenvolupen aquesta malaltia al voltant dels 55 anys.

Zbar (1995) va descriure una sèrie de 10 famílies que presentaven 41 membres afectes (29 homes i 12 dones), la edat mitjana en el moment del diagnòstic era de 45 anys i la majoria van desenvolupar tumors papil·lars de manera bilateral i multifocal. El temps mitjà de supervivència va ser de només 52 anys, tot i que no es va establir de manera clara quins pacients havien mort a causa del tumor, i per tant no està del tot clar que aquesta evolució tan agressiva es degui al tumor.

L'anàlisi de lligament de les famílies afectades va aportar informació clau, pel descobriment del gen, el qual es troba localitzat a 7q31.1-q34. Destaca el fet que en aquest cas el factor desencadenant és l'activació d'un proto-oncogen, en lloc de la inactivació del gen supressor de tumor. Es va observar que les mutacions del proto-oncogen *MET* (localitzat a 7q31) segregaven amb la malaltia, el que va indicar que s'havia trobat el locus genètic fonamental en aquesta malaltia. Posteriorment s'han descrit mutacions en aquest gen tant en casos familiars com en casos esporàdics (Schmidt et al. 1997, 1998).

El producte proteic d'aquest gen és una tirosina quinasa receptora per al factor de creixement hepàtic (HGF), la qual desenvolupa un paper molt important en la regulació de la proliferació i diferenciació de les cèl·lules epitelials i endotelials en gran quantitat d'òrgans diferents entre els que es troben els ronyons.

La major part de les mutacions del gen es van detectar en el domini tirosina quinasa, i sembla que aquestes mutacions el porten a una activació constitutiva del receptor (Schmidt et al. 1997).

La trisomia del cromosoma 7 és un fet habitual en molts carcinomes renals, en aquest cas es genera per la duplicació del cromosoma portador de l'al·lel mutat del proto-oncogen *MET* i així es produeix un augment de la dosi de receptor activat (Zhuang et al. 1998).

El fet de l'aparició primerenca i de la multiplicitat dels tumors és una conseqüència de que el gen estigui mutat a la línia germinal, i determina, per tant, que totes les cèl·lules renals tinguin un risc més elevat des del moment del naixement de desenvolupar tumors. Les causes de que aquesta malaltia presenti una penetrància incompleta i una evolució clínica variable es desconeixen, però es pensa que podria estar regulat per altres gens, o bé per fenòmens epigenètics.

4. CÀNCER COLORECTAL

4.1 GENERALITATS



El càncer colorectal és un bon model per a l'estudi de la carcinogènesi ja que és possible identificar des de lesions premalignes, fins metàstasis a distància. El càncer colorectal presenta un lesió premaligna molt ben coneguda anomenada adenoma. Aquesta és una lesió freqüent a la població de més 55 anys i té el risc de degenerar i esdevenir un carcinoma de entre el 5% i el 40%, segons si són adenomes tubulars (99%) o bé són adenomes vellosos (5%). Avui en dia es considera que tots els

carcinomes han passat per un etapa prèvia d'adenomes. Els pòlips són tumors benignes situats a les parets interiors del colon i del recte.

El 95% dels carcinomes de còlon són adenocarcinomes, és a dir, s'originen a l'epiteli del colon i la majoria són moderadament o ben diferenciats.

Al voltant d'un 10% dels càncers colorectals, són deguts a causes hereditàries, en els quals una alteració genètica inicial condiona el desenvolupament dels tumors.

Epidemiologia: El càncer de còlon és la segona causa de mort per càncer, després del càncer de pulmó en l'home, i del de mama en la dona.

Representa en conjunt el 15% dels tumors diagnosticats a l'home.

En el nostre país es produeixen 11.000 nous casos cada any. La mortalitat induïda per aquest càncer és de 10 morts per cada 100.000 habitants i any en els països desenvolupats, i té tendència a augmentar en els darrers anys.

La taxa de supervivència a cinc anys és del 90% en aquelles persones en les que la detecció ha estat primerenca, però només al voltant d'un 35% són detectats en un estadi primerenc.

Si el càncer s'ha disseminat a altres òrgans propers o a ganglis limfàtics, la taxa de supervivència disminueix fins al 65%; i si s'ha disseminat fins a òrgans llunyans, la taxa disminueix fins al 8%.

La malaltia es presenta de manera avançada en un 22-33% dels pacients, i en aquests casos l'índex de supervivència està molt proper a zero.

Diferències entre sexes: No s'han observat diferències entre sexes pel que fa a la incidència, però si s'ha suggerit que hi ha diferències pel que fa al tipus de mutacions predominants. Breivik i col. (1994) van observar que les dones que desenvolupaven

càncer de colon a una edat primerenca, presentaven més mutacions en l'oncogèn *K-RAS* que en els homes o dones amb una edat avançada d'aparició de càncer.

Edat: La major incidència acostuma a ser entre els 60 i els 70 anys. S'estima que només entre 1-3% dels casos de càncer colorectal es donen en pacients menors de 40 anys i un 12% entre 40 i 55 anys.

Etiologia: Les causes que originen aquesta malaltia són nombroses, però s'han identificat alguns factors de risc que incrementen les possibilitats de patir-la:

- Haver patit malalties inflamatòries intestinals prèvies.
- Historia personal d'altres tipus de càncers.
- Hàbits de vida sedentària.
- Hàbits alimentaris: dietes amb poca fibra, fruites i verdures o massa greixoses són perjudicials.
- Tabac: les persones que fumen 20 cigarrets al dia, tenen el doble de possibilitats de desenvolupar càncer de còlon dels que no són fumadors. Els homes fumadors tenen un 34% més de possibilitats de patir càncer de còlon, i les dones fumadores un 43%.
- Predisposició genètica: historial personal o familiar de pòlips o de càncer de còlon.

Simptomatologia: Quan es produeix simptomatologia la malaltia acostuma a estar en un estat avançat, i les possibilitats de supervivència són baixes. Per aquest motiu és fonamental un diagnòstic precoç. La simptomatologia es basa principalment en la pèrdua de sang amb les femtes.

Els pacients però poden detectar alguna simptomatologia relacionada amb canvis en els hàbits intestinals; es considera com a norma que les diarrees són característiques del càncer de cec i colon ascendent; mentre que estrenyiment és característic de càncer de colon descendent i sigma.

4.2 CLASSIFICACCIÓ I ESTADIS DEL CÀNCER COLORECTAL

En el cas del càncer de còlon, hi ha diferents classificacions per tal de definir l'estadi d'invasió del tumor i el grau de diferenciació tumoral.

La definició dels diferents estadis no és fàcil degut a que hi ha diferents sistemes de classificació. Tots ells tenen en comú que classifiquen els tumors en funció de les àrees afectades i de la presència o no de metàstasis tan a nòduls limfàtics com a distància.

El primer sistema de classificació va ser descrit per Dukes al 1932 (Dukes 1932), però posteriorment van anar apareixent modificacions que utilitzaven noves nomenclatures. Actualment hi ha tres sistemes de classificació àmpliament utilitzats en l'àmbit mèdic:

Estadis de Dukes: és la classificació original de Dukes. Es basa en indicar fins quin nivell o capa de la paret intestinal arriba el tumor i l'afectació d'òrgans veïns. Defineix els següents estadis:

- Dukes A: el tumor està situat a la mucosa i submucosa.
- Dukes B: el tumor envaeix la capa muscular, arriba fins a la serosa, però no afecta els ganglis limfàtics.
- Dukes C: el tumor també arriba a la capa serosa, i presenta també afectació dels ganglis limfàtics regionals. Amb posterioritat es va distingir entre C1 i C2:
C1: estan afectats només els nòduls parietals.
C2: estan afectats els nòduls apicals.

Sistema de classificació d'Astler-Coller: Aquest sistema va ser proposat per Astler i Coller al 1954 (Astler and Coller 1954). En aquest sistema es diferencien 6 grups, però en ocasions porta a confusió degut al solapament pel que fa a nomenclatura amb els estadis de Dukes.

- A: el tumor es troba a la mucosa.
- B1: el tumor envaeix la capa muscular, però sense arribar a la serosa.
- B2: el tumor travessa la capa muscular pròpia.
- C1: afecta les mateixes capes que B1, però presenta a més metàstasis a nòduls limfàtics.
- C2: afecta les mateixes capes que B2, però presenta a més metàstasis a nòduls limfàtics.
- D: tumors que presenten metàstasis a distància.

Sistema de classificació TNM: Aquest sistema és més complet, però resulta més difícil d'aplicar degut a que podem tenir fins a 24 grups diferents. La sigla T ens indica el grau d'infiltració del tumor, és a dir fins a quin nivell o capa del teixit arriba el mateix, la N ens dona informació sobre el grau d'afectació dels ganglis, i la M ens dona informació sobre si hi ha o no metàstasi.

La taula V mostra de manera clara aquesta classificació. I la figura 9 il·lustra de manera comparativa els tres sistemes de classificació que s'han exposat.

Taula V: Taula de classificació dels carcinomes de colorectals (TNM).

T	Tumor primari
TX	El tumor primari no es pot evaluar
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> . " tumor pla"
T1	El tumor envaeix la capa mucosa i la muscularis mucosa, i s'estén fins la submucosa
T2	El tumor envaeix fins a la muscularis pròpia
T3	El tumor envaeix fins la subserosa , sense arribar a cap teixit veí
T4	El tumor envaeix qualsevol capa de teixit del còlon o recte arribant als teixits o òrgans contigus
N	Ganglis limfàtics regionals
NX	Els ganglis limfàtics no es poden valorar
N0	No hi ha signes de metastasi als ganglis limfàtics regionals
N1	Presència de cèl·lules tumorals entre 1 i 3 nòduls
N2	Presència de cèl·lules tumorals en 4 o més nòduls
M	Metàstasi a distància
MX	No es pot evaluar si hi ha metàstasi a distància
M0	No hi ha metastasi a distància
M1	Hi ha metastasia distància

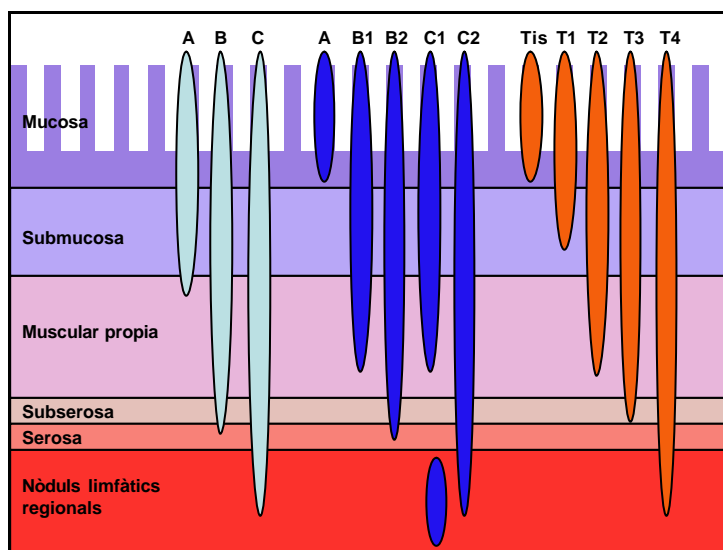


Figura 9: Esquema comparatiu dels diferents sistemes de classificació. ■ Sistema de classificació de Duker. ■ Sistema de classificació d'Astler-Coller. ■ Sistema de classificació TNM.

4.3 SÍNDROMES HEREDITARIS: UNA BASE PER A LA COMPRESIÓ DEL CÀNCER COLORECTAL

Aproximadament el 85-90% dels casos de càncer de còlon es consideren esporàdics, la resta aproximadament un 5-10% es consideren deguts a factors hereditaris. De totes maneres, en una bona part dels casos considerats esporàdics (entre el 15-25%) és possible recollir dades d'antecedents familiars amb càncer colorectal o bé altres neoplàsies (Winawer et al. 1997; Burt 2000). Aquests casos podrien correspondre a formes hereditàries amb baixa penetrància, o a trastorns poligènics amb participació de polimorfismes que modulen la influència de factors ambientals.

L'estudi dels síndromes hereditaris, tot i que representen una proporció reduïda del total de casos de càncer de còlon, ha resultat de gran importància; el coneixement dels factors implicats en el desenvolupament d'aquestes malalties hereditàries ha permès conèixer els mecanismes implicats en els càncers de còlon esporàdics. Alguns dels gens que es troben mutats en aquestes formes hereditàries tenen també un paper clau en el cas dels esporàdics.

Fins al moment s'han descrit sis síndromes de predisposició al càncer de colon (Richter et al. 2003; de la Chapelle 2004) sent els més importants: La Poliposi Adenomatosa Familiar (FAP: de l'anglès, *Familial Adenomatous Polyposis*) i el Càncer de Colon Hereditari no polipósic (HNPCC: de l'anglès, *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*).

FAP: Representa aproximadament un 1% dels casos de càncer de còlon, i presenta una incidència aproximada d'un cas cada 10.000 habitants. Presenta un patró d'herència autosòmica dominant, causada per mutacions del gen *APC* (de l'anglès, *Adenomatous Polyposis Coli*). Des d'un punt de vista fenotípic, es caracteritza per la presència de més de 100 pòlips adenomatosos al còlon i recte (tot i que hi ha formes atenuades que presenten menys de 100 pòlips) i sol iniciar-se al voltant dels 20-30 anys. En el 95% dels casos aquests malalts desenvoluparan un càncer abans dels 40-50 anys. Existeix una gran heterogeneïtat pel que fa a les manifestacions clíniques de la malaltia, ja que aquests pacients desenvolupen de forma paral·lela altres manifestacions, com són: adenomes duodenals i gàstrics, lesions a la retina, osteomes de predomini facial, tumors desmoides de la pell i tumors al cervell.

El gen *APC* va ser identificat per mitjà d'estudis de lligament com un marcador situat al cromosoma 5, concretament a 5q21 (Leppert et al. 1987; Bodmer et al. 1994). Posteriorment es va poder descriure la seva implicació en el càncer de còlon gràcies a

la cerca d'alteracions en cèl·lules germinals (en els casos de pacients de FAP) i en cèl·lules somàtiques (en els casos esporàdics); d'aquesta manera es va arribar a demostrar la cosegregació de les mutacions en *APC* amb la presència de la malaltia (Groden et al. 1991; Nishisho et al. 1991). Es considera que més del 90% de les famílies afectades per FAP, tenen mutacions del gen *APC* en la línia germinal.

Posteriorment es va demostrar, la inactivació del gen *APC* en lesions neoplàsiques inicials com és el cas de les criptes aberrants, estructures que actualment es creuen precursors dels adenomes (Smith et al. 1994; Takayama et al. 2001).

La distribució de les mutacions en *APC* és molt heterogènia; la majoria introdueixen de forma prematura un codó de finalització de manera que es genera una proteïna truncada. A més a més s'ha descrit una forta correlació entre genotip i fenotip, de manera que la localització de la mutació condicionarà les característiques clíniques amb que cursarà la malaltia; veure figura 10 (Soravia et al. 1998; Fodde et al. 2001).

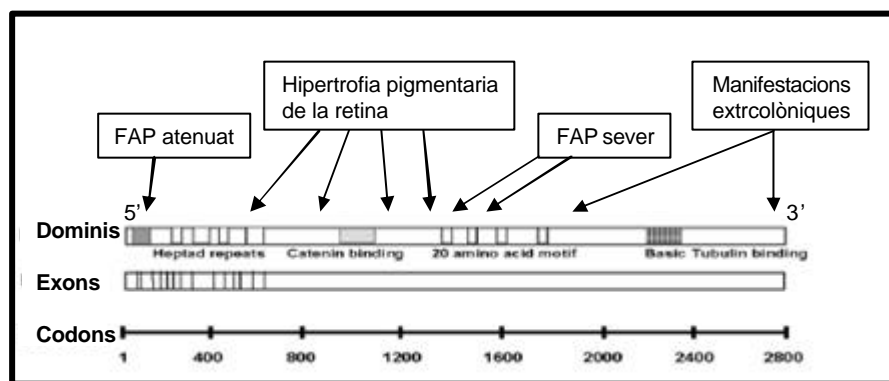


Figura 10: Esquema de la relació genotip-fenotip, en funció del punt on es produeix la mutació d'*APC*.

S'ha descrit una variant anomenada poliposi adenomatosa familiar atenuada, la qual es caracteritza per un inici més tardà de la malaltia i un menor nombre de pòlips localitzats preferentment en el colon dret. Aquesta varietat s'associa a mutacions del gen *MYH* (de la Chapelle 2004).

Els malalts als que no és possible detectar la mutació en *APC* (entre 20-40%), presenten un fenotip molt més lleu, tant pel que fa a les manifestacions extracolòniques, com pel que fa al número de pòlips en el còlon (Heinimann et al. 1998). Aquest fet suggereix la possible existència d'altres gens que tindrien un paper modificador (Houlston et al. 2001).

HNPCC: Representa aproximadament un 5% dels casos de càncer de colon. És una malaltia autosòmica dominant. Els pacients que pateixen aquest síndrome solen desenvolupar càncer de còlon a una edat prematura (abans dels 50 anys). Freqüentment el càncer està localitzat en el còlon proximal, i acostumen a desenvolupar neoplàsies d'altres orígens com són els d'endometri, d'estómac i d'ovaris. Els individus afectats tenen tendència a desenvolupar càncer de còlon tan sincrònic com metacrònic, poques metàstasis, i acostumen a tenir una bona resposta a la quimioteràpia.

L'HNPCC es caracteritza des del punt de vista molecular per múltiples mutacions somàtiques que afecten de manera preferent a fragments repetitius de DNA (microsatèl·lits) distribuïts al llarg del genoma (Ionov et al. 1993; Chung and Rustgi 1995). Aquest fenomen, anomenat inestabilitat de microsatèl·lits tradueix l'acumulació d'errors en la replicació del DNA, els quals són conseqüència de mutacions en els gens responsables de la seva reparació. La identificació de mutacions germinals en aquests gens ha permès definir la base genètica d'aquesta malaltia; els gens afectats són els gens de reparació d'aparellaments erronis del DNA (MMR: de l'anglès, *Mismatch Repair*): *MSH2*, *MSH3*, *MSH6*, *MLH1*, *PMS1* i *PMS2* (Grady and Markowitz 2002).

La majoria de famílies presenten mutacions a *MLH1* i *MSH2*, i això els hi confereix una probabilitat de desenvolupar un càncer de colon de més del 80%. La inactivació d'aquests gens implica l'herència d'una primera mutació en un al·lel i una segona mutació en l'altre al·lel que es produiria amb el temps.

Es tracta de mutacions somàtiques a dos nivells: per un costat a nivell de microsatèl·lits, la majoria dels quals estan localitzats en DNA intrònic, i per tant la seva afectació no té un significat patològic; i per altra banda, els errors de replicació també poden afectar a unitats repetitives de DNA incloses dins els marcs de lectura de diferents gens (*TGF-β*, *IGFRII*,...) alguns dels quals juguen un paper fonamental en la regulació del creixement, diferenciació i mort cel·lular.

4.4 VIES DE PROGRESSIÓ DEL CÀNCER COLORECTAL

Pel que fa al càncer de còlon s'han postulat dues possibles vies de progressió i acumulació d'alteracions genètiques: la deguda a inestabilitat cromosòmica i la deguda a inestabilitat de microsatèl·lits (MSI; de l'anglès: *microsatellite instability*). La inestabilitat cromosòmica va ser descrita per Lengauer i col (Lengauer et al. 1998) com a CIN (de l'angles *chromosome instability*) i es refereix a la generació de guanys i pèrdues de cromosomes amb una taxa superior a la normal. La inestabilitat

cromosòmica de les cèl·lules tumorals és numèrica i estructural. La inestabilitat de microsatèl·lits va associada a mutacions de gens de reparació d'errors d'aparellament del DNA. Totes dues vies es poden presentar tant en tumors esporàdics com en les formes hereditàries del càncer de còlon.

Inestabilitat cromosòmica i model de progressió a carcinoma: La inestabilitat cromosòmica s'ha associat a alteracions en oncògens i gens supressors de tumors. Durant molt temps aquesta via s'ha conegut amb el nom de via supressora, i es podria relacionar amb el model que van proposar Fearon i Vogelstein (1990).

Se sap que el pas d'un adenoma benigne a un carcinoma invasiu es produeix bàsicament per l'acumulació de mutacions en oncògens i en gens supressors de tumors, i que aquestes alteracions s'acostumen a produir seguint un ordre. L'ordre que s'ha definit, començant per les lesions pre-malignes i arribant fins a les més agressives, és el següent:

- Criptes aberrants.
- Adenoma primerenc (menys d'un centímetre de diàmetre).
- Adenoma intermedi (igual o major a un centímetre de diàmetre, i sense presentar focus de carcinoma).
- Adenoma tardà (major a un centímetre de diàmetre, i presenta focus de carcinoma).
- Carcinoma.
- Metàstasi.

Diferents estudis genètics han permès proposar quina seria la seqüència temporal amb la que s'anirien acumulant les alteracions que portarien a la malignitat (Vogelstein and Kinzler 1992). Aquest model es presenta com un model lineal, on un dels primers passos que es produiria seria una hipermetilació global del DNA (Goelz et al. 1985). Aquestes alteració afectarien l'expressió gènica, afavorint l'expressió de gens que abans estaven silenciats, i també podria actuar com a inhibidor de la condensació cromosòmica (Schmid et al. 1984). El gen iniciador d'aquest procés seria **APC** (localitzat a 5q21), que provoca una proliferació de l'epiteli normal i seria per tant el responsable de la formació inicial dels adenomes. La proteïna APC té una localització citoplasmàtica i forma part de la via de transmissió de senyals d'alguns components de la família de les proteïnes Wnt que tenen un potencial oncogènic. A més a més aquesta proteïna està implicada en diverses fases en el control del cicle cel·lular, regulant la parada G1/S, i també en la fase M; i tanmateix té un paper important en el procés d'apoptosi, ja que la restitució del gen es tradueix en un augment d'apoptosi.

APC participa també en la regulació de la migració i adhesió cel·lular, de manera que la seva pèrdua o mutació es responsable d'alteracions en aquests processos a través de diverses vies. S'estima que aquest gen està inactivat en el 80-90% dels carcinomes esporàdics, i en més del 90% de les famílies amb FAP. Aquesta inactivació pot ser deguda a mutacions puntuals, pèrdua al·lèlica o a hipermetilació del promotor. Qualsevol de les tres opcions té com a conseqüència la pèrdua d'expressió de la proteïna.

El següent pas que es produiria, seria la mutació d'un altre gen: ***KRAS*** (localitzat a 12q12), que faria que alguns adenomes primerencs es transformessin en adenomes intermedis. Aquest gen pertany a la família d'oncògens *RAS* (*KRAS*, *NRAS*, *HRAS*) els quals es troben freqüentment activats als tumors humans. Tant el gen *KRAS* com altres membres de la família, codifiquen per proteïnes que actuen de intermediàries del senyal entre receptors tirosina quinases de la superfície cel·lular i la cascada serina/treonina/quinasa. Aquestes proteïnes activen l'expressió de factors nuclears, que seran els que finalment, controlaran l'expressió gènica i la síntesi de proteïnes. Aquest mecanisme és de gran importància en els processos de proliferació i diferenciació cel·lular (Barbacid 1987). Aproximadament el 50% dels adenomes de mida gran i carcinomes presenten mutacions a l'oncogèn *KRAS*.

Mutacions en els gens supressors de tumors: ***DCC***, ***SMAD4***, ***SMAD2*** (tot ells localitzats a18q) provocarien l'evolució dels adenomes intermedis cap a adenomes tardans. *DCC* (de l'anglès: *deleted in colon cancer*) codifica per una proteïna de membrana que guarda semblança amb la família de les molècules d'adhesió N-CAM. Aquest gen es troba delectat en el 50% dels adenomes avançats i en el 70% dels carcinomes de còlon. S'ha comprovat que la manca d'expressió de la proteïna per a la que codifica es correlaciona amb una menor probabilitat de supervivència dels pacients. Els gens *SMAD4* i *SMAD2* codifiquen per unes proteïnes que juguen un paper important en la via de transducció de senyals de TGF- β . *SMAD4* es troba alterat en una proporció significativa de càncers de còlon i s'ha associat a processos metastàsics (Miyaki et al. 1999). S'ha vist però que la pèrdua de *SMAD4* per si sola no indueix aparició de tumors, però quan aquesta es troba acompanyada de la pèrdua d'*APC* es produeixen adenomes que ràpidament es tornen malignes. *SMAD2* per la seva banda es dona en tumors de còlon en una proporció molt més baixa (Eppert et al. 1996) i s'associa amb inestabilitat de microsatèl·lits.

El pas d'adenomes a carcinomes, estaria regulat per mutacions en gens com ***TP53*** (localitzat a 17p) que tindrien lloc en l'etapa final d'aquest procés. (veure apartat 2.7.2 estudis moleculars del càncer de bufeta).

Cal tenir present que aquesta via no és més que un model d'acumulació d'alteracions, s'ha de tenir clar que no tots els carcinomes presenten totes aquestes mutacions, com es pot deduir dels diferents percentatges que s'han anat indicant. A més també poden tenir-ne d'altres; és per això que sembla que el més important és l'acumulació de múltiples alteracions genètiques, més que el fet de la seqüència en la que aquestes es produeixen (Fearon and Jones 1992).

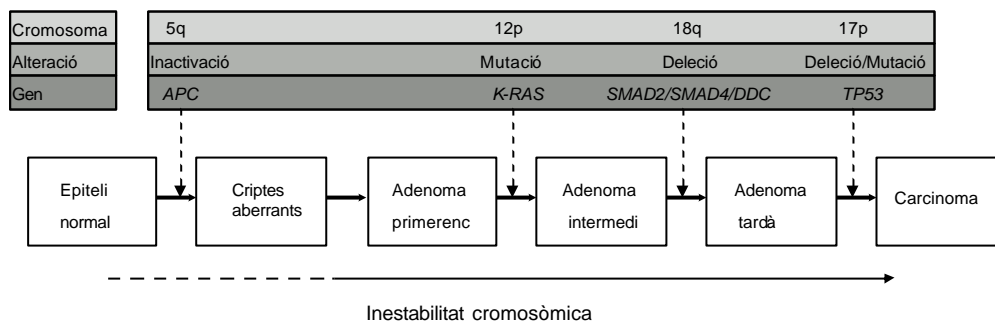


Figura 11: Esquema de l'acumulació de mutacions i inestabilitat cromosòmica en el càncer colorectal.

Inestabilitat de microsatèl·lits (MSI): Aquesta via es coneix també amb el nom de via mutadora, i es presenta tant en alguns casos esporàdics com en els casos hereditaris (HNPCC). En aquest cas més que fixar-nos amb mutacions concretes, ens centrarem en el dany genètic general acumulat que es tradueix en l'acumulació de mutacions en seqüències de microsatèl·lits.

Degut a aquesta inestabilitat la taxa de mutació seria més alta i això facilitaria l'evolució del tumor des dels estadis més primerencs (Loeb and Loeb 1999). S'ha de tenir en compte que hi ha autors que pensen que realment no és necessari l'existència de cap mecanisme que augmenti la taxa de mutacions, ja que els tumors *per se* podrien acumular gran nombre d'alteracions, i només seria necessària la pressió de la selecció per afavorir la seva evolució i acabar sent malignes (Tomlinson and Bodmer 1999).

Com ja s'ha comentat, hi ha una forta associació entre aquesta via i els HNPCC. Aquest síndrome és per tant un exemple de com el increment de la taxa de mutació, degut a la impossibilitat de reparar els errors d'aparellament de bases, és suficient per desestabilitzar el funcionament normal de la cèl·lula.

Inicialment es van descobrir quatre gens la mutació dels quals presentava una clara correlació amb l'aparició de HNPCC associat a inestabilitat de microsatèl·lits: *MSH2*,

MLH1, *PMS1* i *PMS2*. Tots quatre codifiquen per proteïnes del sistema de MMR en humans. Les mutacions en algun d'aquests gens, comporta l'aparició d'alteracions genètiques, de manera que fins a cert punt s'ha pogut establir la progressió d'aquesta segona via. L'inici estaria en la mutació d'algun dels gens mencionats, que generaria un primer nivell d'instabilitat. Aquesta instabilitat conduiria a l'aparició de mutacions secundaries en gens com *MSH3* i *MSH6*, gens de reparació els quals presenten microsatèl·lits en la seva seqüència codificant. En aquest punt, la instabilitat ja es veuria augmentada, de manera que s'acceleraria l'acumulació de mutacions en els gens implicats en el control del cicle cel·lular, control del creixement o de l'apoptosi, és a dir, en gens que impulsarien el procés de tumorigènesi, alguns d'aquests gens són: *TGF-βRII*, *BAX*, *IGF-RII* o *E2F-4* (Markowitz et al. 1995; Souza et al. 1996; Rampino et al. 1997). Les mutacions d'aquests gens també s'han implicat en la progressió d'adenoma a carcinoma.

Tot i que a priori les dues vies de progressió abans esmentades estan ben diferenciades, actualment es pensa que hi ha entre ambdós diferents punts de convergència, ja que en realitat són les mateixes vies de senyalització les que estan alterades.

4.5 CITOGENÈTICA DEL CÀNCER COLORECTAL

L'any 1988 Muleris i col. van estudiar citogenèticament una sèrie de 100 tumors de càncer colorectal, aquest estudi els va permetre obtenir dades per establir l'evolució d'aquests tumors i distingir entre alteracions cromosòmiques primerenques i alteracions més tardanes. Després d'analitzar amb profunditat els resultats obtinguts, els autors d'aquest treball van establir tres vies, en funció de les alteracions observades (Longy et al. 1990):

- **Monosòmics:** Representen el 70% dels casos. Es caracteritzen principalment per presentar delecions de determinats braços d'alguns cromosomes: -17p, -1p, -8p, -5q, -4q, i -9q. O bé de cromosomes sencers: -18, -14, -15, -21, i -22. Donant lloc a cèl·lules hipodiploides que tenen tendència a fer endoreduplicacions (dupliquen el contingut genètic, però no es produeix citocinesis) donant lloc a subclons hipotetraploides que posteriorment perden cromosomes arribant a un cariotip final pseudotriploide; és per això que es troben en algunes ocasions diferents subpoblacions de manera simultània.

Tot i que la característica principal d'aquest grup són les pèrdues, també podem trobar alguns guanys com: +X, +13, +20 i +7.

- **Trisòmics:** Representen el 20-25% dels casos. Aquí la característica principal és la tendència a guanyar cromosomes sencers, de manera que el nombre modal acostuma a estar entre 47 i 58 cromosomes. Les alteracions més freqüents són: +7, +13, +20, +12, +X i +8q.

- **Normals:** Representen un percentatge molt petit, el 5-7% dels casos. Presenten un cariotip normal. Algun d'aquests tumors corresponen al grup d'inestabilitat de microsatèl·lits.

Un estudi citogenètic de 24 pòlips procedents d'onze pacients va evidenciar la presència tant alteracions estructurals, com numèriques. Pel que fa a les alteracions estructurals els cromosomes més habitualment implicats eren els cromosomes 1, 13, 17 i 18, mentre que pel que fa a les numèriques els cromosomes que es trobaven més freqüentment guanyats eren: 7 (16/24), 13 (11/24), 20 (8/24) i 3 (6/24), i el que es perdia de manera més recurrent era el 18 (3/24). Sent la trisomia del cromosoma 7 l'alteració més freqüent, detectada inclús com a única alteració. També es va observar la trisomia del cromosoma 3, el que concordava amb estudis citogenètics previs (Bomme et al. 1998).

Al 1995 Ried i col. ja van relacionar l'augment d'alteracions genètiques amb la progressió d'aquesta neoplàsia. Adenomes de baix grau presentaven menys alteracions que adenomes d'alt grau, alhora que aquests presentaven menys alteracions que els carcinomes. Un exemple d'això el trobem amb els guany de 7p: present en un 7.1% dels adenomes de baix grau, en el 33.3% dels adenomes d'alt grau i en un 50% en el cas dels carcinomes. Similar és el cas del guany de 20q, que no es detecta en els adenomes de baix grau, presenta un 33.3% en els adenomes d'alt grau i un 75% en el cas dels carcinomes (Rooney et al. 1999).

Rooney i col. (1999) van realitzar un estudi de diferents tipus de neoplàsies, i van determinar que en el cas del còlon els cromosomes en els que es trobaven més habitualment pèrdues eren: Y (31.3%), 4q (22.5%), 19p (15%), 1p i 9p (12.5%), 5q (11.3%); i els que es guanyaven més freqüentment eren: 17q (33.8%), 20q (27.5%), 7p i 8q (23.8%), 17p (22.5%), 20p (17.5%).

Estudis posteriors (Knosel et al. 2004) van identificar alteracions cromosòmiques que es trobaven associades amb la progressió tumoral i la metàstasi. Aquestes alteracions eren pèrdues de 1p, 3p, 4, 5q, 10q, 14q i 21q, i guanys de 1q, 11, 12qter, 17q12-q21, 19 i 22q.

Cal destacar que en gran quantitat d'estudis (utilitzant diversitat de tècniques), s'observa de manera habitual la pèrdua de 18q (Bardi et al. 1993, 1995; Bomme et al. 1994, 1996; Muleris et al. 1990, 1994).

PREMISSA I OBJECTIUS

El càncer es un conjunt de malalties que es caracteritzen per l'acumulació de múltiples alteracions genètiques. L'anàlisi global del genoma tumoral que permet fer la tècnica de CGH, ens dona informació sobre quins desequilibris, ja siguin guanys o pèrdues, es produeixen més freqüentment i per tant quines regions serien susceptibles de contenir gens supressors de tumors o oncògens.

Els tumors de bufeta són un grup heterogeni tant morfològica com clínicament. Aquesta heterogeneïtat biològica pot ser el reflexa d'una heterogeneïtat genètica subjacent implicada en les diverses vies de progressió i desenvolupament tumorals.

La freqüent presència de tumors múltiples sincrònics és una característica del càncer urotelial que el converteix en un model excepcional per l'anàlisi de les diferents relacions entre tumors esporàdics sincrònics.

Pel que fa als tumors sincrònics familiars, tant els pacients afectats de FAP com els afectats de HPRC proporcionen un model natural excel·lent per estudiar les alteracions presents en estadis primerencs de la evolució tumoral i poden proporcionar important informació sobre el dinamisme de formació de les alteracions en tumors sincrònics. El component hereditari d'aquests tumors els fa especialment interessants.

OBJECTIUS

Aportar noves dades sobre els desequilibris genòmics en tumors urotelials:

1. Determinar els desequilibris genòmics més freqüents i establir una relació entre alguns d'aquests desequilibris i els estadis i graus tumorals.
2. Classificar els tumors superficials en base als seus patrons de desequilibris genòmics.

Estudiar possibles vies d'evolució en tumors múltiples sincrònics tant esporàdics com familiars

- 3 Analitzar si els tumors urotelials esporàdics, que de forma sincrònica apareixen en un mateix pacient, tenen el seu origen en un únic tumor inicial i són representatius de diferents moments de la evolució tumoral.
- 4 Estudiar els patrons d'evolució genètica en adenomes i carcinomes de HPRC. Estudiar els patrons d'evolució en càncer colorectal a partir de l'anàlisi dels desequilibris presents en adenomes i carcinomes procedents de pacients afectes de FAP.

MATERIAL I MÈTODES

1 MOSTRES

Les mostres tumorals a partir de les quals s'ha realitzat aquest treball, s'han obtingut gràcies a la col·laboració de diferents centres:

- Fundació Puigvert (PV).
- Hospital del Mar (HM).
- Institut Català d'Oncologia (ICO).

Els tipus de tumors amb els que s'ha treballat han estat:

- 79 tumors de cèl·lules transicionals (TCC) de bufeta i 1 tumor de pelvis renal, procedents de 74 pacients.
- 9 tumors renals, procedents de 3 pacients afectats de càncer renal papil·lar de tipus familiar o hereditari (HPRC). Els tres pacients pertanyen a una mateixa família.
- 47 tumors de colon, procedents de 6 pacients amb poliposi còlica familiar (FAP).

Prèviament a l'obtenció de les mostres, tot els estudis van ser aprovats pel comitè ètic i d'investigació clínica (CEIC) de cada centre, i també es va obtenir el consentiment informat per escrit de cada pacient.

Per establir el grau i l'estadi de cada tumor s'ha utilitzat el sistema WHO (World Health Organization) i el sistema TNM (Classification of Malignant Tumors, 2002).

Les dades clíniques i histopatològiques de tots els pacients estudiats es mostren a les taules I-V. Totes elles mantenen la nomenclatura, pel que fa a nom dels casos que es va utilitzar alhora d'escriure els diferents treballs que s'han obtingut com a conseqüència d'aquesta tesi.

Al llarg de les diferents taules es repeteix de manera constant una sèrie d'abreviacions, que s'especifiquen a continuació:

B	Bufeta
BMN	Biopsia múltiple normalitzada
CIS/Tis	Carcinoma in situ
HM	Hospital del Mar
ICO	Institut Català d'Oncologia
M	Múltiple
P	Pelvis renal
PV	Fundació Puigvert
RTU	Resecció transuretral
U	Únic

Tant a la taula VI com a la taula VII, hi ha diverses columnes on s'indica la informació referent a les recidives (en cas que el pacient n'hagi tingut). La primera xifra que s'observa és el nombre de mesos que han passat des de la darrera intervenció per extreure un tumor urotelial, al costat hi ha indicat l'estadi i grau del tumor, i a sota el tipus d'intervenció que es va realitzar.

Pel que fa a la columna de la supervivència, els casos en els que hi ha un interrogant és degut a que no se sap res del pacient posteriorment a que se li donés l'alta després de la intervenció.

Taula VI: Pacients amb tumor de cèl·lules transicionals de bufeta (extracció de DNA feta a partir de mostres congelades).

Cas	Edat/Sexe	Centre	Primari	Estadi/Grau	Intervenció	Recidiva 1	Recidiva 2	Recidiva 3	Recidiva 4	Recidiva 5	Recidiva 6	Supervivència
1	70/♂	HM	Si	TaG1	RTU	NO						?
2	87/♀	HM	Si	TaG2	RTU	NO						?
3	61/♂	HM	Si	TaG2	RTU	NO						>7 anys
4	88/♂	HM	Si	TaG2	CIRURGIA OBERTA	NO						>10 anys
5	66/♂	HM	Si	TaG2	RTU	NO						>5 anys
6	93/♀	HM	No	TaG2	BIOPSIA	NO						>24 mesos
7	70/♂	HM	Si	TaG2	RTU	4 Tis CISTECTOMIA						>6 anys
8	76/♀	HM	Si	TaG2	RTU	8 TaG2 CISTECTOMIA						>42 mesos
9	81/♂	HM	Si	TaG2	RTU	28 T1G2 RTU	8 T2G3 RTU	17 T2G3 RTU				?
10	72/♀	HM	Si	T1G2	RTU	NO						>5 anys
11	61/♂	HM	Si	T1G2	RTU	NO						>6 anys
12	59/♂	HM	Si	T1G2	RTU	NO						>6 anys
13	76/♀	HM	Si	T1G2	RTU	7 T1G2 RTU	30 TaG1 RTU	2 TaG1 RTU	12 TaG1 RTU	10 TaG1 RTU	12 TaG1 RTU	>9 anys
14	74/♂	HM	Si	T1G2	RTU	55 TaG2 RTU						>7 anys

Cas	Edat/Sexe	Centre	Primari	Estadi/Grau	Intervenció	Recidiva 1	Recidiva 2	Recidiva 3	Recidiva 4	Recidiva 5	Recidiva 6	Supervivència
15	71/♂	HM	Si	T1G2	RTU	6 T1G2 RTU						>9 anys
16	80/♀	HM	Si	T1G2	RTU	8 T1G2 RTU	28 T1G2 RTU	22 T1G2 RTU	30 T1G2 RTU	23 T1G2 RTU		>10 anys
17	68/♂	HM	Si	T1G2	RTU	8 T1G2 RTU	15 T1G2 RTU	34 TaG1 RTU	43 TaG1 RTU	3TaG1 RTU	17 TaG1 RTU	>10 anys
18	70/♂	PV	No	T1G2	RTU	19 T1G2 RTU	20 T1G2 RTU					>108
19	60/♂	PV	No	T1G2	CISTECTOMIA	NO						22 mesos
20	33/♀	PV	No	T1G2	RTU	20 TaG2 RTU						>8 anys
21	77/♂	HM	Si	T1G3	CISTECTOMIA	NO						24 mesos
22	74/♀	HM	?	T1G3	RTU	NO						16 mesos
23	62/♂	HM	Si	T1G3	RTU	17 T1G3 RTU	13 T1G3 RTU					>5 anys
24	77/♂	PV	Si	T1G3	RTU	12 T1G3 RTU	1 Tis BIOPSIA	15 TaG3 BIOPSIA				>5 anys
25	58/♂	HM	Si	T2G3	CISTECTOMIA	NO						>13 anys
26	70/♂	HM	Si	T2G3	RTU	16 T1G3 RTU	3 T2G3 CISTECTOMIA					>48 mesos
27	75/♂	HM	Si	T2G3	RTU	2 No Tumor CISTEC.PARCIAL						7 mesos
28	80/♂	HM	Si	T2G3	CISTECTOMIA	NO						>5 anys
29	60/♂	HM	No	T3G3	CISTECTOMIA	NO						10 mesos
30	79/♂	HM	No	T4G3	CISTECTOMIA	NO						?

Taula VII: Pacients amb tumor de cèl·lules transicionals de bufeta (extracció de DNA feta a partir de mostres incloses en parafina).

Cas	Edat/Sexe	Centre	Estadi/Grau	BMN	U/M	CIS	Recidiva 1	Recidiva 2	Recidiva 3	Recidiva 4	Recidiva 5	Supervivència
U-1	46/♂	PV	TaG1	-	U	-	NO					>7 anys
U-2	48/♂	PV	TaG1	-	U	-	NO					>6 anys
U-3	57/♂	PV	TaG1	-	M	-	19 TaG2 RTU / BMN -	15 TaG1 RTU / BMN -				>6 anys
U-4	68/♂	PV	TaG1	-	U	-	15 TaG2 RTU / BMN -	10 T1G1 RTU / BMN +	13 TaG1 RTU / BMN +	8 TaG2 BIOPSIA	14 TaG1 RTU / BMN -	>7 anys
U-5	63/♀	PV	TaG1	-	U	-	19 TaG2 RTU / BMN -					>6 anys
U-6	68/♂	PV	TaG1	+	U	+	28 TaG1 RTU / BMN -					>6 anys
U-7	66/♂	PV	TaG1	-	U	-	NO					>5 anys
U-8	45/♂	PV	TaG1	-	U	-	NO					>6 anys
U-9	67/♂	PV	TaG1	-	U	-	9 TaG3 BIOPSIA	11 TaG2 BIOPSIA				>6 anys
U-10	58/♂	PV	TaG1	-	U	-	67 T?G2 RTU / BMN -					>5 anys
U-11	60/♂	PV	TaG2	+	U	-	8 TaG2 RTU / BMN -	10 TaG2 RTU / BMN -	52 TaG2 RTU / BMN -			>7 anys
U-12	66/♂	PV	TaG2	+	U	+	4 T?G2 BIOPSIA	60 TaG2 RTU / BMN -	8 TaG2 RTU / BMN -			>7 anys
U-13	52/♀	PV	TaG2	-	M	-	37 TaG1 RTU / BMN -					>7 anys
U-14	67/♂	PV	TaG2	-	U	-	12 TxG3 RTU / BMN -	10 T?G3 BIOPSIA	30 TaG2 RTU / BMN -			>6 anys

Continuació de la taula VII: Pacients amb tumor de cèl·lules transicionals de bufeta (extracció de DNA feta a partir de mostres incloses en parafina).

Cas	Edat/Sexe	Centre	Estadi/Grau	BMN	U/M	CIS	Recidiva 1	Recidiva 2	Recidiva 3	Recidiva 4	Recidiva 5	Supervivència
U-15	45/♂	PV	TaG2	-	U	-	8 TaG2 RTU / BMN -	13 T1G3 RTU / BMN -				>36 mesos
U-16	55/♂	PV	TaG2	-	U	-	NO					?
U-17	73/♂	PV	TaG2	-	U	-	7 Tis BIOPSIA					>5 anys
U-18	73/♂	PV	T1G2	+	U	+	NO					>41 mesos
U-19	68/♂	PV	T1aG2	-	U	-	NO					>6 anys
U-20	60/♂	PV	T1G2	-	U	-	10 TxG2 BIOPSIA	17 T1aG2 RTU / BMN +	9 TxG2 BIOPSIA	6 T1G2 RTU / BMN -	7 T1G2 RTU / BMN +	54 mesos
U-21	55/♂	PV	T1G2	-	U	-	10 T?G2 BIOPSIA	3 TaG1 BIOPSIA				>6 anys
U-22	60/♂	PV	T1G2	-	M	-	NO					>5 anys
U-23	49/♂	PV	T1G3	+	M	+	NO					>5 anys
U-24	54/♂	PV	T1G3	-	U	-	NO					>6 anys
U-25	71/♂	PV	T1aG3	+	U	+	NO					56 mesos
U-26	40/♂	PV	T1aG3	+	M	+	NO					?
U-27	62/♂	PV	T1bG3	+	M	+	NO					>30 mesos
U-28	62/♂	PV	T1aG3	+	M	+	NO					>6 anys
U-29	77/♂	PV	T1bG3	-	U	-	3 T1G3 CISTECTOMIA					>39 mesos

Continuació de la taula VII: Pacients amb tumor de cèl·lules transicionals de bufeta (extracció de DNA feta a partir de mostres incloses en parafina).

Cas	Edat/Sexe	Centre	Estadi/Grau	BMN	U/M	CIS	Recidiva 1	Recidiva 2	Recidiva 3	Recidiva 4	Recidiva 5	Supervivència
U-30	63/♂	PV	T1G3	+	M	-	NO					>7 anys
U-31	67/♂	PV	T1aG3	+	M	+	9 TxG3 RTU / BMN -	4 T1aG3 RTU / BMN -	10 TxG3 BIOPSIA			31 mesos
U-32	72/♂	PV	T1G3	-	U	-	NO					>6 anys
U-33	67/♂	PV	T1bG3	+	U	+	T2 Anaplastic CISTECTOMIA					?
U-34	63/♂	PV	T1aG3	+	M	+	31 TaG1 RTU / BMN -					>7 anys
U-35	51/♂	PV	T1aG3	+	M	+						>6 anys
U-36	44/♂	PV	T1G3	+	U	+	NO					>7 anys
U-37	73/♂	PV	T1cG3	-	U	-	NO					>3 mesos
U-38	54/♂	PV	T1G3	+	U	+	NO					>42 mesos
U-39	71/♂	PV	T1aG3	+	M	+	8 Tis RTU / BMN +					>5 anys

Taula VIII: Pacients amb tumors de cèl·lules transicionals urotelials. Els pacients A i B van ser utilitzats com a controls, perquè tot i tenir lesions macroscòpicament diferents, corresponien a diferents regions d'un únic tumor; els pacients C, D i E eren pacients que presentaven tan macroscòpicament com microscòpicament múltiples tumors de bufeta.

Cas	Edat/Sexe	Centre	Unic/Multiple	Mostres analitzades	Localització	Estadi/Grau
A	83/♂	HM	U	A1	P	TaG3
				A2	P	TaG3
				A3	P	TaG3
B	79/♂	HM	U	B1	B	T3G3
				B2	B	T3G3
C	68/♂	HM	M (3)	C1	B	T1G3
				C2	B	T1G3
				C3	B	T1G3
D	79/♂	HM	M (3)	D1	B	TaG3
				D2	B	TaG3
				D3	B	TaG3
E	88/♀	HM	M (2)	E1	B	TaG2
				E2	B	TaG2

Taula IX: Pacients amb carcinoma renal papil·lar de tipus familiar o hereditari (HPRC). L: indica que la mostra provenia del ronyó esquerra, i R indica que la mostra analitzada provenia del ronyó dret.

Cas	Edat/Sexe	Centre	Grau	Mostres analitzades
III-3	56/♂	PV	II	L1
				L2
III-5	48/♂	PV	II	L1
				L2
III-17	24/♂	PV	I-II	L1
				L2
				L3
				R4
				R5

Taula X: Pacients amb poliposi adenomatosa familiar (FAP).

Cas	Edat/Sexe	Centre	Aden. presents	Aden. analitzats	Carci. presents	Carci. analitzats
A	41/♀	ICO	120	6	Si	1
B	38/♂	ICO	223	7	Si	-
C	50/♀	ICO	81	8	No	-
D	60/♂	ICO	196	6	No	-
E	48/♀	ICO	230	8	Si	1
F	67/♂	ICO	106	10	No	-

En el cas de l'estudi de pacients amb Poliposi Adenomatosa Familiar cal fer un incís; l'estudi de CGH es va realitzar en un total de 45 adenomes i de 2 carcinomes, procedents de 6 pacients amb FAP; les mostres d'adenomes es van obtenir i numerar des de la part distal del colon, fins al colon dret incloent també la regió transversa del mateix; de manera que si dividim tota aquesta secció en cinc regions, es va intentar agafar mostres (entre 1 i 2) de cada una de les cinc parts. Pel que fa als carcinomes,

en el cas de pacient A, aquest es trobava a la regió 1 (la més distal), mentre que el carcinoma del pacient E es trobava a la regió 2.

2 TÈCNIQUES

2.1 EXTRACCIÓ DE DNA

Per a la realització de la major part dels estudis que s'han dut a terme en aquest treball va resultar imprescindible realitzar l'extracció de DNA de les mostres. Hi ha diferents mètodes d'extracció de DNA des dels més tradicionals i laboriosos (ex: fenol-cloroform), als més moderns i senzills (ex: els *kits* comercials d'extracció).

En els estudis que aquí es presenten s'han utilitzat dos mètodes d'extracció diferents en funció del tipus de mostra que s'havia de processar:

- Teixit congelat: extracció del DNA amb fenol-cloroform, per tal d'aconseguir un DNA d'alta qualitat, de manera que estigui en condicions òptimes per poder aplicar tècniques de citogenètica molecular.
- Teixit parafinat: extracció amb *kit* comercial. Per tal d'intentar optimitzar al màxim la quantitat i qualitat de DNA en mostres problemàtiques, com són els teixits inclosos en parafina.

2.1.1 EXTRACCIÓ DE DNA DE TEIXIT CONGELAT

Amb aquest tipus de mostra s'ha utilitzat l'extracció amb el mètode estàndard de fenol-cloroform. L'extracció fenòlica és un procediment comú al laboratori. Serveix per eliminar el component proteic de la mostra i altres contaminants presents durant el procés d'alliberament dels àcids nucleïcs.

Aquest és un protocol clàssic i laboriós, però la seva principal característica és l'obtenció d'un DNA d'alta qualitat.

Per obtenir aquest DNA de bona qualitat cal mantenir la mostra congelada des del moment d'obtenció al quiròfan, fins al moment de començar l'extracció al laboratori. Per tal de no trencar aquesta cadena de fred, el primer pas d'aquesta extracció es fa en una atmosfera de nitrogen líquid.

Les mostres de teixit fresc les varem obtenir a través dels serveis d'Urologia de l'Hospital del Mar i de la Fundació Puigvert.

Notes prèvies

Relatives a la seguretat:

Cal evitar qualsevol contacte del fenol o del nitrogen líquid amb la pell, ja que produeix cremades; és important la protecció ocular quan es manipulen aquests reactius.

Cal evitar la inal·lació del fenol ja que és tòxic. És per aquest motiu que és necessari treballar en una campana d'extracció de gasos.

Relatives al mètode:

Els volums de reactius que hi ha a l'apartat de mètode fan referència a una mostra d'una mida aproximada a una lletia (entre 50-200 mg). Si la mostra és més gran, s'haurà d'afegir més *buffer* d'homogeneïtzació i proteïnasa K, en proporció a la mida de la mostra.

Després de cada centrifugació, quan s'hagi de pipetejar la fase superior, es farà amb la punta de la pipeta tallada (amb la fulla d'un bisturí), per tal de conservar el DNA genòmic sencer i no fragmentar-lo.

Els reactius: fenol, cloroform i isoamilic, s'han de mantenir protegits de la llum i a temperatura ambient, excepte el fenol que el guardarem a 4°C; també es pot fer la barreja (mantenint les proporcions) i guardar-lo a 4°C protegit de la llum.

Relatives a la conservació de la mostra:

Un cop s'ha resuspès el DNA, es pot mantenir la mostra a la nevera (segellar l'ependorf amb parafilm), o bé es pot congelar a -80°C.

A. Reactius i materials

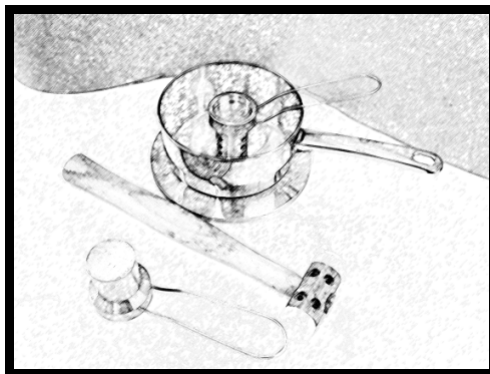
Reactius i solucions

- Nitrogen líquid.
- *Buffer* d'homogeneïtzació:
 - 100 mM NaCl.
 - 10 mM Tris HCl.
 - 25 mM EDTA 0.5%SDS.Ajustar el pH a 8.
- Proteïnasa K (30 ng/ml) (Boehringer Mannheim. Cat.161519).
- Fenol (veure: APENDIX 2.1.1: PREPARACIÓ DEL FENOL).
- Cloroform (PROBUS. Cat.1908).

- Alcohol Isoamílic (Schorlav. Cat.ME0376).
- NaCl 5M:
 - 146'10 gr. NaCl.
 - 500 ml H₂O.Esterilitzar la solució.
- Etanol absolut.
- Etanol al 70%.
- Aigua tridestil·lada (MiliQ), estèril.

Materials i equipaments

- Recipient metàl·lic, per polvoritzar el teixit.



- Martell.
- Tubs de 50 ml estèrils.
- Vortex.
- Bany a 56°C.
- Campana extractora de gasos.
- Eppendorf estèrils 1'5 ml.
- Centrifuga amb rotor per tubs de 50 ml (Heraeus Megafuge 2.0R).
- Material addicional: guants, protecció ocular, micropipetes amb les puntes (estèrils) corresponents, fulla de bisturí estèril, parafilm i agulles estèrils.

B. Mètode

1. Picar la mostra fins a la seva polvorització en un recipient metàl·lic en el centre del qual, hi ha una base on es diposita la mostra. Sobre la mostra s'hi posarà una altra peça metàl·lica, i es polvoritzarà amb l'ajut d'un martell (en un entorn de nitrogen líquid).
2. Posar la mostra polvoritzada dins un tub de 50 ml.
3. Afegir 5 ml de *buffer* d'homogeneïtzació.

4. Agitar manualment.
5. Afegir 33'3 µl de Proteïnasa K (30 ng/ml).
6. Agitar suaument amb el Vortex.
7. Tapar el tub i "segellar-lo" amb parafilm.
8. Posar el tub en un bany a 56 °C O/N.

9. Afegir v/v la barreja de fenol / cloroform / alcohol isoamílic (2'5 ml/2'4 ml/0'1 ml).
10. Agitar amb vigorositat.
11. Centrifugar durant 10 minuts a 8°C, a 3000 rpm.
12. Passar la fase superior a un altre tub.
13. Repetir de nou l'operació (dels punts 9-12).
14. Afegir v/v la barreja de cloroform / alcohol isoamílic (4'8 ml/0'2 ml).
15. Agitar amb vigorositat.
16. Centrifugar 10 minuts a 8°C, a 3.000 rpm.
17. Passar la fase superior a un altre tub.
18. Centrifugar 5 minuts a 8°C, a 3.000 rpm.
19. Passar amb molt de compte la fase superior a un altre tub.
20. Afegir NaCl 5M a raó de 400 µl per cada 5 ml de solució.
21. Agitar cuidadosament.
22. Afegir etanol absolut a raó de 2 v/v.
23. Agitar amb compte fins veure aparèixer la medusa de DNA.
24. "Pescar" el DNA, rentar-lo per immersió en etanol al 70%, i passar-lo a un tub nou.
25. Tapar els tub només amb parafilm.
26. Amb una agulla, fem forats al parafilm.
27. Deixar assecar el DNA: deixar el temps necessari fins que no s'observi res, el DNA un cop sec té un aspecte similar al plàstic transparent.
28. Afegir aigua estèril per ressuspèndre el DNA (el volum d'aigua dependrà de la mida que s'hagi observat de medusa).
29. Un cop ressuspès, passar el volum total a un eppendorf.

APENDIX 2.1.1: PREPARACIÓ DEL FENOL

Consisteix a saturar el fenol amb una solució de Tris pH 7.8 i tamponar-lo de manera que després ens serveixi per obtenir l'àcid nucleic que ens interessa, en aquest cas el DNA.

Notes prèvies

Relatives a la seguretat:

Evitar la inhalació i el contacte del fenol amb la pell. Utilitzar protecció ocular.

Relatives al mètode:

Haurem de tenir en compte que el fenol es guarda al congelador (-20°C), i per tant s'haurà de preveure el temps que triga a descongelar-se. Com que es força temps, també es pot agilitzar aquest pas previ, posant-lo dins d'un bany a baixa temperatura.

Relatives a la conservació del reactiu:

El fenol s'ha de mantenir protegit de la llum, i guardar-lo a 4°C.

Reactius i solucions

- Fenol (Fluka. Cat.77613).
- Tris 0'5M pH 8.
- Tris 0'1M pH 8.

Materials i equipaments

- Ampolla estèril de 100 ml.
- Agitador.
- pH-metre (Crison. micro pH2002).
- Material addicional: guants, protecció ocular, paper d'alumini, pipetes i puntes estèrils.

Mètode

- Posar 50 ml de fenol en una ampolla estèril de 100 ml.
- Afegir 50 ml de Tris 0'5M pH 8.
- Agitar vigorosament durant 20 minuts aproximadament.
- Deixar a la nevera unes quantes hores fins que es separin clarament, dues fases (tota la nit a ser possible).
- Aspirar la fase superior.
- Afegir 50 ml Tris 0'1M pH 8.
- Agitar aprox. 20 minuts.
- Deixar reposar a la nevera fins que es separin dues fases.
- Aspirar la fase aquosa (la superior).

- Afegir 50 ml Tris 0´1M pH 8.
- Agitar aprox. 20 minuts.
- Deixar a la nevera i esperar que es separin dues fases.
- Aspirar la fase superior (deixant aproximadament 1 cm).
- Mirar que el pH sigui superior a 7´8 (si no ho fos afegir de nou 50 ml de Tris 0´1M pH 8, i anar repetint fins aconseguir aquest pH).
- Deixar a la nevera, protegit de la llum.

2.1.2 EXTRACCIÓ DE DNA DE TEIXIT PARAFINAT

Amb aquest tipus de mostra l'extracció s'ha realitzat mitjançant la utilització d'un *kit*: QUIAamp® DNA Mini Kit (Quiagen).

Aquest és un protocol ràpid i senzill, que ens permet obtenir un DNA prou net per poder realitzar posteriorment tècniques de biologia molecular.

Els talls de teixit els varem obtenir dels serveis d'Anatomia Patològica tant de l'Hospital de Mar com de la Fundació Puigvert. Són talls de 10 micres i s'utilitzen entre 2-3 talls per aconseguir una bona quantitat de DNA.

En els casos dels que es disposa també de talls muntats sobre portes, es pot precisar millor la quantitat de material que hi ha per tall, de manera que si s'observa que en el tall del porta hi ha una quantitat de teixit petita, podem afegir algun tall més alhora de realitzar l'extracció.

Notes prèvies

Relatives a la seguretat:

El xilè és un producte nociu, cal evitar la inhalació i el contacte amb la pell; per això es treballarà sempre sota campana i amb guants.

Relatives al tipus de mostra:

Cal tenir en compte que el DNA que s'obtindrà d'aquests tipus de mostra estarà molt fragmentat, i que això ens pot plantejar problemes segons les metodologies que s'hagin d'emprar amb aquestes mostres.

A. Reactius i materials

Reactius i solucions

- Xilè (Panreac. Cat.131769).
- Etanol absolut (MERCK. Cat.100983).
- QUIAamp® DNA Mini Kit (Quiagen. Cat.51304).

Materials i equipaments

- Eppendorf estèrils de 1'5 ml.
- Campana extractora de gasos.
- Vortex.
- Centrifuga per eppendorf.
- Estufa a 37°C.
- Bany a 56°C.
- Bany a 70°C.
- Material addicional: guants, fulla de bisturí estèril i micropipetes amb les puntes (estèrils) corresponents.

B. Mètode

1. Posar de 3-4 talls dins un eppendorf estèril.
2. Afegir 1.200 µl xilè.
3. Vortex fort.
4. Centrifugar 5 minuts a 12.000 rpm, a RT.
5. Treure sobrenadant.
6. Afegir 1.200 µl etanol absolut.
7. Vortex suau.
8. Centrifugar 5 minuts a 12.000 rpm, a RT.
9. Treure sobrenadant.
10. Afegir 1.200 µl etanol absolut.
11. Vortex suau.
12. Centrifugar 5 minuts a 12.000 rpm, a RT.
13. Treure sobrenadant.
14. Deixar el tub obert 15 minuts a 37°C.
15. Resuspendre el pellet amb 180 µl de Buffer-ATL (QUIAamp® DNA Mini Kit).

16. Afegir 20 µl de Proteinasa-K (QUIAamp® DNA Mini Kit).
17. Fer un vortex.
18. Deixar el tub al bany 56°C O/N.

19. Fer un spin.
20. Afegir 200 µl de Buffer-AL (QUIAamp® DNA Mini Kit).
21. Vortex de 15 segons.
22. 10 minuts a 70°C.
23. Fer un spin.
24. Afegir 200 µl d'etanol.
25. Vortex 15 segons.
26. Fer un spin.
27. Passar (pipetejar amb la punta tallada) tot el contingut a una columneta (QUIAamp® DNA Mini Kit).
28. Centrifugar 1 minut a 8.000 rpm, a RT.
29. Canviar la part inferior de la columneta (QUIAamp® DNA Mini Kit).
30. Afegir 500 µl de Buffer-AW1 (QUIAamp® DNA Mini Kit).
31. Centrifugar 1 minut a 8.000 rpm, a RT.
32. Canviar la part inferior (QUIAamp® DNA Mini Kit).
33. Afegir 500 µl de Buffer-AW2 (QUIAamp® DNA Mini Kit).
34. Centrifugar 3 minuts a 14.000 rpm, a RT.
35. Acoblar la columneta a un eppendorf.
36. Afegir 200 µl de Buffer-AE (QUIAamp® DNA Mini Kit).
37. Deixar 1 minut a RT.
38. Centrifugar 1 minut a 8.000 rpm.
39. Afegir 100-200 µl de Buffer-AE.
40. Deixar 1 minut a RT.
41. Centrifugar 1 minut a 8.000 rpm, a RT.

2.2 QUANTIFICACIÓ DEL DNA

La quantificació del DNA és el preludi de molts experiments de laboratori. Hi ha diferents mètodes per quantificar el DNA: gels d'agarosa, espectrofotometria i/o fluorimetria.

Durant la realització d'aquest treball s'ha hagut de fer extracció i quantificació de DNA de diferents tipus de teixits, amb la finalitat d'aplicar la tècnica d'hibridació genòmica comparada. Aquesta és una tècnica que requereix una quantificació precisa, ja que es basa en la hibridació competitiva i simultània de dos DNAs, i per tant és fonamental posar-hi quantitats equivalents. És per això que el fet de quantificar el DNA de manera acurada té una gran importància.

Els mètodes de quantificació que s'han utilitzat durant la realització d'aquests estudis han estat:

1. Gels d'agarosa.
2. Fluorímetre.

2.2.1 GELS D'AGAROSA

La mobilitat que experimenta el DNA dins d'una matriu d'agarosa en ser sotmès a un camp elèctric depèn de la longitud de la molècula i de la grandària del porus del gel, de manera que la velocitat a la que avança és inversament proporcional a la grandària de la molècula. Tret de la possibilitat que el DNA pugui trobar-se en diferents conformacions (linear, circular superenrotllat, circular relaxat), cap altre factor condiona el seu desplaçament. A més, el fet que el DNA posseeixi cadenes complementaries evita l'aparició d'estructures secundaries, al contrari del que succeeix quan es treballa amb RNA.

Els gels d'agarosa contenen únicament agarosa i un tampó, i això permet que els fragments de DNA preservin la seva integritat.

La visualització del gel es fa de forma directe per mitjà de l'aplicació d'una font de llum ultraviolada (UV). Això és possible gràcies a un agent intercalant dels àcids nucleïcs, el bromur d'etidi (BrEt) que té la particularitat d'emetre fosforescència al ser exposat a aquesta il·luminació (310 nm).

El format de gel més utilitzat en aquest treball ha estat el de 7x8 cm, però també es d'ús habitual el de 12x14 cm.

Per determinar la concentració d'un DNA problema, el que es fa en primer lloc és quantificar el DNA que s'utilitzarà com a control, i es fa amb l'ajut d'un DNA comercial

de concentració coneguda. Per quantificar el nostre control el que es farà serà carregar-lo en un gel d'agarosa al costat del control comercial. Aquest control comercial es correrà a diferents dilucions per tal de tenir més d'una referència, i després carregarem al costat la nostra mostra. Per comparació d'intensitat de les bandes es podrà donar un valor al nostra DNA. El valor es verificarà fent els càlculs corresponents, tenint en compte el volum que s'ha carregat i el valor de concentració que s'observa, i corrent gels successius.

Un cop quantificat el nostre control (del que es carreguen diferents dilucions, que acostumen a ser 50 i 100 ng/ μ l) es repetirà el procediment, ara entre el nostre control i la mostra.

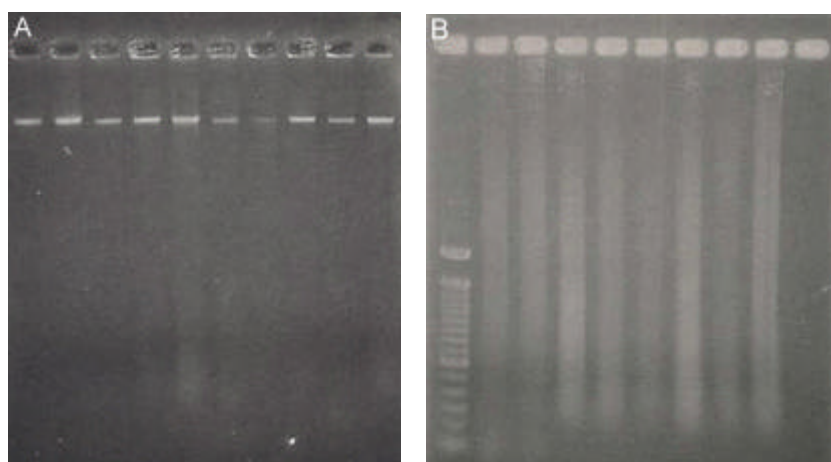


Figura 12: Quantificació mitjançant gels d'agarosa. A: DNAs procedents de teixit fresc. B: DNAs procedents de mostres parafinades.

Notes prèvies

Relatives a la seguretat:

El BrEt és un agent carcinogen, i per tal s'haurà de manipular amb una precaució extrema. Qualsevol material que estigui en contacte amb solucions que continguin BrEt s'haurà de mantenir a una zona delimitada i senyalitzada de manera correcta. Sempre que s'estigui a prop d'aquesta zona s'haurà d'utilitzar guants de nitril. Els residus que es generin s'hauran de dipositar en contenidors específics per aquest fi. La radiació UV pot provocar inflamacions a la còrnia i danys a la retina. Per evitar això cal protegir-se dels raig UV amb una pantalla o màscara protectora.

Relatives a l'obtenció d'un resultat òptim:

Pel que fa als temps d'electroforesi, dependran de la grandària dels fragments a separar. Els fragments petits són els que es separen més ràpid.

Tenir present que voltatges elevats solen afectar la mobilitat dels fragments més grans.

A. Reactius i materials

Reactius i solucions

- Gel d'agarosa (veure: APENDIX 2.2.1: PREPARACIÓ D'UN GEL D'AGAROSA).
- TAE 1x:
 - 20 ml TAE 50x (121 gr. Tris + 28'55 ml Àcid Acètic glacial + 50 ml EDTA 0'5M).
 - 80 ml H₂O miliQ.
- BrEt. (SIGMA. Cat.E1510).
- DNA control. (SIGMA. Cat.D-6537).
- *Loading Buffer*.
 - 0'25% Blau de bromofenol (0'005 gr.).
 - 40% Sucrosa (0'8 gr.).
- Enrasar fins 2 ml, agitar i guardar a 4°C.
- H₂O miliQ.

Materials i equipaments

- Mostres a quantificar; es dipositarà dins l'eppendorf (de 1'5 ml): 1 µl de *loading buffer* +1 µl de la mostra + 8 µl d'aigua tridestil·lada (MiliQ).
- Sistema d'electroforesi: receptacle de metacrilat, coberta, cables de connexió, safata de 7x8 cm i font d'electroforesis.
- Transil·luminador UV o equivalent que emeti a una longitud d'ona de 310 nm.
- Sistema de fotografia Polaroid, i pel·lícules Polaroid (ARPI. Cat.667).
- Agitador.
- Material addicional: guants de nitril, protecció ocular, micropipetes amb les puntes (estèrils) corresponents.

B. Mètode

1. Omplir el sistema d'electroforesi amb tampó TAE 1x.
2. Col·locar el gel d'agarosa al interior del sistema d'electroforesi (el gel ha de quedar submergit en el tampó).
3. Preparar les mostres per carregar-les.
4. Carregar el gel i fer-lo corre a 120 V, durant 35 minuts.
5. Tenyir el DNA durant aproximadament 15 minuts, posant el gel dins d'una cubeta en agitació, amb aigua destil·lada i BrEt.
6. Fer un rentat ràpid amb aigua destil·lada, per tal d'eliminar l'excés de BrEt (també en agitació).
7. Visualitzar el resultat, posant el gel en el transil·luminador.
8. Realitzar la fotografia (si és necessari) per tenir una imatge gràfica del resultat obtingut.

APENDIX 2.2.1: PREPARACIÓ D'UN GEL D'AGAROSA

Aquest és un procediment molt senzill i utilitzat al laboratori, tot i així és important descriure'l amb detall.

Notes prèvies

Relatives a l'obtenció d'un resultat òptim:

Quan s'hagi de posar la solució d'agarosa a la safata, s'ha de tenir aquesta en una superfície totalment horitzontal, per tal de que el gel tingui el mateix gruix en tots els punts. També és important eliminar les bombolles d'aire amb l'ajut d'una punta estèril.

Reactius i solucions

- Agarosa. (BIO-RAD. Cat.161-3101).
- TAE 1x.

Materials i equipaments

- Microones.
- Safata, pinta de 8 pous d'1 mil·límetre de gruix, del sistema d'electroforesi.
- Material addicional: guants, un erlenmeyer de 250 ml, cinta adhesiva i micropipetes amb les puntes (estèrils) corresponents.

Mètode

- Pesar 0'45 mg d'agarosa, i col·locar-los dins un erlenmeyer de 250 ml.
- Afegir 30 ml de TAE 1x.
- Dissoldre l'agarosa escalfant al microones. Alternar fusió de l'agarosa amb agitació manual (fins que no es pugui apreciar cap partícula en suspensió).
- Deixar refredar parcialment l'agarosa.
- Tenir segellats els laterals oberts de la safata del gel amb cinta adhesiva, de manera que la safata quedi convertida en una cubeta.
- Col·locar la solució d'agarosa a l'interior de la cubeta.
- Col·locar immediatament la pinta.
- Treure les bombolles amb l'ajut d'una punta de pipeta.
- Deixar polimeritzar el gel.
- Un cop polimeritzat, retirar la cinta adhesiva i la pinta.

2.2.2 FLUORIMETRIA

Els primers DNAs de mostres parafinades es van quantificar per mitjà de la fluorimetria. Les mostres parafinades tenen l'inconvenient d'estar molt degradades, de manera que al corre un gel d'agarosa no s'obté una banda nítida sinó un *smear*, i això dificulta en gran manera la seva quantificació.

El fluorímetre consta d'una làmpada de xenó que provoca fluorescència, d'un selector de longituds d'ona i d'un detector. En aquesta ocasió l'agent que s'intercala en el DNA és la bisbencimida, present al reactiu Hoechst, i serà el que farà possible obtenir una lectura al fluorímetre, ja que aquesta molècula s'excita a 350 nm i emet a 450 nm. La sensibilitat és d'aproximadament 1 ng/ml, i el volum de mostra necessari és de 2'5- 5 µg.

Per a la interpretació dels resultats també va ser necessari la realització d'una recta patró, per tal de verificar la linealitat de l'experiment pel que fa al rang de concentracions.

Es va fer una primera aproximació de la concentració d'uns DNAs (de parafina) controls amb el fluorímetre; fins que els varem tenir en una concentració coneguda. En una segona etapa, es va seguir quantificant la resta de mostres parafinades per mitja de gels d'agarosa. De la mateixa manera que es feia amb els DNAs que procedien de teixit congelat, però en lloc de comparar bandes ben definides, es comparaven els *smears* dels nostres controls, quantificats per fluorimetria (Figura 12-B).

Notes prèvies

Relatives a la seguretat:

El reactiu Hoechst és un possible carcinogen i mutagen. És per aquest motiu que és necessari utilitzar guants i mascareta.

Relatives a l'obtenció d'un resultat òptim:

És important pipetejar de manera correcta i barrejar bé a l'hora de preparar les mostres, evitant la formació de bombolles ja que aquestes poden interferir en el resultat.

A. Reactius i materials

Reactius i solucions

- Solució *stock* de Hoechst (1 mg/ml):
 - 10 mg Hoechst 33258.
 - 9 ml d'aigua destil·lada.Guardar protegit de la llum a 4°C. La solució es conserva durant 6 mesos.
- 10x TNE
 - 12'1 gr. de Tris base 100 mM.
 - 3'7 gr. d' EDTA-Na₂ 10 mM.
 - 58'9 gr. de NaCl 1M.Afegir 800 ml d'aigua, i amb HCl concentrat ajustar el pH a 7'4. Afegir H₂O destil·lada fins obtenir 1 litre de tampó. Filtrar (0'45 µm) i guardar a 4°C un màxim de 3 mesos.
- Tampó A (per mesurar concentracions de 10 µg/ml - 400 µg/ml):
 - 5µl *Hoechst stock solution*.
 - 5ml TNE 10x.
 - 45 ml H₂O destil·lada filtrada.Preparar en fresc en el moment de la seva utilització.
- DNA estàndard 1000 ng/µl. (Sigma. Cat.D-5042).
- H₂O destil·lada.

Materials i equipaments

- Fluorímetre (Hoefer DyNA Quant 200 fluorometer).
- Cubetes de cuarç.
- Filtre de 0'45 µm.
- Material addicional: guants, eppendorf, micropipetes amb les puntes (estèrils) corresponents.

B. Mètode

Realització de la recta patró.

1. Eppendorf 1: posar 2 µl DNA estàndard.
2. Eppendorf 2: posar 20 µl de DNA estàndard + 180 µl H₂O destil·lada.
3. Eppendorf 3: posar 100 µl del eppendorf 1 + 100µl H₂O destil·lada.
4. Eppendorf 4: posar 100 µl del eppendorf 2 + 100µl H₂O destil·lada.
5. Eppendorf 5: posar 100 µl del eppendorf 3 + 100µl H₂O destil·lada.
6. Eppendorf 6: 100µl H₂O destil·lada.

Preparació de les mostres.

- Per cada mostra haurem de posar 2 µl de DNA + 2 ml de tampó A.

Lectura amb el fluorímetre.

1. Engregar el fluorímetre i esperar 30 minuts (per tal de que s'escalfi la bombeta).
2. Girar el botó SCALE en sentit contrari a les agulles del rellotge al màxim.
3. Fer 5 voltes al botó SCALE en el sentit de les agulles del rellotge.
4. Posar 2 ml de tampó A a la cubeta i posar-la al fluorímetre.
5. Per fer el blanc, moure el botó ZERO fins que surti "0" en el display ($\pm 0'003$ és acceptable).
6. Posar 2 µl del DNA estàndard + 2 ml de tampó A a la cubeta.
7. Barrejar amb la pipeta pasteur i mesurar.
8. Moure SCALE per tenir el valor que correspon (1000 ng/µl).
9. Netejar la cubeta, i assecar amb paper l'exterior de la mateixa.
10. Repetir dels passos 6 al 9 per cada punt de la recta patró.
11. Mesurar cada mostra. La seva concentració es podrà observar en el display en nanograms/microlitre.

2.3 HIBRIDACIÓ GENÒMICA COMPARADA (CGH)

Aquesta tècnica fou descrita per Kallionemi et al. (1992). La seva característica principal és que permet una visió global dels guanys i pèrdues presents en el genoma d'una determinada mostra, sense tenir la necessitat de disposar de cèl·lules en creixement. És una tècnica que es pot aplicar tant a mostres congelades com parafinades (fet que facilita la possibilitat de realitzar estudis retrospectius), fins i tot és possible fer una CGH a partir d'una única cèl·lula (de la qual s'ha fet una amplificació per mitjà d'una DOP-PCR o una PCR inespecífica). També és possible aplicar aquesta tècnica després de fer microdissecció d'un teixit.

Es basa en realitzar una hibridació competitiva entre dos DNAs (un control i una mostra problema), marcant cada un dels DNAs amb un fluorocrom d'un color diferent, vermell en el cas de la mostra i verd en el cas del control. Aquesta barreja de DNAs (junt amb un altre DNA bloquejador de l'heterocromatina, DNA Cot), s'hibriden sobre portes amb metafases normals, la qual cosa ens donarà un "suport" conegut per tal d'interpretar amb facilitat quines són les regions que es delectonen, es guanyen o s'amplifiquen.

Algunes de les seves limitacions són: que no detecta reorganitzacions equilibrades (aquestes alteracions no impliquen guany o pèrdua de material genètic), no detecta els nivells de ploïdia, presenta regions conflictives com són les regions heterocromàtiques; els tumors són heterogenis i per tant hi ha alteracions que només estaran presents en un nombre petit de cèl·lules, si aquestes alteracions no es troben en més d'un 50-70% de la mostra no les detectarem com a guanys o pèrdues; té límit de resolució de 3Mb en el cas de les amplificacions, encara que en el cas de les delectons és inferior 7-10Mb.

Notes prèvies

Relatives a l'obtenció d'un resultat òptim:

Com que aquest és un protocol llarg i conté molts passos, és necessari realitzar diverses puntualitzacions sobre diferents parts d'aquest mètode. Per tal de simplificar l'enteniment d'aquestes notes prèvies, s'anirà indicat davant de cada paràgraf i entre parèntesi el punt del mètode al que fa referència cada nota.

(1) Els reactius de la reacció de *Nick Translation* s'afegeixen sense seguir un ordre determinat, tot i que és aconsellable afegir al final tant els fluorocroms (per tenir-los el màxim de temps protegits de la llum) com l'enzim (per mantenir-lo el màxim de temps

al congelador). Quan s'afegeixen aquests reactius a la barreja, s'aprofita per homogeneïtzar la solució amb la mateixa punta de la pipeta.

(1) L'enzim necessari per la realització del marcatge per *Nick Translation* s'ha de mantenir sempre en fred. És per això que es mantindrà en el congelador fins al moment de fer-lo servir i després durant tota l'estona que estigui fora es guardarà en el bloc fred.

(5) La reacció de *Nick Translation* s'atura amb un xoc tèrmic, de manera que l'únic que es provoca és la desnaturalització de l'enzim. Així si a l'hora de corre el gel es detecta que hi ha hagut algun problema, que la mostra no s'hagi tallat suficient o que no s'hagi incorporat bé el fluorocrom, es pot afegir més enzim i tornar a aprofitar tant els reactius com els DNAs. Si s'aturés la reacció amb algun component químic i després es comprovés que la mostra no s'ha marcat de manera correcta, s'hauria de repetir tot el procés des del principi, agafant la mostra de nou.

(7) Després de fer el marcatge és important corre un gel d'agarosa, per comprovar que s'han obtingut fragments de DNA de la mida desitjada, és a dir; s'ha d'observar un *smear* de entre 300 i 3000 pb. També s'ha de comprovar que el fluorocrom s'ha incorporat correctament, és a dir; també s'ha d'observar un *smear* però mirant directament amb el transil·luminador, sense fer cap mena de tinció. Cal tenir en compte que quan es miren els fluorocroms s'observa també unes "taques" que corresponen al fluorocrom que no s'ha incorporat. En el cas del fluorocrom vermell, com que és d'una mida més gran que el fluorocrom verd i li costa més avançar per la matriu d'agarosa, es trobarà el fluorocrom sobrant més amunt que el fluorocrom sobrant de color verd.

Pel que fa al gel d'agarosa, es carrega en primer lloc un marcador (*ladder*) que serveix per veure que els fragments estan dins el rang que ens interessa, i després es carrega 8 µl de cada una de les reaccions de "*nick*" a les que afegirem 1 µl de *loading buffer* (que ens permetrà veure com avancen les mostres mentre corre el gel).

Si els fragments que obtenim després de la reacció de *Nick Translation* són massa petits això indica que s'ha de disminuir el temps de marcatge. Si després del marcatge els fragments són massa llargs, s'afegeix més enzim i es torna al punt 4 del mètode disminuint el temps.

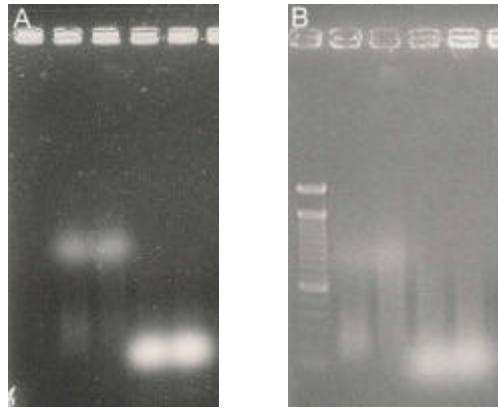


Figura 13: Comprovació de la reacció de *Nick Translation* mitjançant un gel d'agarosa: A. Comprovació de la incorporació del fluorocrom. B. Comprovació de la mida dels fragments de DNA. En el primer carril hi ha carregat un marcador de pes molecular, que serà el que ens indicarà si la mida dels fragments està en el rang que ens interessa.

(9) El paper del DNA Cot-1 és el de bloquejar seqüències altament repetitives, regions d'heterocromatina (centròmers, satèl·lits i constriccions heterocromàtiques), que al presentar un alt grau de polimorfisme dins la població, són excloses de l'anàlisi. D'aquesta manera s'eviten possibles falsos positius.

(10/11) Aquests punts s'han de fer de manera consecutiva per a cada tub; intentar deixar la gota d'acetat sòdic a la paret del tub i després arrossegar-la quan s'hi afegeix l'EtOH.

(17) Els portaobjectes que s'utilitzen venen preparats des d'una casa comercial (Vysis) i contenen gran quantitat de metafases analitzables. Per això al treure'ls del congelador es divideix el portaobjectes en dos parts, i així en un sol portaobjectes s'analitzen dos casos.

(18) Solució A s'ha de pipetejar molt lentament i esperar que pugui tot el volum a la punta, és dens i això dificulta el seu pipeteig.

(25) Quan es posa el cobreobjectes, amb l'ajut d'unes puntes de pipeta s'ha d'intentar treure el màxim nombre de bombolles d'aire.

(26) Quan es segella, s'ha de vigilar que no quedi cap regió sense cobrir, ja que sinó la sonda podria dil·luir-se amb part de l'aigua de la cambra humida on es posarà el porta perquè es realitzi la hibridació.

(27) La cambra humida, es construeix amb una caixa de les que s'utilitzen habitualment per guardar portes, coberta amb paper d'alumini per tal de protegir de la llum l'interior, i dins s'hi posa un parell de mocadors de paper els quals es mullen amb aigua.

(29/30) Amb aquests rentats es pretén eliminar tant la hibridació inespecífica com la sonda que no s'ha incorporat.

Quan es realitzen aquests rentats, s'han d'agitar els portes mentre estan dins les cubetes per tal d'eliminar les cadenes de DNA que no han hibridat correctament.

És aconsellable realitzar tots els passos els quals tinguin fluorocrom en cambra fosca.

Possibles punts de parada del protocol: punt 6 i 10.

A. Reactius i materials

Reactius i solucions

- *Kit de CGH*: (Vysis. Cat.53232-801300)

Preparació de dTTP:

10 µl 0.3mM dTTP.

20 µl *Nuclease-free water*.

Proporció 1:2

Preparació de dNTP MIX:

10 µl 0.3mM dATP.

10 µl 0.3mM dCTP.

10 µl 0.3mM dGTP.

Proporció 1:1:1

- *Spectrum Green (FITC)*: (Vysis. Cat.53230-803200)

10 µl 1mM dUTP.

40 µl *Nuclease-free water*.

Proporció 1:4

- *Spectrum Red (Texas-Red)*: (Vysis. Cat.53230-803400)

10 µl 1mM dUTP.

90 µl *Nuclease-free water*.

Proporció 1:8

- DNA Cot-1 humà (bloqueja l'heterocromatina) , així s'evita que el DNA pugui hibridar inespecíficament amb zones d'heterocromatina que no ens resulten informatives (Vysis. Cat.53232-800028).
- Agarosa.
- Marcador de tipus *ladder* 100 pb (GibcoBRL. Cat.15628-019).
- *Loading buffer*.
- Acetat sòdic 3M.
- Etanol 70%.

- Etanol 90%.
- Etanol 100%.
- Portaobjectes de CGH. (Vysis. Cat.53230-806010).
- Solució A o *buffer* d'hibridació:
 - 50% Formamida desionitzada.
 - 50% Màster Mix.
- Formamida desionitzada: Hi ha dos opcions:
 1. Formamida desionitzada (Sigma. Cat. F-9037).
 2. Desionitzar nosaltres la formamida: 100 ml de formamida + 10 gr. resina (BIO Rad. Cat. AG501X8), agitar durant una hora (inicialment té un color verd però va virant a vermell). Després filtrar amb paper Whatman 3M (finalment queda transparent. S'ha de guardar protegida de la llum).
- Màster Mix: 20% dextrà sulfat:
 - 2 gr. dextrà sulfat.
 - 1 ml 20xSSC.
 - 9 ml H₂O miliQ.
- Solució desnaturalitzant: Formamida 70%:
 - 49 ml formamida.
 - 7 ml 20xSSC (pH 5.3).
 - 14 ml H₂O miliQ.Ajustar el pH 7-7.5 (tirant-hi una gota de HCl 35% o HCl fumant).
- Cola Paniker.
- 0'4X SSC/0.3% NP-40:
 - 20 ml 20xSSC.
 - 950 ml H₂O.
 - 3 ml NP-40.Ajustar el pH a 7-7.5. Ajustar a un volum final 1L.
- 2xSSC/0.1% NP-40:
 - 100 ml 20xSSC.
 - 850 ml H₂O.
 - 1 ml NP-40.Ajustar el pH a 7-7.5. Ajustar a un volum final 1L.
- 20xSSC, 3'0M Na Citrat.

- DAPI. Hi ha dos opcions:
 - 1.Utilitzar Dapi III (Vysis Cat.:32-804932).
 - 2.Preparar-lo a partir d'una concentració de DAPI de 2'5 µg/ml (la concentració inicial és de 1 mg/ml, i d'aquí fer una dilució 1/10, després fer una dilució 1/40 amb H₂O miliQ). L'antifade (CULTEK. Cat.:H-1000). De manera que la barreja final està a 125 ng/ml resultat de: 50 µl DAPI de concentració 2'5 µg/ml + 50 µl H₂O miliQ + 900 ml antifade.S'ha de conservar a 4°C i protegit de la llum.

Materials i equipaments

- Bloc fred.
- Bany a 15°C.
- Bany a 70 °C.
- Bany a 74 °C.
- Transil·luminador UV o equivalent que emeti a una longitud d'ona de 310nm, amb pantalla protectora o màscara protectora.
- Cubeta electroforesi.
- Centrifuga. (Eppendorf: centrifuge 5415 C).
- Estufa a 37°C.
- Microscopi de fluorescència:
 - Microscopi Olympus AX70.
 - Microscopi Olympus BX60.
- Filtres:
 - Filtre de fluorescència pel color vermell: U-MWIY.
 - Filtre de fluorescència pel color verd: U-MNIBA.
 - Filtre de fluorescència pel DAPI: U-MNU.
 - Filtre de fluorescència pel triple: P/F/Pi 510.
- Càmera, per poder fer la captura.
- Sistema computeritzat d'anàlisi d'imatges amb software de CGH.
 - Sistema d'anàlisi Cytovision (Applied Imaging).
 - Sistema d'anàlisi Power Macintosh G3 amb software Quips[®] per Smartcapture (Quips Karyotyping/CGH.Digital Scientific Cambridge, UK. Vysis, NY).
- Material addicional: guants, eppendorf, mocadors de paper, micropipetes amb les puntes (estèrils) corresponents, pinces, cubetes.

B. Mètode

Aquesta és una tècnica llarga, i com s'ha vist anteriorment hi ha moltes puntualitzacions a fer, per tal que resulti més fàcil el seu seguiment, al llarg del protocol hi haurà un símbol (NP) en tots aquells punts del mètode que tinguin algun aclariment a l'apartat de notes prèvies.

B.1. Reacció de Nick Translation.

1. (NP) Preparar barreja per la reacció de *Nick Translation* (el volum total en l'ependorf ha de ser de 50 µl).
 - 5 µl 0.1mM dTTP.
 - 5 µl 10X Nick Translation Buffer.
 - 10 µl 0.1mM dNTP MIX.
 - (22'5 - x) µl *Nuclease-free water*.
 - x µl DNA (x = 700-900ng / Conc.DNA mostra en ng/µl)
 - 2'5 µl *Spectrum Green o Red dUTP*.
 - 5 µl de *Nick Translation Enzyme*.
2. Agitar manualment.
3. Spin.
4. Deixar la reacció de la *Nick* 1 hora 15 minuts al bany entre 15 i 18°C.
5. (NP) Parar la reacció posant els tubs 10 minuts a 70°C.
6. Deixar els tubs en gel, mínim 15 minuts.
7. (NP) Corre gel d'agarosa: 8 µl de cada tub + 1 µl *Loading Buffer*.

B.2. Precipitació de les sondes.

8. Barrejar el DNA control i el DNA tumoral en un únic eppendorf.
9. (NP) Afegir 5-10 µl de DNA Cot-1 humà (10ng).
10. (NP) Afegir 0'1 volums d'acetat sòdic 3M pH 5'5.
11. Afegir 2'5 volums d'etanol fred 100%.
12. Barrejar per inversió.
13. Precipitar el DNA en gel o al congelador un mínim de 15 minuts.
14. Centrifugar 30 minuts a 12000 r.p.m.
15. Decantar el sobrenadant i amb l'ajuda d'un mocador de paper eixugar l'EtOH que hagi pogut quedar per les parets del tub mirant de no tocar el pellet.
16. Deixar el tub obert dins una estufa a 37°C durant 8 minuts per evaporar la mica l'alcohol que pugui quedar.
17. (NP) Treure el portaobjectes del congelador, i marcar-lo per la part posterior amb un llapis de diamant per tal de dividir-lo en dues parts.

18. (NP) Treure el tub de l'estufa, resuspendre el pellet amb 12 µl de solució A o *Buffer* d'hibridació.
19. Spin (deixar els tubs a RT a la cambra fosca).

B.3. Desnaturalització- Hibridació.

20. Desnaturalitzar el porta 5 minuts amb formamida 70% a 74°C
21. Deshidratació dels portaobjectes:
 - 1 minut en etanol 70% fred.
 - 1 minut en etanol 90% fred.
 - 1 minut en etanol 100% fred.
22. Assecar el porta a l'aire o bé amb l'ajut d'una font d'aire, ex: ventilador.
23. Desnaturalitzar les sondes 8 minuts a 74°C.
24. Pipetejar la sonda i posar-la sobre el portaobjectes.
25. (NP) Cobrir (cada cas) amb un cobreobjectes (22x22 mm).
26. (NP) Segellar tot el voltant del cobreobjectes amb cola.
27. (NP) Deixar hibridar en una cambra fosca i humida de 36-72 hores a l'estufa a 37°C.

B.4. Rentats post-hibridació.

28. Treure el cobreobjectes i la cola amb l'ajut d'unes pinces.
29. (NP) Fer el primer rentat durant 2 minuts amb una solució de 0'4X SSC a 74°C.
30. Fer el segon rentat durant 2 minuts amb una solució de 2X SSC a RT.
31. Deixar assecar el portaobjectes a l'aire.

B.5. Contratació.

32. Afegir 12 µl de solució DAPI.
33. Col·locar el cobreobjectes.
34. Guardar els portaobjectes a la nevera protegits de la llum fins a procedir al seu anàlisi.

B.6. Captura de metafases i anàlisi dels resultats.

S'han analitzat entre 10-15 metafases per cas. Les metafases òptimes són aquelles que tenen els cromosomes ben estesos, amb pocs solapaments i no massa curts, i que presenten una hibridació uniforme i sense granularitat.

Cada metafase es captura de manera seqüencial, primer amb DAPI (que és la contratació que ens permetrà veure i cariotipar les metafases que anem capturant, ja que ens dona un patró molt similar al de bandes G), posteriorment es captura el fluorocrom verd i per finalitzar el fluorocrom vermell. Les imatges s'analitzen amb l'ajut d'un *software* que és específic per CGH.

El sistema d'anàlisi treballa amb la imatge original i de forma automàtica fa diferents modificacions, com reduir el soroll de fons, integrar la intensitat de cadascun dels fluorocroms al llarg dels cromosomes, etc. de manera que finalment obtenim una ràtio de fluorescència (entre ambdós colors) al llarg de cada un dels cromosomes. Les regions equilibrades s'observaran d'un color grogós i presentaran una ràtio amb valors propers a 1, mentre que les regions que presentin guanys, presentaran un color vermell i una ràtio superior a 1'25 (si supera 1'5 parlarem d'amplificació). Finalment les regions que presentin pèrdues s'observaran de color verd i amb una ràtio inferior a 0'75.

El *software*, combina finalment els resultats de totes les metafases analitzades, i determina un perfil promig per cada un dels cromosomes.

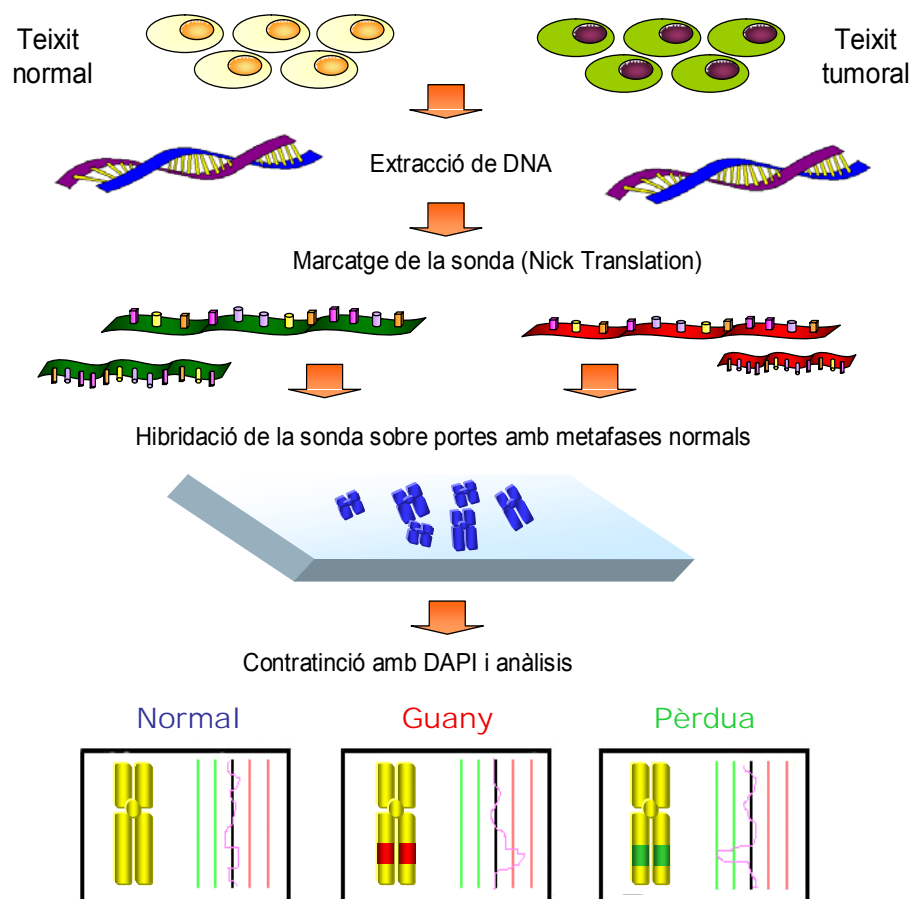


Figura 14: Esquema del mètode de CGH.

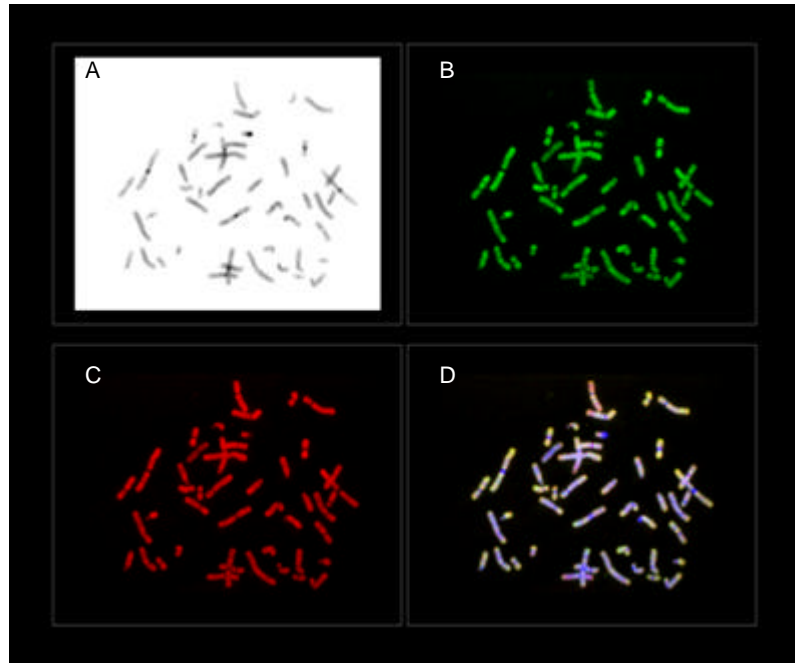


Figura 15: Imatges que s'observen al microscopi com a resultat del mètode de CGH. A: bandes reverses de DAPI, B: fluorocrom verd, C: fluorocrom vermell, D: filtre triple (visió simultània del verd, el vermell i el Dapi).

2.4 HIBRIDACIÓ *IN SITU* FLUORESCENT (FISH)

La hibridació *in situ* fluorescent, va ser descrita per Pinkel et al. l'any 1988.

L'aplicació d'aquesta metodologia ha permès fer grans avenços en diferents camps de la recerca, tals com la citogenètica, el diagnòstic prenatal, la biologia de tumors etc.

La tècnica d'hibridació *in situ* amb marcatge fluorescent permet la identificació específica de seqüències úniques, subregions cromosòmiques i genomes sencers tant en cèl·lules interfàsiques com en cèl·lules metafàsiques.

En el cas de hibridacions sobre metafases és important valorar la qualitat de les preparacions, s'han de tenir cromosomes llargs, ben estesos, i sense restes de citoplasma; aquesta valoració es realitza amb un microscopi de contrast de fases.

2.4.1 SONDES LOCUS ESPECÍFIQUES I SONDES CENTROMÈRIQUES

Les sondes locus específiques són sondes de seqüència única, és a dir específiques per un locus concret. Es coneixen amb el nom de sondes LSI (de l'anglès: *Locus Specific Identifier*).

Les sondes centromèriques són aquelles que identifiquen els centròmers dels cromosomes. Tot i que els centròmers de la majoria de cromosomes tenen una seqüència pràcticament idèntica aquesta varia entre un 2-3% i això fa possible la identificació individual de quasi la totalitat de centròmers, a excepció dels del 13 i 21 i del 14 i 22. Són conegudes amb el nom de sondes CEP (de l'anglès: *Chromosome Enumeration Probe*).

Les hibridacions amb sondes locus específiques i centromèriques que s'han portat a terme durant la realització d'aquest treball han estat sobre teixits parafinats, i per tant les hibridacions es realitzaven sobre nuclis i no sobre metafases.

Els talls de teixit es varen obtenir dels serveis d'anatomia patològica de l'Hospital de Mar i de la Fundació Puigvert. Per poder fer una correcta valoració es necessita que els talls tinguin un gruix de 4-5 micres.

El que s'ha valorat ha estat el gen de la Ciclina D1 (sonda LSI) i de manera simultània, s'ha mirat també el centròmer del cromosoma 11 (sonda CEP) (que és el senyal que ha servit de referència alhora de valorar el guany, pèrdua o amplificació, d'aquest gen).

Els criteris per a la valoració d'aquesta sonda han estat:

- Guany: més de dos senyals.

- Amplificació: tres vegades més senyal que senyals de centròmer, en un mínim del 5% de les cèl·lules.
- Pèrdues: nombre de senyals gèniques inferior al de centròmers, com a mínim en un 50% de les cèl·lules.

Notes prèvies

Relatives a la seguretat:

Evitar la inhalació del Xilè. Treballar sota campana extractora de gasos.

Relatives a l'obtenció d'un resultat òptim:

Per realitzar aquesta tècnica és necessari que els portes sobre els que es fixa el tall de parafina estiguin carregats positivament, ja que els portaobjectes es sotmetran a elevades temperatures, i si no el tall es podria desenganxar, i perdre la mostra.

Possibles punts de parada del mètode, deixant els portaobjectes a la nevera: 6, 19 i 24.

Puntualitzacions sobre diferents parts d'aquest mètode, indicat davant de cada paràgraf i entre parèntesis al punt del mètode al que fa referència cada nota:

- (1) Una altra possibilitat per aquest primer pas és deixar el porta tota la nit a una estufa de 60°C.
- (7) Aquest pas es realitza per tal d'eliminar la matriu extracel·lular.
- (11) Aquest pas serveix per eliminar precipitats de sals i proteïnes.
- (18) Per ajudar a eliminar l'excés de 2xSSC amb més rapidesa de la part superior, podem pressionar lleugerament amb paper de filtre.
- (19/20) Entre aquests dos punts podem fer un tractament addicional, en el cas de que s'observi que el porta no està del tot net:
 - Posar 20 minuts de RNAsa a 37°C en una cambra humida.
 - Realitzar 2 rentats de 2xSSC de 5 minuts cada un.
 - Posar el porta 5 minuts amb pepsina a 37°C.
 - Realitzar un rentat de 5 minuts amb PBS 1x.
- (24) Amb l'ajut d'unes puntes de pipeta s'eliminaran les bombolles que s'hagin pogut formar.

A. Reactius i materials

Reactius i solucions

- Xilè.
- Etanol.
- HCl 0.2N.
- Aigua destil·lada.
- 2xSSC:
 - 100 ml de 20xSSC.
 - 850 ml d'H₂O destil·lada.Ajustar el pH a 7-7'5, i ajustar el volum final a 1 litre.
- Solució de pretractament: tiocianat sòdic:
 - 81 gr. de tiocianat sòdic 1M.
 - 1 litre de 2xSSC.
- Proteïna K:
 - Agafar una alíquota de 0'5 ml de la solució *stock* de proteïna K.
 - 100 ml de tampó 10 mM Tris pH 8'01 mM EDTA.Llençar el que queda després de fer-la servir.
- Tampó 10mM Tris , pH 8'01 mM EDTA:
 - 500 mg Tris.
 - 350 mg Na₂EDTA.Ajustar el volum a 1 litre d'aigua. És estable durant 6 mesos a temperatura ambient.
- Solució *stock* de proteïna K: Dissoldre 10mg/ml en tampó 10mM Tris pH 8.0 1mM EDTA.
 - És preferible fer alíquotes de 0'5 ml i guardar-les a -20°C.
- Formaldehid:
 - 57'6 ml H₂O destil·lada.
 - 3'5 ml MgCl₂ 1M.
 - 7 ml 10xPBS.
 - 1'89 ml formaldehid 37%.Preparar sota campana, preferiblement el mateix dia de la seva utilització.
- Solució de MgCl₂ 1M.
- Sonda: LSI[®]Cyclin D1 SpectrumOrange[™]; CEP[®] 11 SpectrumGreen[™] DNA Probe (Vysis. Cat.32-191039).

- Pepsina:
 - 50 ml HCl 10mM.
 - 5 µl de pepsina 100 mg/ml.
- 0.4X SSC/0.3% NP-40.
- 2xSSC/0.3% NP-40.
- DAPI.

Materials i equipaments

- Estufa a 100°C.
- Campana extractora de gasos.
- Placa calefactora.
- Cola Paniker.
- Hybrite (VYSIS).
- Microscopi de fluorescència:
 - Microscopi Olympus AX70.
 - Microscopi Olympus BX60.
- Filtres:
 - Filtre de fluorescència pel color vermell: U-MWIY.
 - Filtre de fluorescència pel color verd: U-MNIBA.
 - Filtre de fluorescència pel DAPI: U-MNU.
 - Filtre de fluorescència pel triple: P/F/Pi 510.
- Material addicional: guants, pinces, pipetes, cobreobjectes i paper de filtre.

B. Mètode

B.1. Desparafinització del teixit

1. Posar el porta a un estufa a 100°C durant 20 minuts (fins que la parafina plori).
2. Deixar refredar a temperatura ambient.
3. Fer tres rentats amb xilè, de 10 minuts cada un a RT.
4. Deshidratar el porta durant 5 minuts amb etanol 100%.
5. Repetir el pas 4.
6. Deixar secar el porta a l'aire (5-10 minuts).

B.2. Pretractament.

7. Posar els portes en HCl 0.2N durant 20 minuts, a RT.
8. Fer un rentat amb aigua destil·lada de 3 minuts, a RT.
9. Posar el porta en 2xSSC durant 3 minuts, a RT.

10. Repetir els passos 8 i 9.
11. Incubar els portes durant 30 minuts amb la solució de pretractament, a 80°C.
12. Rentat d'1 minut amb aigua destil·lada.
13. Fer un rentat de 5 minuts amb 2xSSC.
14. Eixugar les vores del porta i la part inferior.

B.3. Digestió

15. Incubar 12 minuts amb proteïnasa K a 37°C.
16. Fer un rentat de 5 minuts amb 2xSSC.
17. Eixugar les vores del porta i la part inferior.
18. Secar a la placa a 45-50°C, no més de 2 minuts.
19. Observar el resultat de la digestió, al microscopi.
20. Posar el porta 10 minuts amb solució de formaldehid tamponada.
21. Fer dos rentats de 5 minuts amb 2xSSC.
22. Eixugar les vores del porta i la part inferior.
23. Secar a la placa a 45-50°C, no més de 2 minuts.

B.4. Hibridació amb Hybrite

24. Preparar la barreja de sonda 1/7 o 2/8 i aplicar sobre la zona d'interès, posar a sobre el cubreobjectes.
25. Segellar amb cola, per tal d'evitar que la sonda s'evapori.
26. Posar el porta en el Hybrite, assegurant-nos que la càmera humida estigui en bones condicions; i programar el Hybrite: 5 minuts a 78°C i després ON a 37°C.

B.5. Rentats post hibridació

27. Treure el cobreobjectes i la cola amb l'ajut d'unes pinces.
28. Fer el primer rentat durant 2 minuts amb una solució de 0.4xSSC/0.3% NP-40 a 74°C.
29. Fer el segon rentat durant 2 minuts amb una solució de 2xSSC/0.3% NP-40 a RT.
30. Deixar assecar el porta a l'aire.

B.6. Contratació.

31. Afegir 12 µl de solució DAPI.
32. Col·locar el cobreobjectes.
33. Guardar els portes a la nevera protegits de la llum fins a procedir al seu anàlisi.

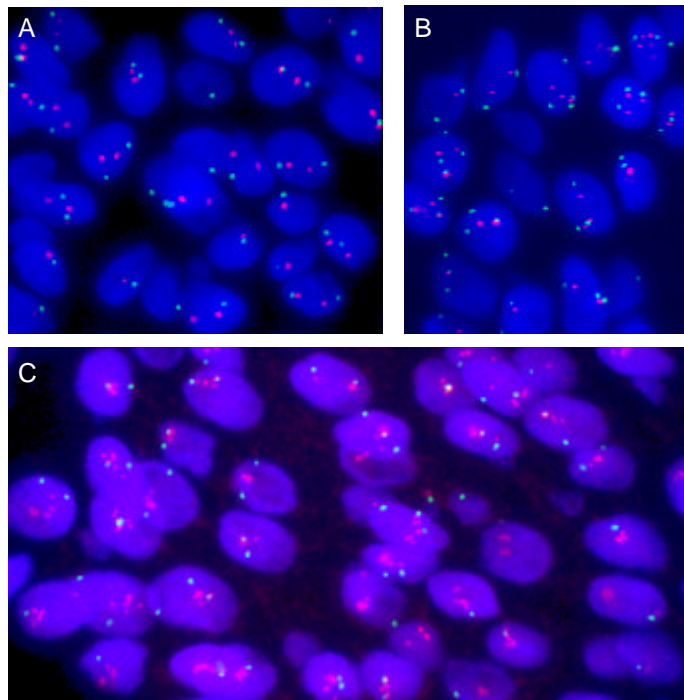


Figura 16: Imatges de diferents tumors estudiats amb la sonda locus específica del gen de la Cyclina D1 (en vermell) i del centròmer del cromosoma 11 (en verd). A: Dosi gènica normal, s'observen dos senyals locus específiques i dos senyals centromèriques. B: Guany del gen de la Cyclina D1. Hi ha un increment del nombre de senyals del gen de la Cyclina D1 respecte a la referència del centròmer. C: Amplificació del gen de la Cyclina D1.

2.5 COMBINACIÓ DE LA TINCIÓ AMB BLAU DE TOLUÏDINA I FISH

Hem dissenyat un nou protocol que combina tècniques d'histoquímica amb tècniques de FISH. La gran avantatge d'aquest mètode és que permet fer una tinció amb blau de toluïdina, la qual el permetrà al patòleg identificar quina part de la mostra correspon a tumor i quina no. A més amb la mateixa secció i després d'eliminar el colorant podrem procedir a fer una hibridació *in situ* fluorescent.

La metodologia estàndard que s'utilitza habitualment consisteix en que el patòleg identifica les cèl·lules tumorals en un tall de parafina per mitja d'una tinció que acostuma a ser d'hematoxilina-eosina, i en talls posteriors (a ser possible consecutius) es realitzen les hibridacions, això fa que limitis la regió d'interès a valorar per similitud morfològica, fet que fa que es pugin cometre alguns errors.

Els talls de teixit es van obtenir dels serveis d'anatomia patològica de l'Hospital de Mar i de la Fundació Puigvert. Per poder fer una correcta valoració és necessari que els talls tinguin un gruix de 3 micres.

El procediment previ que es realitza és el de desparafinització, pretractament i digestió del teixit, és a dir es segueixen els passos descrits a l'apartat de mètode de la tècnica 2.4.1 (Sondes locus específiques i sondes centromèriques), des del punt 1 fins el 18, encara que en el pas 15 s'ha de tenir present que serà variable pel que fa al temps en funció del teixit que s'analitzi.

Notes prèvies

Relatives al mètode:

És important que el blau de toluïdina cobreixi completament el tall de la mostra, per tal que el patòleg pugui valorar la totalitat de la mateixa.

A. Reactius i materials

Reactius i solucions

- Blau de toluïdina O. (1gr), àcid acètic glacial (1 ml), alcohol 96° (20 ml), aigua destil·lada (100ml).
- Aigua destil·lada.
- Etanol al 70%.

- Etanol al 85%.
- Etanol al 100%.
- RNAsa (10mg/ml) (Sigma).
- 2xSSC.

Materials i equipaments

- Estufa a 37°C.
- Llapis de diamant.
- Placa calefactora.
- Material addicional: guants, rotulador per vidre, micropipetes amb les puntes corresponents.

B. Mètode

1. Posar unes gotes de blau de toluïdina, sobre la mostra a estudiar.
2. Posar un cubreobjectes, sobre la solució de tinció.
3. El patòleg marcarà les zones que siguin tumorals amb un rotulador per vidre sobre el cubreobjectes.
4. Fer la rèplica de les regions que ens ha marcat el patòleg, en el revers del porta, amb un llapis de diamant.
5. Posar el portaobjectes dins un copplin amb aigua destil·lada, i agitar per tal de que es desprengui el cubreobjectes.
6. Passar el porta a un copplin amb aigua destil·lada.
7. Repetir els rentats amb aigua destil·lada un mínim de tres o quatre vegades al llarg de entre 10-12 hores.
8. Posar el portaobjectes 10 minuts amb etanol 70%.
9. Posar el portaobjectes 10 minuts amb etanol 85%.
10. Posar el portaobjectes 1 hora amb etanol 100%.
11. Deixar assecar a l'aire.
12. Posar durant 20 minuts, 200 µl de RNAsa a 37 °C.
13. Fer dos rentats amb 2xSSC de 5 minuts.
14. Deixar assecar els portes a un placa calefactora.
15. Posar la hibridació.

2.6 TÈCNiques DE CULTIU CEL·LULAR I BANDEIG CROMOSÒMIC

2.6.1 CULTIU CEL·LULAR

S'entenen per cultiu cel·lular el conjunt de tècniques que permeten el manteniment de les cèl·lules *in vitro*, preservant al màxim les seves propietats fisiològiques, bioquímiques i genètiques.

Quan el cultiu prové de cèl·lules que han estat disgregades d'un teixit original provinent d'un òrgan, rep el nom de cultiu primari. Quan aquest cultiu primari és sotmès a processos de transformació que li confereixen una capacitat il·limitada de multiplicació, rep el nom de línia cel·lular.

Tant els estudis de citogenètica convencional per mitja del bandeig dels cromosomes, com algunes de les tècniques d'hibridació *in situ* fluorescent (FISH) requereixen d'un treball previ al laboratori com són els cultius cel·lulars. Els cultius cel·lulars són per tant una eina bàsica quan es té l'objectiu d'obtenir cèl·lules en divisió.

Durant la divisió cel·lular, i concretament durant la metafase mitòtica, és possible visualitzar els cromosomes humans, ja que és el moment en el que els cromosomes presenten el màxim grau de compactació i individualització, fet que facilita la seva identificació.

2.6.1.1 CULTIU DE TUMORS PRIMARIS

Els cultius primaris tenen característiques especials que els diferencien de les línies cel·lulars; conserven la morfologia de les cèl·lules de l'òrgan del que van ser aïllats, i el seu creixement *in vitro* és limitat.

Els cultius cel·lulars originats a partir de cèl·lules tumorals poden multiplicar-se infinitament i fins i tot donar lloc a línies cel·lulars de creixement continu. Això es degut a que aquests són teixits amb un elevat índex de divisió mitòtica.

Els tumors dels quals es va realitzar cultiu cel·lular van ser obtinguts prèviament a que al pacient se li realitzés qualsevol tipus de tractament. Aquest punt és important ja que hi ha alguns tractaments que podrien introduir certa variabilitat i modificar els resultats.

Notes prèvies

Relatives al mètode:

Quan es porten a terme cultius cel·lulars és important, que tots els passos es realitzin en condicions d'esterilitat, per tal d'impedir que es produeixin contaminacions que podrien afectar la viabilitat del cultiu, o bé introduir variants que emmascararien els resultats obtinguts amb els experiments realitzats a partir d'aquests.

A. Reactius i materials

Reactius i solucions

- Medi DMEM complementat amb:
 - Sèrum boví fetal al 10% (v/v)
 - - Antibiòtics:
 - Penicil·lina-Estreptomicina (100 U/ml-100 µg/ml).
 - Gentamicina (0'02 mg/ml).
 - - Insulina bovina (0'05 µg/ml).
 - - Transferrina (0'05 µg/ml).
 - - Glutatió (0'1 µg/ml).
- Colcemid 0'02 µg/ml.
- KCl 0'075M.
- Carnoy:
 - Metanol (Merck Cat.1.06009).
 - Àcid Acètic (Merck Cat.1.00063).Proporció 3 de metanol:1 d'àcid acètic.
- Tripsina (DYFCO Cat.1-250).
- Medi Hanks (sense Ca ni Mg).

Materials i equipaments

- Flascons de 25 cm³.
- Càpsules de Petri.
- Incubador de CO₂.
- Campana de flux laminar vertical.
- Microscopi d'inversió (per observar el creixement cel·lular).

- Bany a 37°C.
- Material addicional: guants, pipetes i tisores.

B. Mètode

1. Es fan dos rentats de la mostra en càpsula de Petri amb medi DMEM i antibiòtics.
Es descarten restes de sang o de greix de la mostra.
2. Disgregació mecànica de la mostra per mitjà de tisores.
3. Centrifugar i resuspendre el pellet en medi DMEM complementat.
4. Sembrar en un flascó.
5. Quan el creixement cel·lular és suficient, és a dir que s'observen bastantes cèl·lules en divisió (refringents), s'afegeix colcemid.
6. Incubar amb CO₂, durant 5 hores a 37°C.
7. Tripsinitzar.
8. Resuspendre el pellet en solució hipotònica (KCl 0'075M).
9. Incubar durant 30 minuts a 37°C.
10. Fixar amb Carnoy.

2.6.2 BANDEIG CROMOSÒMIC: BANDES G

La tècnica de bandeig cromosòmic que s'utilitza més habitualment alhora de fer l'estudi del cariotip és la de bandes G. Es coneix per bandes G un patró de bandes fosques i clares que apareixen al llarg dels cromosomes i que és característic i específic de cada parell de cromosomes homòlegs, i que per tant ens serveix per identificar-los.

Les bandes G fosques corresponen a heterocromatina facultativa de replicació tardana i són riques en A-T.

Hi ha dos protocols per realitzar les bandes G: bandeig GTG, en aquest protocol els cromosomes són tractats enzimàticament amb tripsina i tenyits amb colorant Giemsa o Leishman; i bandeig amb colorant Wright. En aquest estudi només s'ha utilitzat aquest segon tipus.

Notes prèvies

Relatives al mètode:

Els temps no són fixes, ni estan estandaritzats, ja que depèn del tipus de mostra i de les condicions del laboratori.

Un pas previ a la realització de les bandes G, és l'envelliment de les preparacions. Es pot fer de dos maneres:

- 24-48 hores a temperatura ambient.
- 8-10 hores en una estufa a 37°C.

Relatives a l'obtenció d'un resultat òptim:

En cas de que un cop acabat el protocol no s'observin les bandes de manera adequada, es pot tornar a tenyir 1 o 2 minuts més amb solució Wright, i repetir els punts 2 i 3.

A. Reactius i materials

Reactius i solucions

- 2xSSC:
 - 8'8 gr. Citrat tri-sodi dihidrat.
 - 17'5 gr. NaCl.
 - En 1 litre d'aigua destil·lada.
- Colorant Wright
 - Colorant Wright: 0'25 % (p/v) de colorant es dissol en metanol i s'agita durant 45 minuts, es filtra i s'envelleix a RT una setmana o tres dies a 37°C.
- Tampó Sörensen:
 - KH_2PO_4 , 9'08 gr./l.
 - Na_2HPO_4 , 12'88 gr./l.
 - Proporció 1:1. Ajustar el pH a 6'8.
- Solució Wright: colorant Wright i tampó Sörensen. Proporció 1:3.

Materials i equipaments

- Cubetes Coplin.
- Bany a 65°C.
- Microscopi.
- Oli d'immersió.
- Paper de filtre.

B. Mètode

1. Introduir les preparacions en 2xSSC a 65°C, durant 3-6 minuts.
2. Rentar a raig d'aixeta, fent que l'aigua llisqui des de l'extrem del porta (no deixar caure l'aigua directament sobre el material).
3. Assecar a l'aire o amb paper de filtre (sense fregar).
4. Cobrir la preparació amb colorant Wright , durant 2-3 minuts.
5. Repetir els punts 2 i 3.
6. Observar al microscopi.

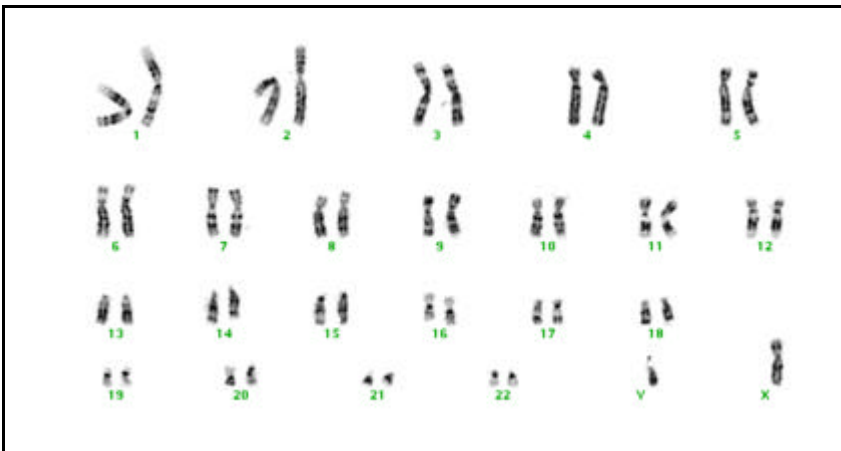


Figura 17: Imatge de cariotip amb bandes G.

2.7 NOMENCLATURA

Per descriure els cariotips s'ha utilitzat la nomenclatura ISCN (*International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature*, 1995).

Per a la classificació dels tumors urotelials s'ha utilitzat el sistema WHO (*World Health Organization*) i el sistema TNM (*Classification of Malignant Tumors*, 6th Edition (2002)).

Per a la classificació dels tumors de colon s'ha utilitzat la classificació de Dukes.

RESULTATS

Treball- 1

Detection of chromosomal imbalances in papillary bladder tumors by comparative genomic hybridization.

Prat E, Bernués M, Caballín MR, Egozcue J, Gelabert A, Miró R.

Urology 2001 May;57(5):986-92.

PMID: 11337313

Index by Thomson-ISI Journal Citation Reports

ISI 2004 Impact Factor: 2.585

DETECTION OF CHROMOSOMAL IMBALANCES IN PAPILLARY BLADDER TUMORS BY COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION

ESTHER PRAT, MARTA BERNUÉS, M. ROSA CABALLÍN, JOSEP EGOZCUE, ANTONI GELABERT, AND ROSA MIRÓ

ABSTRACT

Objectives. To identify those genetic alterations that are associated with bladder cancer invasion and progression.

Methods. A total of 30 specimens of transitional cell carcinoma of the bladder were analyzed by comparative genomic hybridization. The results were compared and summarized with previously reported studies.

Results. The most frequent chromosome changes detected in our series of tumors were losses in 9q, 9p, 8p, and 11p and gains in 8q, 1q, 20q, and 11q. Three regions of deletion on chromosome 9 were delineated, at 9p21-p22, 9q13-q22, and 9q31-q34. Gains in 1q and losses on 11p were significantly more frequent in pT1G2 tumors than in superficial (pTa) ones. In our study, the most striking differences were seen between pT1G3 and pT1G2 tumors. Gains on 10p and 6p and losses at 5q, 6q, and 18q were significantly more frequent in the former.

Conclusions. A summary of our results and those available from published reports suggest that several groups of chromosomal imbalances may be associated with specific steps along bladder cancer progression. These genetic changes assume two different patterns: those that are shared, but are more intensive in one stage than in the other, and those such as a gain on 3p that are unique to invasive tumors. *UROLOGY* **57**: 986-992, 2001. © 2001, Elsevier Science Inc.

Transitional cell carcinoma of the bladder (TCC) is the most common form of urinary bladder cancer and includes a heterogeneous group of malignancies with different neoplastic features. About 70% to 80% of bladder cancers present as papillary superficial (pTa) or minimally invasive (pT1) tumors and are interpreted as being in the early stages of the process.

Approximately 60% of superficial TCCs recur, but most never progress to muscle-invasive cancer, and thus their associated mortality is low. However, 20% to 25% of superficial TCCs become myo-

invasive with time, with a significant risk of morbidity and mortality. Although histopathologic parameters such as tumor stage and grade are used for the prognosis of the clinical behavior of the tumor, they cannot predict which superficial tumors will recur and become invasive.

A comprehensive picture of chromosomal imbalances, including a number of previously unknown genomic alterations, such as high-level amplifications, has been reported in TCC of the bladder using comparative genomic hybridization (CGH).^{1,2}

More recently, several studies have attempted to generate a pattern of chromosomal imbalances during defined stages of bladder carcinogenesis.³⁻⁷ Although some discrepancies exist, these studies show that the deletion of chromosome arm 9q is the earliest genetic alteration in pTa tumors. In carcinomas at the pT1 stage, losses on 2q and 11p and gains on 1q and 8q are the most commonly detected. Other chromosome regions with frequent gains include 3p, 3q, 5p, 6p, and 10q³; losses on 10q, 11q, and 17p are also frequent in pT1 tumors.⁴

This study was supported by grant SAF 96/177, grant FIS 00/0735, and grant CIRIT (SGR95-0478). Esther Prat was a fellow supported by the Institut Municipal d' Investigacions Mèdiques.

From the Departament de Biologia, Fisiologia i Immunologia and Institut de Biologia Fonamental, Universitat Autònoma de Barcelona; and Servei d'Urologia, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

Reprint requests: Esther Prat, Laboratori de Citogenètica, Institut de Biologia Fonamental, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

Submitted: May 22, 2000, accepted (with revisions): December 20, 2000

According to Richter *et al.*,⁵ deletions on 5q, 6q, and 15q and gains on 5p, 7p, and Xq are found in significant numbers in high-stage tumors (pT2-T4); however, according to Bruch *et al.*,⁶ gains on 5p and 20q are most frequent in these tumors. These studies show that during bladder tumor progression, dynamic chromosomal changes occur; nevertheless, more research is needed to gain deeper insight into the genetic alterations associated with tumor invasion and progression.

In the present study, we analyzed 30 bladder tumors and summarized our results and those of recent studies,³⁻⁷ in which CGH has been used to screen for chromosomal copy changes in progressive stages of bladder tumors.

MATERIAL AND METHODS

PATIENTS AND SAMPLES

Tumor specimens from 30 patients (22 men and 8 women) were included in this study. A total of 9 cases were classified as pTa (1 G1 and 8 G2). Fifteen were pT1 (11 G2 and 4 G3), and six were pT2-T4G3. None of the patients with primary tumors had received prior radiotherapy or chemotherapy.

Tumor samples were obtained at surgery (cystectomy or transurethral resection). The specimens were frozen immediately after surgical removal and stored at -80°C until analysis. Portions of each tumor specimen were examined by a pathologist to confirm the presence of tumor, to evaluate tissue morphology, and stage. All specimens were graded according to the World Health Organization classification⁸ and staged according to the TNM system.⁹

DNA EXTRACTION

High molecular weight DNA was extracted from tumor and leukocyte samples according to a method described previously,¹⁰ with minor modifications. In brief, frozen tumor tissues were powdered in chilled liquid nitrogen and homogenized in 100 mM NaCl, 10 mM Tris HCl, 25 mM ethylenediaminetetraacetic acid, and 0.5% sodium dodecyl sulfate, pH 8.

Leukocytes were isolated after discarding blood plasma and lysed erythrocytes. DNA was extracted, both from tumor tissues and blood cells, with phenol/chloroform/isoamyl alcohol after proteinase K digestion.

CGH ANALYSIS

CGH analysis was performed according to the method described by Beà *et al.*¹¹

Normal and tumor DNA were labeled with Spectrum Red-dUTP and Spectrum Green-dUTP by nick translation using a commercial kit (Vysis, Downers Grove, Ill). Subsequently, equal amounts of normal and tumor-labeled probes (500 ng) and 10 μg of Cot-1 DNA were co-precipitated using ethanol. The precipitated DNA was dissolved in 12 μL of hybridization buffer and denatured at 74°C for 8 minutes. Normal metaphase spreads (Vysis) were denatured for 5 minutes at 74°C and hybridized with the DNA mixture in a moist chamber for 2 to 3 days. The slides were washed according to the protocol supplied by the manufacturer. Chromosomes were counterstained with 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI), resulting in a G-band-like pattern that was used for chromosome identification.

The slides were analyzed using a Cytovision Ultra workstation (Applied Imaging, Sunderland, United Kingdom). The fluorescent hybridization signals and DAPI staining patterns

were captured. The software performed a calculation of the tumor DNA/normal DNA fluorescent ratios along the length of each chromosome. Ratio values obtained from at least 10 metaphase spreads were averaged, and the resulting profiles were plotted next to the chromosomal ideograms. Ratio values greater than 1.25 and less than 0.75 were considered to represent chromosomal gains and losses, respectively. A high-level DNA amplification was considered when the fluorescence ratio values exceeded 1.5 and, in addition, a distinct band-like hybridization signal of the tumor DNA was seen. Negative control experiments were performed using differentially labeled male versus male DNA and female versus female DNA. In addition, control experiments in which the Spectrum Red-dUTP and Spectrum Green-dUTP labels were interchanged between normal and tumor were also performed.

STATISTICAL ANALYSIS

Statistical comparisons between the frequency of alterations and tumor stage and grade were performed by Student's *t* test. To define the chromosomal aberrations associated with tumor stage, pTa and pT1G2; pT1G2 and pT1G3; and pT1G3 and pT2-T4 were reciprocally compared.

RESULTS

The CGH findings of all 30 tumors examined in this study are shown in Figure 1.

Three samples from Stage pTa, two from Stage pT1, and one from Stage pT2-T4 tumors did not reveal any chromosomal imbalances. The loss of the entire chromosome 9 and the loss of the Y chromosome were detected as the sole abnormalities in two pTa tumors. The loss of chromosome arm 8p accompanying a gain of 8q was observed in 6 cases and probably represents an isochromosome 8q. Isochromosome 17q was detected in one pTa tumor.

On average, 5.6 alterations were found per tumor: 3.5 gains (range 0 to 11), 3.1 losses (range 0 to 9), and 0.23 amplifications (range 0 to 3).

Overall, deletions were most prevalent on chromosomes 9 (46%), 8p (33%), 11p (20%), 5q (16%), 11q (13%), 18q (13%), 2q (10%), 6q (10%), and 17p (10%). A gain of chromosomal material was commonly seen at 8q (40%), 1q (36%), 20q13 (23%), 3p (16%), 17q (13%), 10p (13%), and 11q13 (13%). High-level amplifications were detected at 1p11p13, 5p11p13, 6p22pter, 7q32qter, 16p12pter, and 20p13pter in 1 case each. Amplification at 11q13 was seen in three pT1 tumors, all of them with a deletion of the entire chromosome except for the amplified bands.

CGH analysis allowed the delineation of minimal common regions overrepresented or underrepresented on each of the chromosomes most frequently involved. Fourteen cases showed losses on chromosome 9, and three consensus regions could be delineated as 9p11-p22, 9q11-q22, and 9q31-q34. For chromosomes 2 and 17, consensus areas of overlap at 2q35-qter and 17p13, respectively, could be identified. On chromosome 5, two consensus regions were delineated on 5q12-q13 and

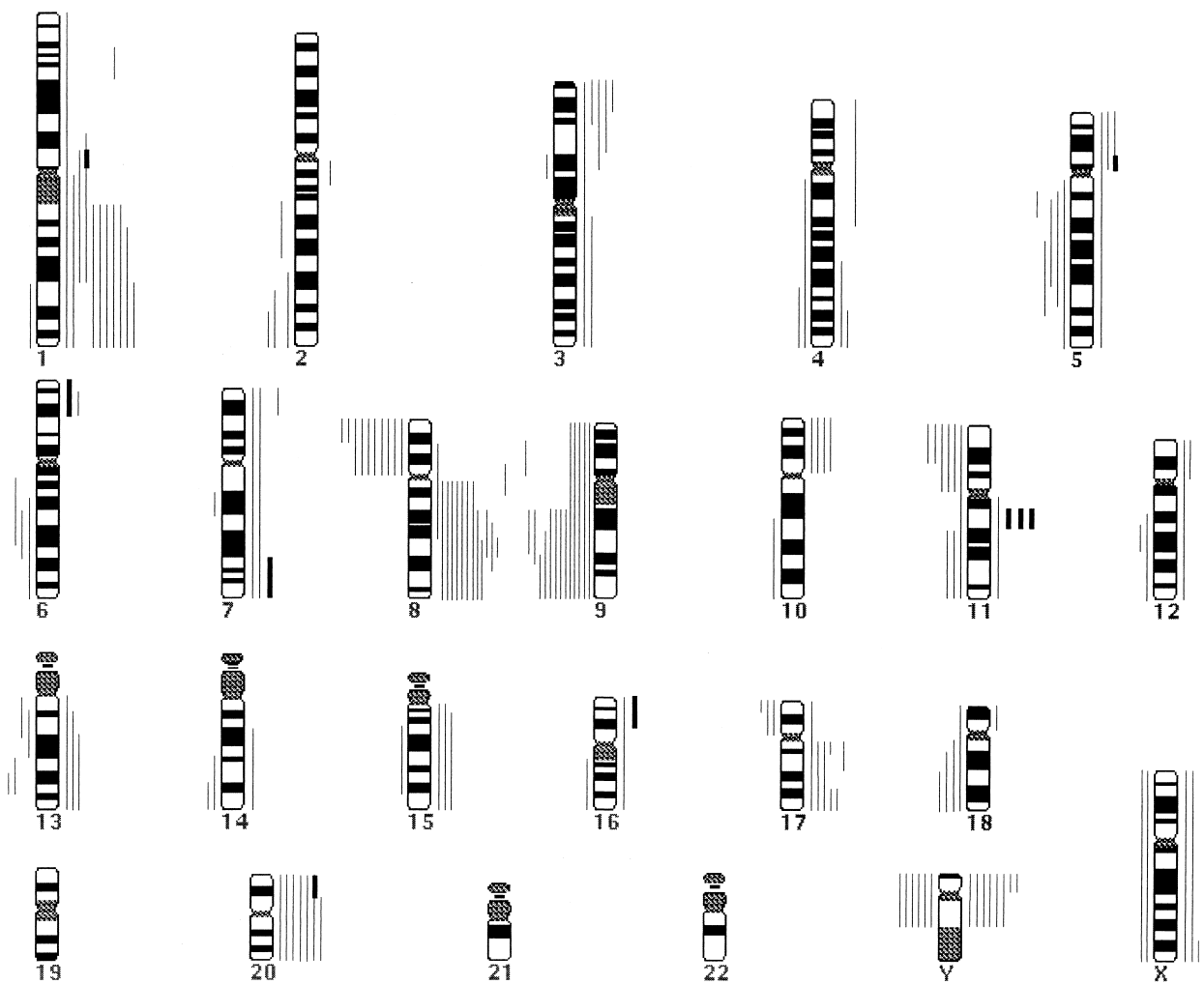


FIGURE 1. Summary of all relative DNA sequence copy number changes detected by CGH in 30 specimens of TCC of the bladder. Vertical lines on the right of the chromosome ideograms indicate gains of the corresponding chromosomal regions; those on the left indicate losses. Solid bars indicate amplifications. Chromosomes 1p, 19, 21, and 22 were not analyzed.

5q21-q32. The most commonly overrepresented region on chromosome 1q was mapped to bands 1q21-q31.

Interestingly, minimal regions of gains and losses detected in a pT3G3 tumor with metastases at the time of diagnosis contributed to delineate consensus regions of gains on 8q22, 3p24-pter, 17q11-q12, 17q24-qter, and 6p22-p23 and losses on 8p22-pter. Furthermore, losses on 11p14-pter, 18q21-qter and 6q21-q23 could be delineated in a pT1G3 tumor with metastases at the time of diagnosis.

In Table I, the most frequent imbalances are tabulated separately for pTa, pT1G2, pT1G3, and pT2-T4 tumors. Gains on chromosome 1q and losses on 11p were significantly more frequent in pT1G2 tumors than in pTa tumors ($P = 9.75 \times 10^{-3}$ and 0.0446, respectively). In our study, the most striking differences were seen between

pT1G3 and pT1G2 tumors. Gains on 10p and 6p and losses at 5q, 6q, and 18q were significantly more frequent in the former ($P = 0.043$, 0.043, 0.0399, 0.043, and 0.0399, respectively). These frequencies were maintained in pT2-T4 tumors; in these tumors, a significant decrease in the frequency of 11q gains and 11p losses in relation to pT1G3 tumors was also observed ($P = 0.026$ and 0.026, respectively).

An increase in genomic instability was observed when tumors progressed; thus, pTa tumors had a comparatively low number of abnormalities (mean 2.1, range 0 to 7), including deletions (mean 1, range 0 to 4) and gains (mean 1.11, range 0 to 4); and no amplifications were detected. The average number of chromosomal imbalances in pT1 tumors was 6.6 (range 0 to 15), including deletions (mean 3.2, range 0 to 8), gains (mean 3.13, range 0 to 7), and amplifications (mean 0.3, range 0 to 2).

TABLE I. Frequent chromosomal changes in pTa, pT1G2, pT1G3, and pT2-T4 TCCs of the bladder

	pTa (%)	pT1G2 (%)	pT1G3 (%)	pT2-pT4 (%)
Loss				
2q(q35-qter)		2/11 (18)		1/6 (16)
5q		1/11 (9)	2/4 (50)	2/6 (33)
6q(q21-q22)			1/4 (25)	2/6 (33)
8p(p22-pter)	2/9 (22)	4/11 (36)	2/4 (50)	2/6 (33)
9p(p11-p22)	2/9 (22)	3/11 (27)	1/4 (25)	
9q	3/9 (33)	5/11 (45)	4/4 (100)	1/6 (16)
11p(p14-pter)		3/11 (27)	2/4 (50)	
11q(q14-qter)		2/11 (18)	1/4 (25)	
13q		2/11 (18)		1/6 (16)
17p(p13)	1/9 (11)	2/11 (18)		
18q(q21-qter)		1/11 (9)	2/4 (50)	1/6 (16)
Gain				
1q(q21-q31)		5/11 (45)	1/4 (25)	3/6 (50)
3p(p24-pter)		1/11 (9)	1/4 (25)	3/6 (50)
4q(q32-qter)	1/9 (11)	1/11 (9)		
5p(p11-p13)		1/11 (9)		2/6 (33)
6p(p22-p23)			1/4 (25)	1/6 (16)
7p(p21-pter)	1/9 (11)			2/6 (33)
7q(q32-qter)	1/9 (11)	1/11 (9)		1/6 (16)
8q(q22)	2/9 (22)	5/11 (45)	2/4 (50)	3/6 (50)
10p			1/4 (25)	3/6 (50)
11q(q13)		2/11 (18)	2/4 (50)	
17q	1/9 (11)	2/11 (18)	2/4 (50)	2/6 (33)
20q	1/9 (11)	3/11 (27)	2/4 (50)	2/6 (33)
Xq(q27-qter)		1/11 (9)		2/6 (33)

KEY: TCC = transitional cell carcinoma.

Data in parentheses in first column equal smallest regions of overlap.

Carcinomas at Stages pT2-T4 showed, on average, 8.3 chromosomal imbalances (range 0 to 20), including deletions (mean 3, range 0 to 9), gains (mean 5, range 0 to 12), and amplifications (mean 0.83, range 0 to 3).

In more advanced stages, gains predominated over deletions. The gains/losses ratio in pT2-T4 tumors was 32:18, and in pTa and pT1 tumors it was 10:9 and 51:48, respectively.

CGH data from 18 of the 30 tumors were also compared with the loss of heterozygosity at 17p, as revealed by a restriction fragment length polymorphism analysis reported in a previous study.¹² In nine of the informative cases, no loss at 17p13 was detected by restriction fragment length polymorphism analysis or by CGH. Of the 8 cases with loss of heterozygosity, only three also showed a loss by CGH.

COMMENT

Most of the common genetic changes detected in our study have been previously reported in bladder cancer. The most frequent chromosome changes, detected in more than 20% of our series of tumors, corresponded to losses in 9q, 9p, 8p, and 11p and gains in 8q, 1q, and 20q.

Gains on chromosomal regions 1q, 3q, and 8q and losses of 8p, 13q, 16q, and 17p are common to a number of tumor types, such as breast, ovarian, prostate, renal, and bladder; only the loss of 9q is more specific to bladder cancer.¹³ Moreover, chromosomes 8q and 1q appear as the most frequently gained in a review of CGH results from 27 different solid tumor types¹⁴; in the same study, the most common losses were at 13q, 9p, and 8p. The presence of the same anomalies in different tumor types suggests that many solid malignancies, irrespective of histologic origin and differentiation, develop through the same genetic pathways, and might reflect the unique selection forces that are operational during cancer development in different organs.¹³

It would be interesting to delineate further the critical segments within these chromosome arms frequently involved in gains and losses and to investigate whether different bands are affected in different tumor types. Moreover, it is known that several candidate tumor suppressor gene loci can be distinguished within the same chromosome arm.

CGH analysis allows the delineation of minimal common regions that are underrepresented or

overrepresented on each chromosome. Our results on chromosome 9 indicate three regions of deletion: 9p11-p22, 9q13-q22, and 9q31-q34. Recently, it has been suggested that, in addition to the MTS locus (9p21), chromosome 9 harbors at least five different candidate regions for tumor suppressor genes involved in human urothelial neoplasia; these loci were identified within 9p22-p23 and 9p11-p13 on the p arm and within 9q12-q13, 9q21-q22, and 9q34 on the q arm.¹⁵

A gain or loss of entire chromosomes or chromosome arms was frequent in pTa tumors; however, in more advanced carcinomas the tendency to gain or lose shorter DNA fragments was increased. According to Ried *et al.*,¹⁶ the gain or loss of whole chromosomes or chromosomal arms can occur without a pronounced compromise of genetic stability, and this maintenance of cellular control during the early stages of carcinogenesis would allow the cells to acquire whole chromosome or chromosome arm aberrations more easily than regional copy number changes. In this sense, it is interesting to note that an important number of minimal consensus regions in our study could be delineated in a pT3G3 tumor with metastases at the time of diagnosis. An increased genetic instability in this advanced tumor could account for the high number of partial gains and losses observed.

Amplification of the 11q13 chromosome region is relatively frequent in bladder cancer. In our study, this amplification was detected in 3 cases, and, in all of them, loss of the entire chromosome except for the amplified region was observed (Fig. 1). Amplification of 11q13 accompanied by deletions of distal 11q or loss of the rest of the chromosome have also been reported in a study of head and neck carcinomas using fluorescent in situ hybridization (FISH) and conventional cytogenetics; furthermore FISH results indicated that breakpoints were in close proximity to the amplified regions.¹⁷ Altogether, these results may indicate a mechanistic link between genomic amplifications and deletions. Moreover, it is interesting to note that the 11q13 region is flanked by two fragile sites: FRA 11A at 11q13.3 and FRA 11F at 11q14.2.

In 6 of the 30 tumors, no affected chromosomes were found by CGH, indicating that genetic aberrations, if any, might have been beyond the detection limit of the CGH method.

Our comparison between CGH and restriction fragment length polymorphism analysis of 17p losses revealed that in 5 of the 8 cases in which loss of heterozygosity at 17p13 was found, no loss could be detected by CGH. The discrepancy between loss of heterozygosity and CGH results can be explained by the small size of the deletion, beyond the limits of resolution of CGH, or by the

occurrence of uniparental disomy of this region, which does not give rise to a copy number change.²

To detect genetic changes associated with bladder cancer progression, we compared the CGH findings at different stages and grades (Table I). Our results agree with those reported in previous studies.³⁻⁷

Although the number of tumors analyzed was relatively small, the differences were statistically significant among tumors of different stages and grades. Gains in 1q and losses on 11p were significantly more frequent in pT1G2 carcinomas than in superficial (pTa) tumors, suggesting that these chromosome regions can harbor genes involved in bladder cancer invasion. A role for the loss of 11p has been proposed in the transition from superficial to invasive TCC in pathway models for bladder cancer progression.¹⁸ Analysis of bladder tumors by double-target FISH¹⁸ indicated an association between the loss of chromosome 11p and the ploidy status of the tumor. According to Voorter *et al.*,¹⁸ underrepresentation of chromosome 11p occurs during tetraploidization or aneuploidization in TCC of the bladder, and loss of sequences in 11p is an important step in the development of these tumors.

In comparison with pT1G2 tumors, pT1G3 tumors revealed a remarkably higher frequency of gains at 10p and 6p and of losses in 5q, 6q, and 18q. The frequency of these abnormalities was maintained in pT2-pT4 tumors. Simon *et al.*⁴ reported that in addition to gains on 8q and 11q13, a high number of amplifications differentiate pT1G3 tumors from pT1G2 tumors. The activation of potential oncogenes or the loss of putative tumor suppressor genes at these chromosome locations may therefore account for the higher risk of progression of pT1G3 tumors.

In a recent report,⁷ it was found that pTaG3 tumors showed significant differences for 5p+, 20q+, 2q-, 5q-, 6q-, 8p-, 10q-, and 18q- alterations when compared with pTaG1/G2 tumors. According to these investigators, a malfunction of genes at these loci may contribute to the development of high-grade urothelial neoplasia. Interestingly 5q-, 6q-, and 18q- were also detected in our study when comparing pT1G3 and pT1G2 tumors.

A prognostic relevance of CGH abnormalities has been suggested in several types of neoplasias.^{11,16} In our study, neither the total number of abnormalities nor specific chromosome changes were related to an increased risk of tumor recurrence. However, it is interesting to note that in our series of tumors, a gain at chromosome 6p22-p23 was detected in the only two tumors with metastasis at diagnosis.

To gain information about genetic changes asso-

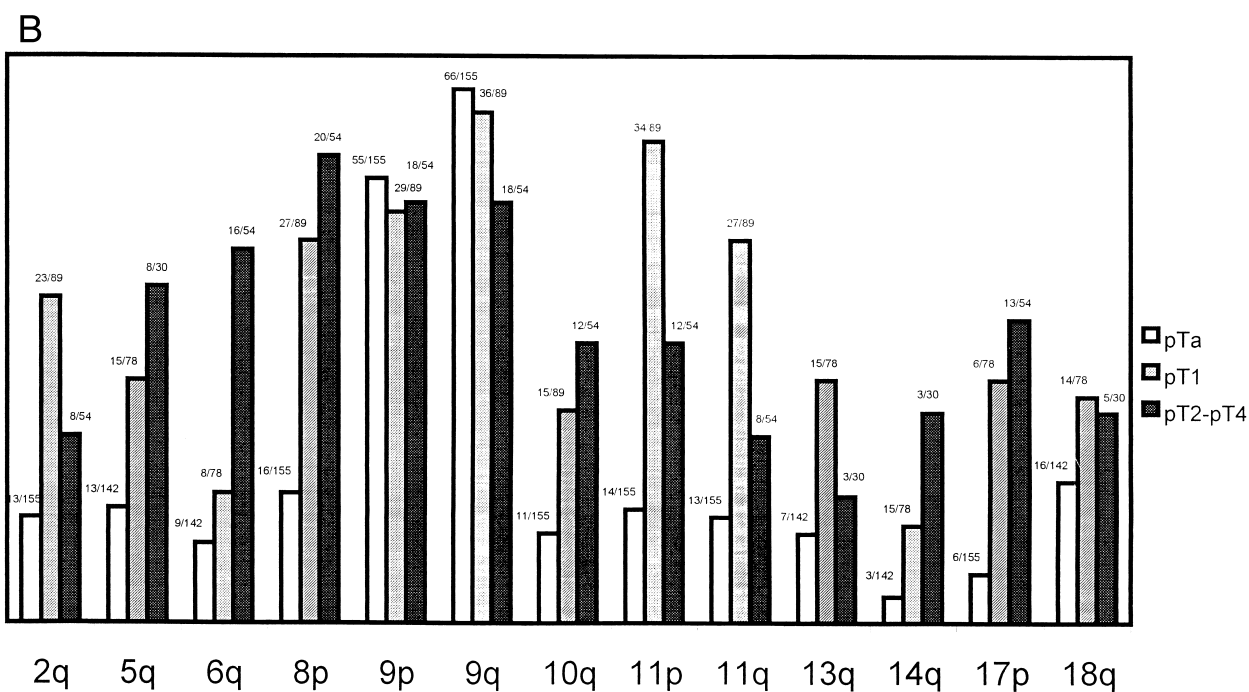
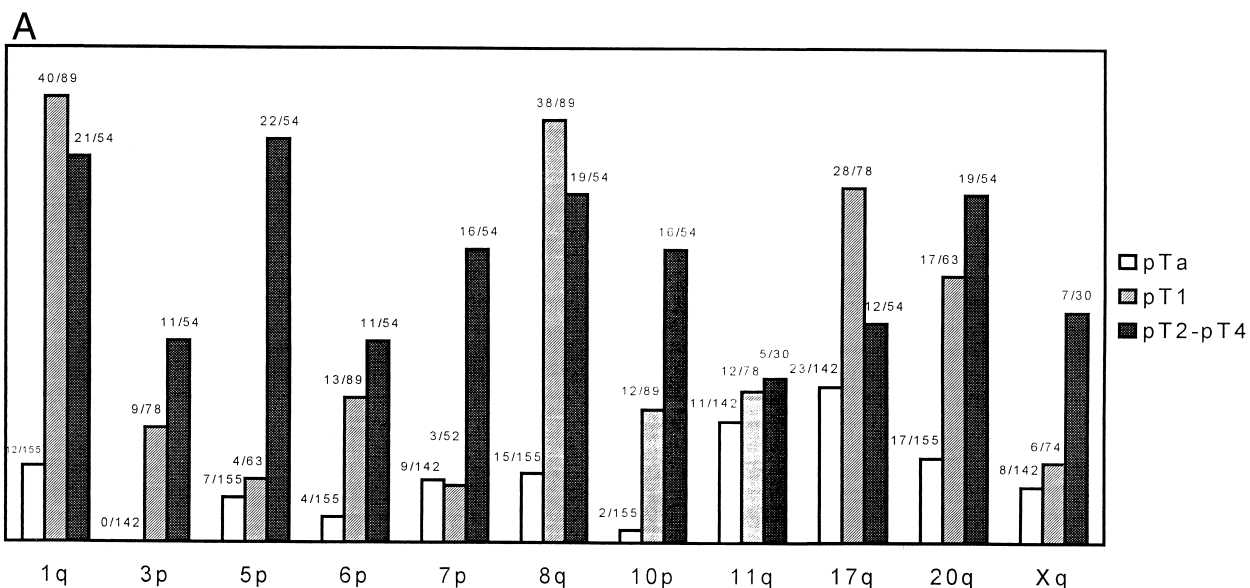


FIGURE 2. Summary of the main chromosome imbalances ([A] gains and [B] losses) related to stage of TCC of the bladder detected by CGH. Data include results from the present study and from Richter et al.,^{3,5} Simon et al.,⁴ Bruch et al.,⁶ and Zhao et al.⁷ Bladder tumors with a solid growth pattern were not included. All chromosome regions in this figure, except for 11q, 9p, 9q, and 18q, revealed statistically significant differences between the different stages.

ciated with invasion, our results were added to recent studies in which CGH was used to screen chromosomal copy number changes in progressive stages of bladder cancer.³⁻⁷ The data account for

274 TCCs of the bladder. Statistical analyses were restricted to compare bladder tumors with a papillary growth pattern, and only chromosome regions in which the number or frequency was specifically

indicated by the investigators were taken into account. Losses of the Y chromosome were not included.

A schematic representation of the results is shown in Figure 2. Except for losses on 9p, 9q, and 18q and gains on 11q, all the chromosome regions depicted in Figure 2 showed statistically significant differences among the stages ($P < 0.05$).

These summarized results indicate the following:

1. Losses on 9p and 9q and the loss of the Y chromosome are frequent in bladder tumors of all grades and stages, and probably occur early in tumor development.

2. Genetic alterations that are significantly more frequent in pT1 than in pTa tumors include gains on 1q, 3p, 6p, 8q, 10p, 17q, and 20q and losses on 2q, 5q, 8p, 10q, 11p, 11q, 13q, 14q, and 17p. Most of these cytogenetic abnormalities can be found with comparable frequencies in the more deeply invasive carcinomas.

3. Several alterations were significantly more frequent in pT2-T4 than in pT1 carcinomas, including deletion on 6q and gains on 5p, 7p, 10p, and Xq. Only 11p and 11q losses decreased significantly in the more advanced carcinomas.

A gain on 3p was not detected in any of the pTa tumors reviewed. This genetic alteration could characterize a subtype of aggressive bladder carcinomas that do not arise through progression of pTa tumors.

CONCLUSIONS

Taken together, these data suggest that several groups of chromosomal imbalances may be associated with specific steps in the process of bladder cancer progression. These genetic changes assume two different patterns: those that are shared, but are more intensive in one stage than in the other (eg, minimally invasive versus superficial stages), and those that are unique to invasive tumors. Taking into account their possible importance in the biologic behavior and clinical outcome of these tumors, additional delineation of these chromosome imbalances detected by CGH are needed for future high-resolution genetic localization studies.

REFERENCES

1. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Citro G, *et al*: Identification of gains and losses of DNA sequences in primary bladder cancer by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 12: 213–219, 1995.
2. Voorter C, Joos S, Bringuier PP, *et al*: Detection of chromosomal imbalances in transitional cell carcinoma of the bladder by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 146: 1341–1354, 1995.
3. Richter J, Jiang F, Görög J, *et al*: Marked genetic differences between pTa and pT1 papillary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 57: 2860–2864, 1997.
4. Simon R, Büreger H, Brinkschmidt C, *et al*: Chromosomal aberrations associated with invasion in papillary superficial bladder cancer. *J Pathol* 185: 345–351, 1998.
5. Richter J, Beffa L, Wagner U, *et al*: Patterns of chromosomes imbalances in advanced urinary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 153: 1615–1621, 1998.
6. Bruch J, Wöhr G, Hautmann R, *et al*: Chromosomal changes during progression of transitional cell carcinoma of the bladder and delineation of the amplified interval on chromosome arm 8q. *Genes Chromosomes Cancer* 23: 167–174, 1998.
7. Zhao J, Richter J, Wagner U, *et al*: Chromosomal imbalances in noninvasive papillary bladder neoplasm (pTa). *Cancer Res* 59: 4658–4661, 1999.
8. World Health Organization: Histological typing of urinary bladder tumors, in *International Classification of Tumors*, No. 10. Geneva, World Health Organization, 1973.
9. Union International Contre le Cancer: *TNM Classification of Malignant Tumors*. Geneva, Union International Contre le Cancer, 1978.
10. Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
11. Beà S, Ribas M, Hernández JM, *et al*: Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. *Blood* 23: 4365–4374, 1999.
12. Bernués M, Casadevall C, Caballín MR, *et al*: Study of allelic losses on 3p, 6q, and 17p in human urothelial cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 112: 42–45, 1999.
13. Forozan F, Karhu R, Kononen J, *et al*: Genome screening by comparative genomic hybridization. *Trends Genet* 13: 405–409, 1997.
14. Rooney PH, Murray GI, Stevenson DAJ, *et al*: Comparative genomic hybridization and chromosomal instability in solid tumors. *Br J Cancer* 80: 862–873, 1999.
15. Czerniak B, Chaturvedi V, Li L, *et al*: Superimposed histologic and genetic mapping of chromosome 9 in progression of human urinary bladder neoplasia: implications for a genetic model of multistep urothelial carcinogenesis and early detection of urinary bladder cancer. *Oncogene* 18: 1185–1196, 1999.
16. Ried T, Heselmeyer-Haddad K, Blegen H, *et al*: Genomic changes defining the genesis, progression, and malignancy potential in solid human tumors: a phenotype/genotype correlation. *Genes Chromosomes Cancer* 25: 195–204, 1999.
17. Jin M, Höglund M, Jin C, *et al*: FISH characterization of head and neck carcinomas reveals that amplification of band 11q13 is associated with deletion of distal 11q. *Genes Chromosomes Cancer* 22: 312–320, 1998.
18. Voorter C, Ummelen M, Ramaekers F, *et al*: Loss of chromosome 11 and 11p/q imbalances in bladder cancer detected by fluorescence in situ hybridization. *Int J Cancer* 65: 301–307, 1996.

Treball- 2

Combination of toluidine blue staining and in situ hybridization to evaluate paraffin tissue sections.

Prat E, Camps J, del Rey J, Egozcue J, Miró R, Gelabert A, Algaba F.

Cancer Genetics and Cytogenetics 2004 Nov;155(1):89-91

PMID: 15527910

Index by Thomson-ISI Journal Citation Reports

ISI 2004 Impact Factor: 1.577

Letter to the editor

Combination of toluidine blue staining and in situ hybridization to evaluate paraffin tissue sections

One of the major problems in the study of tumors by interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) is the cellular heterogeneity of the tumor. FISH on paraffin-embedded tumor tissue sections allows us to analyze copy number changes [1,2] as well as chromosome structural aberrations of the tumor cells using interphase nuclei [3]. So far, such intercellular heterogeneity has been routinely detected with hematoxylin and eosin (H&E) staining. Pathologists are used to identify malignant regions of a tissue section by means of homogenous staining methods. However, these staining methods do not supply any information about the status of the candidate genes involved in cancer development. Thus, geneticists usually use one section of the series to perform FISH analysis [4].

Good quality hybridizations are obtained after removing the toluidine blue dye. We compared the status of cyclin D1 (*CCND1*) gene in two transitional cell carcinomas (TCC) of the bladder previously analyzed by comparative genomic hybridization (CGH). One of the tumors showed normal cells in the section, whereas the other showed an increased copy number of the *CCND1* gene (Fig. 1); moreover, we found good correlation among these results and data shown by CGH. In the study of solid tumors it is important to accurately classify the tumor stages by means of morphological characteristics, but, in addition, genetic information could help to determine the stage of some tumors. The usefulness of this new approach could be of interest for pathologists and geneticists, because one can analyze simultaneously both forms of information. Finally, we also recommend this approach to analyze tissue microarrays [5,6].

In the present study, we report the orthochromatic staining of nuclei by toluidine blue dye, which stains cells in the same way as H&E, subsequently followed by FISH analysis on the same slide. The toluidine blue staining allows the pathologist to identify malignant cells by their morphology and to define scoring areas. FISH analysis was performed using a locus specific probe for the *CCND1* gene located at 11q13 and the α -satellite DNA probe for chromosome 11.

Paraffin-embedded tissue sections of 3 μ m from a TCC were used to develop this technical approach. Slides were placed in the oven for 20 minutes at 100°C. After reaching room temperature, the paraffin was dissolved with three 10-minute changes of xylene in three different Coplin jars at room

temperature. Slides were dehydrated with absolute ethanol twice for 5 minutes and then air-dried. Prior to enzymatic digestion with proteinase K, slides were placed in a Coplin jar with HCl 2N for 20 minutes at room temperature. Afterwards, 3 washes with dH₂O and 3 with 2 \times SSC were performed twice. Slides were treated with a preheated solution of sodium thiocyanate 1M (Sigma, St Louis, MO) at 80°C for 30 minutes or more, depending on the amount of fixative. After washing once more with dH₂O and 2 \times SSC, 200 mL of proteinase K (10 mg/mL) (Sigma) were applied over the slide for 12–15 minutes at 37°C. Slides were placed on a heater plate at 40–45°C until they were totally dried.

Once the paraffin was removed from the tissue section, conventional staining procedures were followed. The staining solution, consisting of toluidine blue O (1g), glacial acetic acid (1 mL), alcohol 96° (20 mL), and distilled water (100 mL), was dropped onto the slide and a coverslip was placed above. Immediately, and without letting the staining solution dry, a pathologist can look for regions of interest using a conventional microscope (Olympus BX-50; Olympus Corp, Tokyo, Japan) and mark them on the slide. After this first examination, slides were placed on a Coplin jar with dH₂O for 10–12 hours. Water was changed three or four times during the washes. Then slides were dehydrated with an ethanol series (70% and 85%) for 10 minutes, and in ethanol 100% for 1 hour.

To completely remove the intercellular matrix and ensure a good quality hybridization, slides were treated with 200 μ L of RNase (DNase free) (10 mg/ml) (Sigma) for 20 minutes at 37°C, 2 \times SSC two 5 minutes washes, and with pepsin solution (100 mg/mL) (Sigma) in a Coplin jar at 37°C for 5 minutes. Previous to hybridization, formaldehyde/phosphate-buffered solution (PBS) post-fixation was performed. After two washes with 2 \times SSC, and after drying the slides on a heater plate, co-denaturation of the slide material and application of the *CCND1* probe (Vysis Inc., Downers Grove, IL) was performed according to the manufacturer's instructions using a Hybrite (Vysis Inc.). Hybridization took place overnight in a humidity chamber at 37°C.

Post-hybridization washes were performed by transferring the slides to a Coplin jar filled with 0.1 \times SSC/0.3% NP-40 at 72°C for 2 minutes, and 2 \times SSC/0.3% NP-40 for 2 minutes at room temperature. Nuclei were counterstained

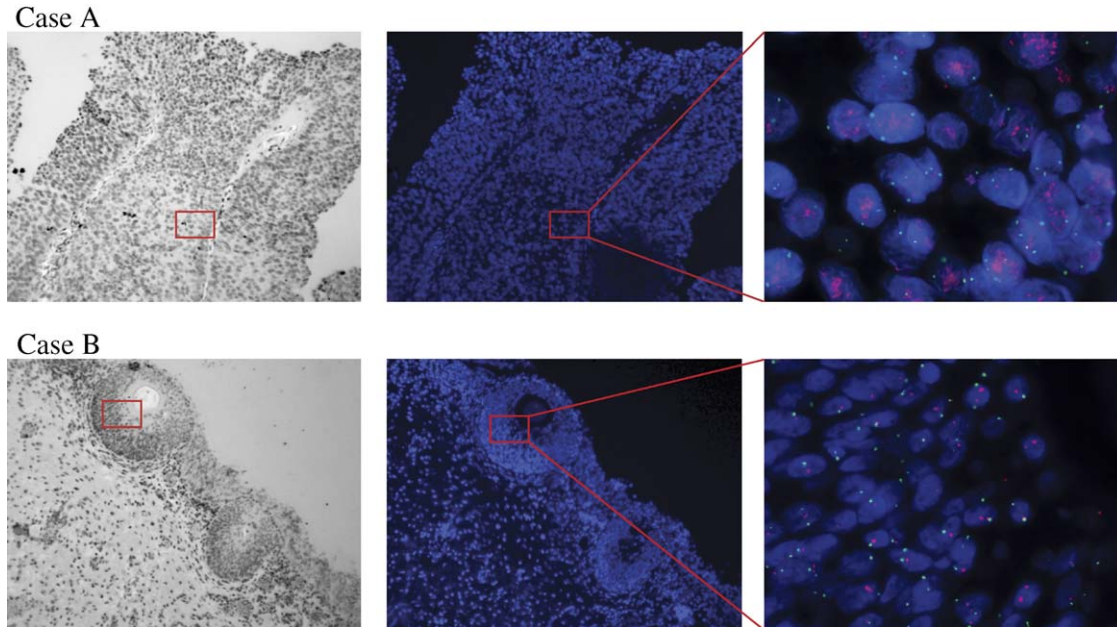


Fig. 1. Sequential images of paraffin-embedded tissue sections stained with toluidine blue, DAPI, and hybridized with the probe *CCND1* (SpectrumOrange) and α -satellite DNA for chromosome 11 (SpectrumGreen). *Case A*: The application of FISH showed amplification of the gene *CCND1*. *Case B*: This image shows a Von Braun nodule which contains non-carcinoma cells. These data correlated with the normal number of copies of *CCND1* shown by FISH.

with 4',6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, 125 ng/ μ L; Sigma) and 12 μ L of Vectashield antifade.

Analysis was done using a fluorescence microscope (Olympus BX-50) equipped with the appropriate fluorescence filter set. At least 200 nuclei were selected for scoring. Because overlapping nuclei and truncated cells interfere with accurate scoring of individual nuclei, we scored non-overlapping intact nuclei from low-density cell areas or from the periphery. Lymphocytes and connective tissue were excluded. Signals that were less than 0.5 μ m apart indicated dividing cells in S phase and were counted as one.

Acknowledgments

The work has been supported by the Instituto de Salud Carlos III G03/160-Red Temática de Grupos de Investigación Cooperativa, and Fondo de Investigación Sanitaria PI020263. Esther Prat is supported by the Institut Municipal d'Investigacions Mèdiques de Barcelona (IMIM), Jordi Camps is a recipient of a grant from the Universitat Autònoma de Barcelona, and Javier del Rey is a recipient of a grant from the Generalitat de Catalunya.

Esther Prat¹
Jordi Camps¹
Javier del Rey

Josep Egozcue
Rosa Miró

*Departament de Biologia Cel·lular Fisiologia i Immunologia
Institut de Biotecnologia i de Biomedicina
Universitat Autònoma de Barcelona, 08193
Bellaterra, Spain*

Antoni Gelabert
Servei d'Urologia
Hospital del Mar
Barcelona, Spain

Ferran Algaba
Pathology Section
Fundació Puigvert
Universitat Autònoma de Barcelona
Cartagena 340-350
08025 Barcelona, Spain

References

- [1] Jordan JJ, Hanlon AL, Al-Saleem TI, Greenberg RE, Tricoli JV. Loss of the short arm of the Y chromosome in human prostate carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;124:122–6.
- [2] Steidl C, Simon R, Bürger H, Brinkschmidt C, Hertle L, Böcker W, Terpe H-J. Patterns of chromosomal aberrations in urinary bladder tumours and adjacent urothelium. *J Pathol* 2002;198:115–20.
- [3] Haralambieva E, Kleiverda K, Mason DY, Schuurin E, Kluin PM. Detection of three common translocations breakpoints in

¹These authors contributed equally to this work.

- non-Hodgkin's lymphomas by fluorescence in situ hybridization on routine paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol* 2002;198:163–70.
- [4] Werner M, Wilkens L, Aubele M, Nolte M, Zitzelsberger H, Komminoth P. Interphase cytogenetics in pathology: principles, methods, and applications of fluorescence in situ hybridization (FISH). *Histochem Cell Biol* 1997;108:381–90.
- [5] Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998;4:844–7.
- [6] Andersen CL, Hostetter G, Grigoryan A, Sauter G, Kallioniemi A. Improved procedure for fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cytometry* 2001;45:83–6.

Treball- 3

CGH analysis reveals diferent subgroups in early stage bladder tumors.

Prat E, Camps J, del Rey J, Ponsa I, Egozcue J, Caballín MR, Gelabert A, Campillo M, Algaba F, Miró R.

Genes Chromosomes and Cancer. (Enviat)

Index by Thomson-ISI Journal Citation Reports

ISI 2004 Impact Factor:4.276

**CGH ANALYSIS REVEALS DIFFERENT SUBGROUPS IN EARLY STAGE
BLADDER TUMORS**

Esther Prat 1, Jordi Camps 1, Javier del Rey 1, Immaculada Ponsa 1, Josep Egozcue 1,
Maria Rosa Caballín 1, Antoni Gelabert 2, Mercedes Campillo 3, Ferran Algaba 4, Rosa
Miró 1.

- (1) Institut de Biotecnologia i Biomedicina and Departament de Biologia Cel·lular,
Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona; Barcelona.
Spain.
- (2) Departament d'Urologia, Hospital del Mar, IMAS-UAB; Barcelona, Spain.
- (3) Departament de Pediatria, d'Obstetrícia i Ginecologia i de Medicina Preventiva,
Universitat Autònoma de Barcelona; Barcelona. Spain.
- (4) Servei d'Anatomia Patològica. Fundació Puigvert; Barcelona. Spain.

All correspondence should be addressed to: Esther Prat, Unitat de Biologia,
Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia, Immunologia, Universitat Autònoma de
Barcelona; Bellaterra, 08193. Spain. Phone: 34 93 581 1175 / Fax: 34 93 581 1025

e-mail: eprat@imim.es

ABSTRACT

Although both pTa and pT1 tumors are considered superficial, they also represent a heterogeneous group of tumors that may differ in their molecular pathogenesis and pathways of progression. In the present paper, 39 superficially and minimally invasive bladder tumors were analyzed by conventional comparative genomic hybridization (CGH). Gains of chromosomes Xp and Xq were the most frequent chromosome imbalances (41% and 46% of cases, respectively). Losses of 9p, 9q, 5q, 11q and gains in 19p were detected in more than 20% of all cases. Gains in 1p, 1q, 3p, 4q, 17p, 17q and 19q appeared in more than 15% of the tumors.

When tumors were classified according to their individualized pattern of gains and losses, the presence of three groups of tumors can be observed. In the first group gains predominate over losses. This group contained more than 40% of gains of 1p, 1q, 17q and 19p. The second group, which is characterized by the predominance of losses, being the most frequent (more than 50%) the -5q, -8p, -9p, -9q, -10q and -11q. In addition, in this group the gain of Xq was detected in more than 80% of the tumors. The third group is characterized by a low number (< 4) of genomic imbalances.

The present data suggest that superficial (pTa and pT1) TCC of the bladder can be subdivided into a larger number of subclasses than had previously been expected. Additionally, the present data indicate that even within the group of early stage bladder tumors, different ways may exist which affects the same cellular functions.

INTRODUCTION

Bladder cancer is the fifth most frequent neoplasm in developed countries. The most common form of the bladder carcinomas are transitional cell carcinomas (TCC), accounting for approximately 90% of all cases. TCC of the bladder can be classified into two categories based on their histopathology and clinical behavior. Approximately 70%-80% of the TCC are superficial, non-invasive papillary carcinomas (stage pTa) or micro invasive tumors (stage pT1) at initial diagnosis and they are associated with a high risk of recurrence (70%) following treatment. The remaining 20%-30% of bladder cancers show muscle invasion at the time of diagnosis (\geq pT2), have no association with superficial papillary tumors and are thought to arise from carcinomas *in situ* (CIS). Approximately 50% of patients with muscle-infiltrating tumors already harbor or will develop metastasis (Knowles 1999)

Like other solid tumors, it has been suggested that this morphological heterogeneity originates from underlying genetics leading to diverse pathways of tumor development and progression. There are a number of studies indicating that there is considerable variability in the degree to which bladder tumors are altered at the chromosomal level, and the spectrum of alterations can vary depending on the grade of differentiation and the tumor stage.

By means of computer simulations, (Hoglund, et al. 2001b) indicated the presence of at least two cytogenetic pathways in bladder cancer. The first is characterized by the loss of chromosome 9, and the second by the gain of chromosome 7. The loss of chromosome 9 was predominantly followed by -11p and 1q+ and then by -17p. Of the later imbalances, -10, -15, and -16 were predominantly associated with -9. The gain of 7

was followed by 8p- and +8q, both of which were highly specific for the +7 pathway, and by -17p. Furthermore, 3p- was a specific late event in the +7 pathway. Although these events, except for -17p, have the character of being pathway specific, the two well separated cytogenetic routes converged at subsequent stages as both accrued the imbalances: -2p, -4p, -5q, +5p, -6q, -18 and -22p. According to these authors, the -9 pathway predominantly leads to Ta-T2 tumors, whereas the +7 pathway leads to T1-T3 tumors.

A comprehensive picture of chromosome imbalances, including a number of previously unknown genomic alterations such as high level amplifications, has been reported in TCC of the bladder using metaphase CGH (Hovey, et al. 1998; Kallioniemi, et al. 1995; Kallioniemi, et al. 1992; Koo, et al. 1999; Prat, et al. 2001; Richter, et al. 1999; Simon, et al. 1998; Simon, et al. 2000; Zhao, et al. 1999). Although some discrepancies exist, these studies show that losses of 9p and 9q are frequent in tumors of all grades and stages. Gains in 1q, 3p, 6p, 8q, 10p 17q and 20q and losses in 2q, 5q, 8p, 10q, 1q, 13q, 14q and 17p are more frequent in pT1 and pT2 tumors. Several alterations such as -6q and gains in 7p and Xq are more frequent in pT2-T4 tumors.

Chromosome regions previously reported by using conventional CGH and loss of heterozygosity (Czerniak, et al. 2000; Sengelov, et al. 2000; Tzai, et al. 2003) have also been confirmed by using array-based CGH (Blaveri, et al. 2005a; Hurst, et al. 2004; Veltman, et al. 2003). In addition, high resolution mapping of copy number changes in different stages of bladder carcinogenesis allowed for the identification of alterations in many small genomic regions, some with high level amplifications or homozygous deletions (Veltman, et al. 2003).

The molecular discrimination between early stage and invasive bladder cancer has already been described in previous analyses of pools of bladder tumors of different stages and grades using expression profiling analysis (Dyrskjot, et al. 2003; Sanchez-Carbayo, et al. 2003a; Sanchez-Carbayo, et al. 2003b; Thykjaer, et al. 2001).

Although both pTa and pT1 tumors are considered superficial, they also represent a heterogeneous group of tumors that may differ in their molecular pathogenesis and pathways of progression. By array expression analysis (Blaveri, et al. 2005b), these tumors were separated into two groups. One cluster contained only pTa tumors (mainly low grade), whereas the other contained all of the pT1 tumors (all high grade) and a subset of pTa tumors (both high and low grade).

In a recent study, significant differences in the FGA (fraction genome altered) have been identified among tumors of different stages, grades, and patient outcome. Stage pTa tumors had the lowest levels of alteration, and stage pT1 showed a much higher overall FGA (Blaveri, et al. 2005a). A subclassification of pTa tumors has also been described on the basis of their gene expression patterns (Dyrskjot, et al. 2003).

In the present paper, 39 early stage transitional cell carcinomas of the bladder have been analyzed by conventional comparative genomic hybridization (CGH). Analysis of chromosome imbalances in superficially and minimally invasive bladder tumors could add more insight to ascertain those events associated with evolutive patterns in these tumors.

MATERIALS AND METHODS

Patients and samples

A total of 39 tumor samples from 37 men and 2 women were obtained from transurethral resection and were included in paraffin blocks. Clinical and pathological data from the patients are indicated in Table 1. A total of 17 cases were classified as pTa (10 GI and 7 GII) and 22 were pT1 (5 GII and 17 GIII). All specimens were graded according to the WHO classification and staged according to the TNM system. Interestingly, 12 out of 13 CIS were surrounding pT1G3 tumors.

CGH and FISH

For each tumor sample, DNA was extracted from 4-5 10 μ m paraffin sections using a Quiagen Kit: QUIAamp® DNA Mini Kit. Before extraction, evaluation by the pathologist determined that the proportion of tumor cells was higher than 80%. The first and the last sections were stained with hematoxylin/eosin to ensure the presence of the tumor in the sections series.

CGH analysis was performed according to the method described by (Prat, et al. 2001).

Paraffin-embedded tissue sections of 3 μ m were used to perform FISH analysis. Slides were placed in the oven for 20 minutes at 100°C. After reaching room temperature, the paraffin was dissolved with three 10 minute changes of xylene in three different coplin jars at room temperature.

After appropriate washes and enzymatic treatment, co-denaturation of the slide material and LSI Cyclin D1 SpectrumOrange/CEP11 SpectrumGreen (Vysis, Inc.; Downers Grove, IL) was performed according to the manufacturer's instructions using a Hybrite

(Vysis, Inc., Downers Grove, IL). Hybridization took place overnight in a humidity chamber at 37°C.

Post hybridization washes were performed according to manufacturer's protocols. Nuclei were counterstained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, 125 ng/μl) (Sigma) and 12 μl of Vectashield antifade.

Scoring of fluorescence signals was carried out in each sample by counting the number of single copy gene and centromeric signals; amplification was defined as the presence (in >5% of tumor cells) of either >10 gene signals or more than three times as many gene signals as centromere signals of the chromosome. Gains were defined as the presence of three signals or more.

Statistical analysis

To analyze the possible patterns of correlated imbalances, principal component analysis (PCA) (Affifi and Azen 1979) was performed. Principal components were extracted by a stepwise procedure in which the first component always explains the greatest amount of variance. The second component is that extracted from a residual matrix. Imbalances were plotted in relation to the first two principal components, which explained 23.8% and 18.7% of the total variance.

RESULTS

The CGH results of the 39 tumors analyzed are shown in Table 2. The total number of imbalances per tumor ranged from 0 to 17. On average, 6.41 alterations were found per tumor: 3.58 gains (range 0 to 13), 2.84 losses (range 0 to 13).

Gains of chromosomes Xp and Xq were the most frequent chromosome imbalances (41% and 46% of all cases respectively). Losses of 9p, 9q, 5q, 11q and gains in 19p were detected in more than 20% of the cases. Gains in 1p, 1q, 3p, 4q, 17p, 17q and 19q appeared in more than 15% of the tumors.

Amplifications were detected at 11q13 (one tumor), 12q14q15, 12q24.2q24.3 and 19p13.2pter (one tumor in each one). The status of the cyclin D1 gene (11q13) was also analyzed by FISH, detecting amplification in 5 tumors; only one of them (Case U-31) had shown amplification at 11q13 by CGH; four (Cases U26, U28, U31, U37) had shown normal CGH profiles, and one case (U20) had shown gain by CGH.

In the remaining 34 cases, both CGH and FISH analysis showed normal *CCND1* gene dosage.

A significant increase in the number of detectable aberrations in relation to stage-grade of the tumors was not observed: pTa G1 tumors had, on average, 3.8 gains and 1.8 losses, resulting in a total of 5.6 aberrations per tumor. This average was 4.71 (3.4 gains, 1.2 losses) in pTaG2 tumors; 7.2 (3.4 gains and 3.8 losses) in pT1G2 and 7.35 (3.5 gains and 3.7 losses) in pT1G3 tumors. Whereas gains predominated over losses in pTa tumors, the relation between gains and losses was similar in pT1 carcinomas (Figure 1A). However, when tumors were classified according to their individualized pattern of gains and losses (Figure 1B), it was observed that the distribution of both types of imbalances was not homogeneous showing two well separated groups, one characterized by gains and the other by losses. An intermediate group with few imbalances (<4) was also observed. The presence of three groups of tumors can be observed in Table 2 where tumors are ordered according to their pattern of gains and losses.

In the first group (Tumors U-12 to U-23 in Table 2), gains predominated over losses. Thirteen tumors are included in this group: 6 pTa/G1G2 (6/13, 46%), 2 pT1G2 (2/13, 15%) and 5 pT1G3 (5/13, 39%). This group contained more than 40% of gains of 1p, 1q, 17q and 19p.

The second group, which is characterized by the predominance of losses, included eight tumors (U-16 to U-38 in Table 2): 2 pTa/G1G2 (2/8, 25%), one pT1G2 (1/8, 12.5%) and 5 pT1G3 (5/8, 62.5%). This group showed more than 50% of losses of 5q, 8p, 9p, 9q, 10q and 11q. In spite of the low number of gains observed, a gain of Xq was detected in more than 80% of the tumors.

The third group (Tumors U-20 to U-10 in Table 2) is characterized by a low number (< 4) of genomic imbalances. In this group, 50% (9/18) of the tumors were pTa/G1G2, 11% (2/18) T1G2 and 39% (7/18) were pT1G3. This group comprised tumors that showed chromosome imbalances typical of the tumors of the first or second group (i.e. +1p and +3p, commonly found in the first group).

The principal component analysis also showed the presence of two subgroups in bladder tumors with complex karyotypes (Figure 2). The first component included losses of chromosome arms 11q, 8p, 10q, 9q, 5q, 9p, 2q and gains of 8q. The second component included only gains affecting 1p, 17q, 19q, 19p, 17p and 1q. These two components explain 42.5% of variability between cases.

DISCUSSION

Bladder cancer consists of a heterogeneous group of tumors that differ in grade and stage according to clinical characteristics. In the present study, the chromosome imbalances shown in 39 paraffin-embedded, papillary transitional cell carcinomas of the

bladder were analyzed. Conventional CGH was used to dissect the spectrum and frequency of alterations in bladder cancer and to classify different subsets of tumors according to their genomic imbalances (Figure 1B).

This study confirmed chromosome imbalances. The majority of the chromosome imbalances have already been reported by other authors (Prat, et al. 2001). Whole chromosome or partial gains affecting chromosome X represented a frequency of above 40%. Chromosome bands Xp11-13 and Xq21-22.2 had already been described as probable locations of oncogenes with relevance for bladder cancer (Richter, et al. 1997; Zhao, et al. 1999). Unfortunately, recent studies of bladder cancer using CGH array discard the sexual chromosomes due to misinterpretations. Deletions of 9p and 9q are the most frequently deleted regions in papillary bladder tumors. Recent CGH array data have suggested that clones at 9p21 might be the pinpoint of a candidate gene to act as tumor suppressor genes in bladder cancer (Blaveri, et al. 2005a). The loss of the whole chromosome 9 or specific cytobands is thought to be one of the initial events in bladder carcinogenesis (Hoglund, et al. 2001b). Our results are in agreement with the initiation of bladder cancer with the loss of chromosome 9, showing imbalances affecting this chromosome in pTa and pT1 TCCs.

Alterations at chromosome 11 have been described by other authors. Deletions at 11q23qter were represented by 20% of the cases. Sometimes the loss of chromosome 11q was accompanied by the high-level amplification of CCND1, identified by FISH. High-level amplifications at 11q13 have been repeatedly found in bladder cancer by comparative genomic hybridization. Earlier studies on CCND1 found 11% to be amplified by FISH (Sauter, et al. 1993) and by Southern blot (Bringuier, et al. 1996). Our FISH results confirm the above mentioned data, indicating an amplification of the

CCND1 gene in 12.8% of the tumors; this level is higher than that obtained by CGH analysis in the same tumors (2.5%).

PCA analyses of the 39 carcinomas revealed the presence of specific combinations of alterations. In general, the most frequent chromosome imbalances detected by CGH were defined according to the statistical parameters. We have identified two components that explain more than 40 per cent (42.5%) of the total alterations of the tumors analyzed. These two components described are differentiated because the first component was mostly represented by chromosome losses while the second component was mostly represented by chromosome gains. The chromosomes involved in these two components were represented in the groups of bladder tumors we classified according to the CGH results.

In general, three groups of bladder TCC were described according to the quantity and quality of the chromosome alterations. Therefore, one group of tumors mainly represented by chromosomal gains was described, another group was mainly represented by chromosome losses, and a third group had a minor quantity of changes. In agreement with our classification, (Blaveri, et al. 2005a) classified bladder TCC according to its altered fraction of genome and suggested that some bladder tumors evolve by mechanisms that imply little chromosomal changes, whereas others undergo marked chromosomal alterations. Among tumors with little chromosomal changes, some of them showed chromosome imbalances commonly found in the group of losses or in the group of gains alternatively, suggesting that these tumors may evolve to accumulate more losses or gains during carcinogenesis. It has been demonstrated that early aberrations to a large extent determine the spectrum of subsequent, late aberrations. This indicates that different modes of chromosomal evolution may be

initiated at an early stage of tumorigenesis, leading to an accumulation of chromosomal abnormalities along distinct pathways (Camps, et al. 2004; Hoglund, et al. 2005; Hoglund, et al. 2001a; Hoglund, et al. 2001b). In fact, thorough statistical analysis of karyotypic patterns have demonstrated that most tumors show at least two distinct evolutionary routes, one characterized by genomic losses, and the other by genomic gains (Hoglund, et al. 2005). In both pathways, the driving forces behind the karyotypic profiles are likely to be associated with some type of chromosome instability (Camps, et al. 2005).

In summary, our results confirm those from the literature and suggest that superficial (pTa and pT1) TCC of the bladder can be subdivided into a larger number of subclasses than had previously been expected. Additionally, the present data indicate that even within the group of early stage bladder tumors, different ways may exist which affects the same cellular functions.

ACKNOWLEDGEMENTS

E.P. was a fellow supported by the Institut Municipal d'Investigacions Mèdiques (IMIM). J.C. was a fellow of the Universitat Autònoma de Barcelona and belongs to the EPICUR-Red research program. J.R. was a fellow supported by the Generalitat de Catalunya. This study has been partially supported by ISCIII: EPICUR-Red (G03/174) y PI020263. The English of this manuscript has been revised by a native English-speaking instructor of this University, Mr. Chuck Simmons

BIBLIOGRAPHY

- Affifi A, Azen S. 1979. Statistical analysis: a computer oriented approach.: New York: Academic Press.
- 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(19 Pt 1):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(11):4044-55.
- Bringuier PP, Tamimi Y, Schuurin E, Schalken J. 1996. Expression of cyclin D1 and EMS1 in bladder tumours; relationship with chromosome 11q13 amplification. Oncogene 12(8):1747-53.
- Camps J, Morales C, Prat E, Ribas M, Capella G, Egozcue J, Peinado MA, Miro R. 2004. Genetic evolution in colon cancer KM12 cells and metastatic derivatives. Int J Cancer 110(6):869-74.
- Camps J, Ponsa I, Ribas M, Prat E, Egozcue J, Peinado MA, Miro R. 2005. Comprehensive measurement of chromosomal instability in cancer cells: combination of fluorescence in situ hybridization and cytokinesis-block micronucleus assay. Faseb J 19(7):828-30.
- 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(4):392-402.
- 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(1):90-6.

- Hoglund M, Frigyesi A, Sall T, Gisselsson D, Mitelman F. 2005. Statistical behavior of complex cancer karyotypes. *Genes Chromosomes Cancer* 42(4):327-41.
- Hoglund M, Gisselsson D, Mandahl N, Johansson B, Mertens F, Mitelman F, Sall T. 2001a. Multivariate analyses of genomic imbalances in solid tumors reveal distinct and converging pathways of karyotypic evolution. *Genes Chromosomes Cancer* 31(2):156-71.
- Hoglund M, Sall T, Heim S, Mitelman F, Mandahl N, Fadl-Elmula I. 2001b. Identification of cytogenetic subgroups and karyotypic pathways in transitional cell carcinoma. *Cancer Res* 61(22):8241-6.
- Hovey RM, Chu L, Balazs M, DeVries S, Moore D, Sauter G, Carroll PR, Waldman FM. 1998. Genetic alterations in primary bladder cancers and their metastases. *Cancer Res* 58(16):3555-60.
- 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(12):2250-63.
- 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(3):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(5083):818-21.
- Knowles MA. 1999. The genetics of transitional cell carcinoma: progress and potential clinical application. *BJU Int* 84(4):412-27.

- 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(2):87-93.
- 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(5):986-92.
- 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(14):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(22):5687-91.
- Sanchez-Carbayo M, Capodieci P, Cordon-Cardo C. 2003a. Tumor suppressor role of KiSS-1 in bladder cancer: loss of KiSS-1 expression is associated with bladder cancer progression and clinical outcome. *Am J Pathol* 162(2):609-17.
- Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Lozano JJ, Li W, Charytonowicz E, Belbin TJ, Prystowsky MB, Ortiz AR, Childs G, Cordon-Cardo C. 2003b. Gene discovery in bladder cancer progression using cDNA microarrays. *Am J Pathol* 163(2):505-16.
- Sauter G, Moch H, Gudat F, Mihatsch MJ, Haley J, Meecker T, Waldman F. 1993. Demonstration of gene amplification in urinary bladder cancer by fluorescent in situ hybridization (FISH). *Verh Dtsch Ges Pathol* 77:247-51.

- Sengelov L, Christensen M, von der Maase HD, Horn T, Marcussen N, Kamby C, Orntoft T. 2000. Loss of heterozygosity at 1p, 8p, 10p, 13q, and 17p in advanced urothelial cancer and lack of relation to chemotherapy response and outcome. *Cancer Genet Cytogenet* 123(2):109-13.
- Simon R, Burger H, Brinkschmidt C, Bocker W, Hertle L, Terpe HJ. 1998. Chromosomal aberrations associated with invasion in papillary superficial bladder cancer. *J Pathol* 185(4):345-51.
- 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(5):1025-9.
- Thykjaer T, Workman C, Kruhoffer M, Demtroder K, Wolf H, Andersen LD, Frederiksen CM, Knudsen S, Orntoft TF. 2001. Identification of gene expression patterns in superficial and invasive human bladder cancer. *Cancer Res* 61(6):2492-9.
- Tzai TS, Chen HH, Chan SH, Ho CL, Tsai YS, Cheng HL, Dai YC, Lin JS, Yang WH, Chow NH. 2003. Clinical significance of allelotype profiling for urothelial carcinoma. *Urology* 62(2):378-84.
- 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(11):2872-80.
- 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(18):4658-61.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. (A) Chromosomal imbalances by tumor stage and grade. (B) Schematic diagram of gains and losses.

Figure 2. Distribution and association of the chromosome imbalances according to the component 1 and component 2.

TABLE 1

Case	Age/Sex	Stage/Grade	S/M	CIS	Recurrences (months)	Survival
U-1	46/♂	TaG1	S	-	NO	>7 years
U-2	48/♂	TaG1	S	-	NO	>6 years
U-3	57/♂	TaG1	M	-	(19) TaG2 ; (15) (15) TaG2 ; (10) T1G1 ; (13); (8)	>6 years
U-4	68/♂	TaG1	S	-	TaG2 ; (14)	>7 years
U-5	63/♀	TaG1	S	-	(19) TaG2	>6 years
U-6	68/♂	TaG1	S	+	(28)	>6 years
U-7	66/♂	TaG1	S	-	NO	>5 years
U-8	45/♂	TaG1	S	-	NO	>6 years
U-9	67/♂	TaG1	S	-	(9) TaG3; (11)TaG2	>6 years
U-10	58/♂	TaG1	S	-	(67) T?G2	>5 years
U-11	60/♂	TaG2	S	-	(8); (10); (52)	>7 years
U-12	66/♂	TaG2	S	+	(4) T?G2; (60); (8)	>7 years
U-13	52/♀	TaG2	M	-	(37) TaG1	>7 years
U-14	67/♂	TaG2	S	-	(12) TxG3; (10) T?G3; (30)	>6 years
U-15	45/♂	TaG2	S	-	(8); (13) T1G3	>36 months
U-16	55/♂	TaG2	S	-	NO	?
U-17	73/♂	TaG2	S	-	(7) CIS	>5 years
U-18	73/♂	T1G2	S	+	NO	>41 months
U-19	68/♂	T1G2	S	-	NO	>6 years
U-20	60/♂	T1G2	S	-	(10) TxG2; (17); (9) TxG2; (6); (7)	54 months
U-21	55/♂	T1G2	S	-	(10) T?G2; (3) TaG1	>6 years
U-22	60/♂	T1G2	M	-	NO	>5 years
U-23	49/♂	T1G3	M	+	NO	>5 years
U-24	54/♂	T1G3	S	-	NO	>6 years
U-25	71/♂	T1G3	S	+	NO	56 months
U-26	40/♂	T1G3	M	+	NO	?
U-27	62/♂	T1G3	M	+	NO	>30 months
U-28	62/♂	T1G3	M	+	NO	>6 years
U-29	77/♂	T1G3	S	-	(3)	>39 months
U-30	63/♂	T1G3	M	-	NO	>7 years
U-31	67/♂	T1G3	M	+	(9) TxG3; (4); (10) TxG3	31 months
U-32	72/♂	T1G3	S	-	NO	>6 years
U-33	67/♂	T1G3	S	+	(11) T2 Anaplasico	?
U-34	63/♂	T1G3	M	+	(31) TaG1	>7 years
U-35	51/♂	T1G3	M	+		>6 years
U-36	44/♂	T1G3	S	+	NO	>7 years
U-37	73/♂	T1G3	S	-	NO	>3 months
U-38	54/♂	T1G3	S	+	NO	>42 months
U-39	71/♂	T1G3	M	+	(8) CIS	>5 years

TABLE 2

Case	S/G	Gains	Losses
U-12	pTaG2	1p32pter,1q21qter,5q34qter,12q22qter,15q22q24,16pterq13,16q23qter,17p12q12, 12q24.2q24.3 ,19p13.3,20q,21q22,22q12	2q36q37
U-8	pTaG1	1p32pter,2p25,2q37,11q13,12q24,16,17,19,20q,21,22,Xq21,Xq26qter	3p12,5q14q23,13q32
U-25	pT1G3	1p32pter,1q43,2p24pter,2q36qter,9q34,11q12q13,16p13.1pter,17p13, 19p13.2pter ,19,22,Y	5p15.2q23
U-3	pTaG1	1p34.2pter,4p16,4p11q24,7q11,17pterq12,19,Xpterq25,Y	5p15,6p22,11q23,12p12
U-27	pT1G3	1q43qter,4p15.2q21,5q11.2q12,7p21pter,7q11.2,10p11.2p00,19	7q33q35,9q21q31,10q24q25,16q22q23
U-5	pTaG1	1p32pter,1q25q42,3p26,9q34,12q24.1,14q24qter,17q,Xp22.1pter	Y
U-29	pT1G3	1q21q24,1q31q32,2p14p15,7p15,8q21.3q23,17q21	9p13p23
U-19	pT1G2	2q37,5q27,9q34,17p,19p,20q13.2q13.3	4q26q27,12q15
U-21	pT1G2	5p14pter,10p11p12,19p,20,Y	5q34,9,11
U-17	pTaG2	1p36.2pter,16p13.2pter,X,Y	
U-26	pT1G3	1p32pter,17q11.2q12,19,Xp22.2pter	
U-13	pTaG2	3p26,3q28,9p21pter,Xq21q22	Y
U-23	pT1G3	1q31,4q00q31.3,X	1p36.1pter,16,Y
U-20	pT1G2	3p24p26,6p25,11q13	
U-33	pT1G3	3p25pter,4q21	5q32qter
U-35	pT1G3	1p36.2,9q34	
U-34	pT1G3	3p26,Xq21	
U-11	pTaG2	1q42	Xq00q13
U-7	pTaG1	X	14q31
U-1	pTaG1	Xp11.3q25	
U-28	pT1G3	X	
U-2	pTaG1		
U-24	pT1G3		
U-6	pTaG1		
U-30	pT1G3		
U-14	pTaG2		Y
U-4	pTaG1	8q24.1qter	Y
U-18	pT1G2		9p23p24,Y
U-36	pT1G3	X	2q12q22,Y
U-15	pTaG2	15	9,Y
U-10	pTaG1	3p21,Xq	9,13q22q31

U-16	pTaG2	6p21	12q15,18q22,21q21
U-39	pT1G3	4q12q13,8q24.3,19p,X,Y	2p23p24,2q22,9p,9q31q32,11q22q23
U-9	pTaG1	4p11q13,19p,X,Y	2p21p24,8p23,11q23,12p12,13q31,14q24q31
U-31	pT1G3	7q11.q22,8q13qter, 11q13,12q14q15 ,17p12pter,Xpterq23	4p15.3p15.1,4q22qter,5q33q34,6p12,6q21qter,8p21p22,9p13,9q31,13q21q31
U-22	pT1G2	14q13,X,Y	4p15.3,5q31qter,7q34q35,8p22p23,10p13p14,10q25,11p15,11q23q24,13q31,14q31,17p12,18q12.3qter
U-37	pT1G3	7q11,8q00q21.3,19,X,Y	2p14p24,2q21,4p15.1p15.2,5q12q13,6q25,7q31q35,8p21p22,9p12q23,10q25,11q23,14q24,15q24
U-32	pT1G3	5q11.2p13,10p12,Xp21q25	2p24p23,3p13p14,3q32q33,5q34,6q24.1q24.2,8p12p22,9p12p22,9q31q33,10q24q26,11q23q24,15q23q24,17p12,18q21q22
U-38	pT1G3	4q00q21,X	1q31q41,2q12q14.3,5q23qter,6q25,7p12p14,7q32q35,9p12,10q25,11q23,12p12,12q24.1q24.2,15q24q25,Y

FIGURE 1A

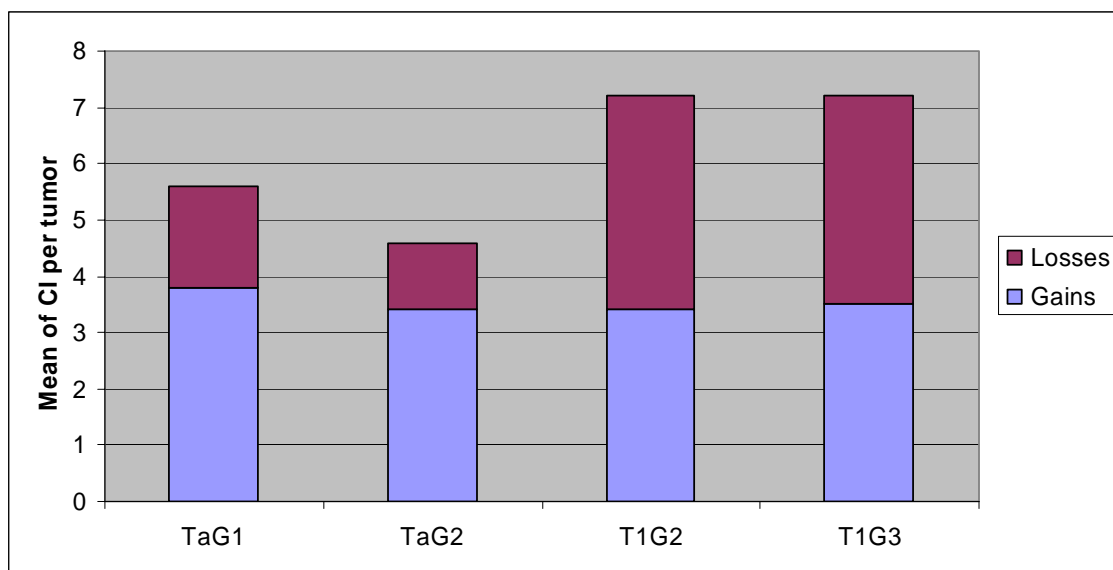


FIGURE 1B

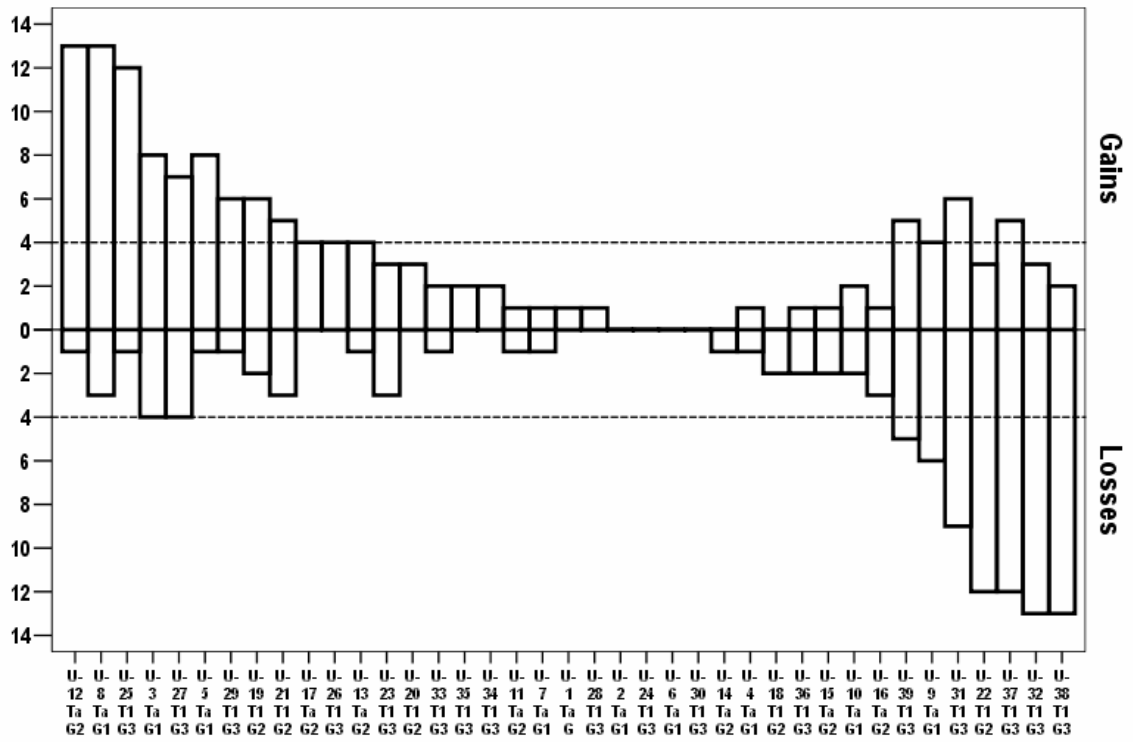
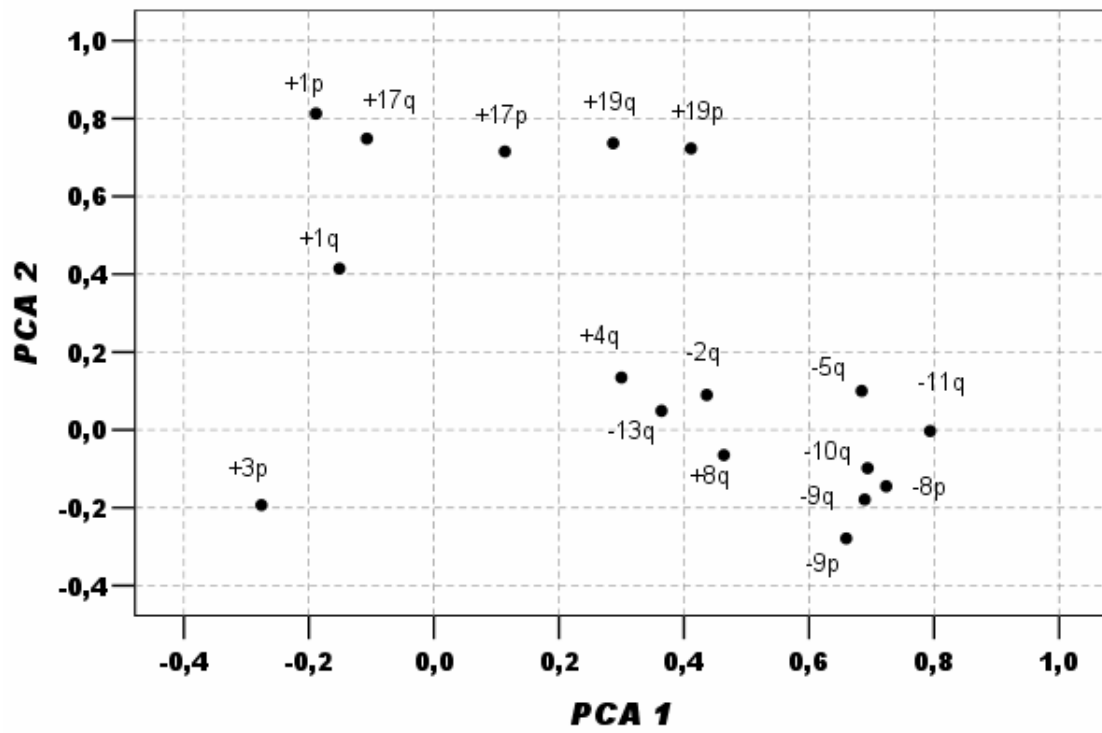


FIGURE 2



Treball- 4

The clonal relationship between synchronous urothelial tumors is similar to that observed among the subclones of the same tumor.

Prat E, del Rey J, Camps J, Ponsa I, Lloreta J, Egozcue J, Gelabert A, Campillo M, Miró R.

Cancer Letters. (Enviat Ref. CAN-D-05-00388).

Index by Thomson-ISI Journal Citation Reports

ISI 2004 Impact Factor: 2.938

THE CLONAL RELATIONSHIP BETWEEN SYNCHRONOUS UROTHELIAL TUMOURS IS SIMILAR TO THAT OBSERVED AMONG THE SUBCLONES OF THE SAME TUMOUR

Esther Prat 1, Javier del Rey 1, Jordi Camps 1, Immaculada Ponsa 1, Josep Lloreta 2, Josep Egozcue 1, Antoni Gelabert 3, Mercedes Campillo 4, Rosa Mirò 1

- (1) Institut de Biotecnologia i Biomedicina. Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia, Immunologia. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra 08193, Spain.
- (2) Department of Pathology, Hospital del Mar-IMAS, Passeig Marítim 25-29. Barcelona 08003, Spain,
- (3) Departament d'Urologia, Hospital del Mar, IMAS-UAB, Passeig Marítim 25-29. Barcelona 08003, Spain.
- (4) Laboratori de Medicina Computacional, Unitat de Bioestadística, Facultat de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra 08193, Spain.

Running title: Clonal relation between synchronous urothelial tumours.

All the correspondence should be addressed to: Esther Prat, Unitat de Biologia, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia, Immunologia. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra 08193. Spain.

ABSTRACT

In order to define genetic changes associated with multifocal bladder cancer and to investigate the clonal genetic relationship between synchronous tumours, comparative genomic hybridization (CGH) was applied to study 8 synchronous urothelial tumours from 3 patients and macroscopically different parts of the same tumour from two other patients.

The CGH profiles obtained from independent tumours belonging to the same patient allowed us to elaborate cytogenetic pedigrees portraying the accumulation of chromosome alterations as a form of clonal evolution from a single precursor cell. In some cases, this clonal relationship was even higher than the observed between macroscopically different parts of the same tumour.

INTRODUCTION

Around 30% transitional cell carcinomas (TCC) of urinary tract are found as multiple tumours at the time of diagnosis. Concerning the origin of these multiple uroepithelial carcinomas, there are two hypotheses. One is the field disease theory in which the entire epithelium is tumour prone in the sense that multiple polyclonal primary lesions are likely to emerge from it, either synchronously or metachronously (Yao and Rubin, 1994). The alternative monoclonal theory presupposes that the multiple tumours are descendants of a single, genetically transformed cell spreading throughout the urothelium (Sidransky *et al*, 1992). To explain the clonal spread, it has been suggested that tumour cells could be released by the primary tumour and seeded in the urine with secondary implantation at different sites of the urothelium. Alternatively, malignant cells could migrate continuously throughout the epithelium (Harris and Neal, 1992).

The majority of studies investigating multifocal urothelial lesions have demonstrated a monoclonal origin. Sidransky *et al*. (Sidransky *et al*, 1992) showed that all tumours from a single patient with multifocal disease revealed the same X chromosome inactivation pattern. The same results were obtained by Li and Cannizzaro (1999) (Li and Cannizzaro, 1999) in a study of 35 low grade non invasive urothelial tumors from ten female patients. Similarly, studies of allelic losses at multiple marker sites have also demonstrated a monoclonal origin (Louhelainen *et al*, 2000; Takahashi *et al*, 1998). In addition, mostly identical *TP53* as well as *FGFR3* mutations have been detected both in synchronous and metachronous tumours (Dalbagni *et al*, 2001; van Tilborg *et al*, 2000). Clear evidence of a clonal relationship (CR) between multifocal bladder tumours has been reported by G-banding and CGH analysis. A highly similar pattern of chromosome abnormalities was detected in a cytogenetic study of six cases of multifocal bladder

cancer (Fadl-Elmula *et al*, 1999). More recently, Simon *et al*.(Simon *et al*, 2001) found a close genetic relationship among all the tumours of a particular cystectomy specimen in six cases of multifocal cancer. These authors suggested lateral migration of tumour cells as a possible mechanism for the spread of a neoplastic clone throughout the urothelium.

Contrary to that stated above, there are several studies indicating that field cancerization contributes to urothelial carcinogenesis as well, leading to oligoclonal or polyclonal tumours (revised in (Duggan *et al*, 2004; Hafner *et al*, 2002). The majority of the studies that found a significant number of patients harboring oligoclonal tumours focused on combined tumours of the upper and lower urinary tract (Takahashi *et al*, 2001), suggesting that oligoclonality might be more frequent in these types of multifocal tumours. On the other hand, studies of early lesions such as multiple hyperplasia and dysplasia also revealed evidence of oligoclonality (Hartmann *et al*, 2002; Yamamoto *et al*, 1999). According to these data, it has been suggested that oligoclonality might be more frequent in precursor lesions and early stage tumours than in advanced carcinomas, and that an initial oligoclonality is replaced by secondary pseudomonoclonality during tumour progression (Hafner *et al*, 2002).

In the present study, the sequential chromosome imbalances are characterized by means of CGH analysis to determine whether multifocal synchronous bladder tumours are truly monoclonal. Eight tumours from 3 patients were investigated and results were compared to those from macroscopically different parts of the same tumour from two other patients.

MATERIALS AND METHODS

Patients and samples

A total of 13 samples from 5 patients (A to E) were analysed. Histopathological analysis demonstrated an apparent multicentricity in two cases. Thus, three and two macroscopically different lesions in patients A and B corresponded to different regions of a solitary tumour. Both cases are used as a control to assess monoclonality.

Samples were taken from three and two macroscopically different parts of the same tumour in patients A and B, respectively, from three independent synchronous tumours each from patients C (C1, C2, C3) and D (D1, D2, D3), and two independent synchronous tumours in case E (E1, E2). All tumours were TCCs affecting the bladder wall except patient A's tumour which affected the renal pelvis.

The specimens were frozen immediately after surgical removal and stored at -80°C until analysis. Portions of each sample were examined by a pathologist to confirm the presence of the tumour, evaluation of tissue morphology, and staging. Tumour specimens were graded according to the WHO classification and staged according to the TNM system (Eble *et al*, 2004).

DNA Extraction

High molecular weight DNAs were extracted from tumour and leukocyte samples according to a method described elsewhere (Sambrook *et al*, 1989) with minor modifications. Briefly, frozen tumour tissues were powdered in chilled liquid nitrogen and homogenised in 100mM NaCl, 10mM Tris HCl, 25mM EDTA, and 0.5% SDS, pH 8.

Leukocytes were isolated after discarding blood plasma and lysed erythrocytes. DNA was extracted, both from tumour tissues and blood cells, with phenol / chloroform /

isoamyl alcohol after proteinase K digestion.

Comparative Genomic Hybridisation.

CGH analysis was performed according to the method described by Prat et al. (2001). (Prat *et al*, 2001) Normal and tumour DNA were labelled with Spectrum Green-dUtp and Spectrum Red-dUTP by nick translation using a commercial kit (Vysis, Downers Grove, IL). Subsequently, equal amounts of normal and tumour labelled probes (500 ng) and 10 µg of Cot-1 DNA were coprecipitated using ethanol. The precipitated DNA was dissolved in 12µl of hybridisation buffer and denatured at 74°C for 8 min. Normal metaphase spreads (Vysis, Downers Grove, IL) were denatured for 5 min at 74°C and hybridised with the DNA mixture in a moist chamber for 2 to 3 days. Slides were washed according to the protocol supplied by the manufacturer. Chromosomes were counterstained with 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI), resulting in a G band-like pattern that was used for chromosome identification.

Statistical analysis

The degree of CR between synchronous tumours of the same patient was assessed according to a modification of the statistical model of Kuukasjärvi et al. (Kuukasjarvi *et al*, 1997). According to this modification, paired synchronous tumours of the same patient were compared.

Hierarchical cluster analysis was applied between the presence or absence (binary independent variable) of imbalances in chromosomes, and the samples A1, A2, A3, B1, B2, C1, C2, C3, D1, D2, D3, E1 and E2 (categorically dependent variable). The Kulczynski 2 similarity index was used to calculate the distance between any two samples. Agglomerative hierarchical cluster analysis was performed using the method

of complete linkage (SPSS, Inc.; Chicago, IL).

An exhaustive CHAID (Chi-Square Automatic Interaction Detection) algorithm was also performed to rationalize with statistical significance ($p < 0.05$ and SPSS Exact Tests for small samples) how imbalances determine the categories of different patients (SPSS Inc.; Chicago, IL).

RESULTS

Genetic changes were detectable by CGH in all samples studied. CGH analysis was also able to distinguish different subclones corresponding to different parts of the same tumour in cases A and B. On average, all 13 samples investigated showed 14.7 chromosomal changes (range 1-32).

The most frequent imbalances detected in the present study were gains of chromosome 1q (8/10 tumours), 2p (7/10), 17q (5/10), and losses in 4q (7/10). In general, gain abnormalities appeared more frequently than losses. Amplifications were seen at: 8p12 (in one tumour of patient C), and 17q23qter (in one tumour of patient E). When analyzing different macroscopic regions of solitary tumours A and B, amplifications were observed at 3p21pter in all subclones of patient A's tumour, and at 6p12p22 and 6q22 in all subclones of patient B's tumour. Chromosome regions 7p13pter and 7q32qter were amplified only in the B1 subclone.

By comparing CGH ratio profiles acquired from the samples belonging to the same case, it was possible to elaborate individual cytogenetic pedigrees reflecting the accumulation of genetic changes during tumour development. Taking a theoretical precursor cell population (X_0) as a starting point, additional clones (X_1 – X_n) were distinguished based upon the highest number of identical chromosomal aberrations in addition to the precursor clone. This method was applied to describe chromosome evolution in different subclones of the same tumour (cases A and B) (Fig 1a) as well as in independent tumours of the same patient (cases C, D, E) (Fig 1b). All tumours derived from the same patient shared a set of 1-16 alterations. Additional changes were found in individual tumours or subsets of tumours.

During the evolution of multiple bladder tumours, or in different parts of the same tumour, expansion of existing chromosome imbalances was detected. For example, in case B, the particular gains of 5p14pter and 6q22 present in subclone B2 became a gain of the whole 5p arm and a gain of 6q16q24, respectively, in subclone B1. Other expanding chromosome regions of gain or losses were detected in different subclones of tumour A (+19p13→+19p, -12p21→-12p21pter) as well as when comparing independent tumours of the same patient in cases: C (+2p21→+2pterq21), D (+2p24→+2p, +16p12→+16p12q21) and E (+7p22pter→+7p).

It was also observed that chromosome region 7q35qter, which appeared as a gain in one subclone (B2) of patient B's tumour, amplified in the other subclone (B1) of the same tumour. In case C, all tumours showed a gain of 8p12, but C1 had an amplification of this region.

The degree of CR between paired samples of tumours from the same patient was based on a probabilistic model initially developed to assess CR between primary tumours and their corresponding metastasis (Kuukasjarvi *et al*, 1997). Applying this method, we found CR values =1 in all paired samples except when comparing samples with a small number of imbalances: A2, C3 and D1 with their corresponding counterparts. In these cases the CR value was between 0.8 and 0.9999. Interestingly, the CR value between samples E1 and E2 was higher than that obtained when comparing different subclones of the same tumour: A1/A2, A1/A3, A2/A3 and B1/B2.

DISCUSSION

In this study, CGH was used to define genetic changes associated with multifocal bladder cancer and to investigate the clonal genetic relationship among synchronous tumours.

The CGH analysis of the different macroscopic parts of the same tumour (cases A and B) was able to detect different subclones, and this allowed us to confirm clear intratumour heterogeneity and to delineate the intratumour clonal evolution (Figure 1a). We also detected evolution from gains of a chromosome region in some tumour areas to amplification of the same chromosome region in other area of the same tumour.

In cases A and B, histopathological analysis confirms that the macroscopically apparent multicentricity is the result of local invasion. However, and taking into account that in both tumours the macroscopically different regions appeared connected by abnormal mucosa, a possible independent origin and a posterior union of different tumours can not be discarded.

As well as having been observed in different parts of the same tumour, comparison of CGH profiles obtained from independent tumours belonging to the same patient allowed us to elaborate cytogenetic pedigrees portraying the accumulation of chromosome alterations as a form of clonal evolution from a single precursor cell (Figure 1b). This CR was also confirmed by the mathematical analysis described by Kuukasjärvi *et al.* (Kuukasjarvi *et al*, 1997). Interestingly, the two tumours from case E showed a higher CR than different forms of the same tumour (cases A and B). Applying the hierarchical cluster analysis, different forms of the same tumour and independent tumours of the same patient were grouped separately as different clones (Figure 2). According to this

analysis, the most closely related forms correspond not only to the different parts of the same tumour, but also to independent tumours (case E). Those tumours with few chromosome imbalances showed a more distant relation.

The majority of chromosome changes detected in the present study correspond to those found in high grade stage singular bladder cancer (Prat *et al*, 2001; Richter *et al*, 1998). It is interesting to note the absence of losses in chromosome 9q (only present in 1/10 tumours) as well as gains in 8q (only present in 2/10 tumours) in spite of the fact that such changes are common in bladder carcinomas. These results contrast with the high frequency of chromosome 4q losses observed in our series. This chromosome imbalance has been detected as a frequent chromosome change in TCC cell lines (Williams *et al*, 2005) and in high grade invasive primary tumours (Simon *et al*, 2000). The high number of chromosome imbalances (14.7 on average) detected in the present report agrees with a previous CGH study of multiple bladder tumours carried out by Simon *et al*. (Simon *et al*, 2001). These authors suggested that a high level of chromosome instability could be characteristic of multicentric bladder tumours. Our results confirm this hypothesis.

Our results showed an expansion of chromosome gains and losses between different tumours of the same patient as well as in different forms of the same tumour. In a study carried out by van Tilborg *et al*. (2000) expanding existing LOH has been observed between metachronous clonally related tumours. These authors suggested a model in which losses of heterozygosity are caused by an increased rate of mitotic recombination. When recombinations occur frequently this leads to an expansion of the region of loss of heterozygosity without gain or loss of chromosome segments. It appears that expanding chromosome unbalances such as the observed in our study could be better

explained by subsequent cycles of chromosome breakage beginning near the centromeric region and extending to telomere regions as it has been proposed by Gisselsson et al. (Gisselsson *et al*, 2001).

One of the most interesting pieces of data of the present study came from the presence of several chromosome imbalances that are so characteristic that allow us to differentiate patients (Figure 3). Thus, the classification tree performed with an exhaustive CHAID algorithm (see statistical methods) reveals that the presence of gains on 6p or 9q and 20p are basic changes present in all subclones of tumours B and A, respectively. Gains of 7p or 7q are present in all tumours of case E and a gain of 8p is present in all tumours of case C. The existence of basic changes present in all tumours of the same patient could be valuable information to clinical follow-up and diagnosis of recurrences in order to search for this specific anomaly by FISH in urinary samples. On the other hand, it has been hypothesized that identical genetic alterations in later stages of tumour development could reflect the monoclonal occurrence of multiple tumours, as well as dominant overgrowth of malignant tumour cell clones (Hafner *et al*, 2002). In the present study, the most closely related tumours correspond to TaG2 from case E. Moreover, the presence of basic chromosome imbalances which discriminate among patients does not support this hypothesis, because all of the tumours from the same patient share an early and characteristic chromosome imbalance revealing a true monoclonal origin.

Our results provide new evidence of a clonal relationship among independent tumours of the same patient, and that this clonality is in some cases higher than or at least as high as that observed among different forms of the same tumour. Clonal origin of multifocal

tumours of the bladder and upper urinary tract would have a significant impact on the evaluation and design of effective treatments and the prevention of recurrence and progression to more invasive tumours.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by EPICUR-Red (FIS G03/174) from Spanish Government, and the Generalitat de Catalunya (CIRIT 2001SGR-00201).

E.P. was fellow supported by Institut Municipal d'Investigacions Mèdiques (IMIM). JC is a fellow of the Universitat Autònoma de Barcelona, and belongs to the research program EPICUR-Red. J.R. is fellow supported by Generalitat de Catalunya.

REFERENCES

- Dalbagni G, Ren ZP, Herr H, Cordon-Cardo C, Reuter V (2001) Genetic alterations in tp53 in recurrent urothelial cancer: a longitudinal study. *Clin Cancer Res* **7**: 2797-2801
- Duggan BJ, Gray SB, McKnight JJ, Watson CJ, Johnston SR, Williamson KE (2004) Oligoclonality in bladder cancer: the implication for molecular therapies. *J Urol* **171**: 419-425
- Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. (2004). *Tumours of the urinary system and male genital organs*. world health organization classification of tumours: Lyon.
- Fadl-Elmula I, Gorunova L, Mandahl N, Elfving P, Lundgren R, Mitelman F, Heim S (1999) Cytogenetic monoclonality in multifocal uroepithelial carcinomas: evidence of intraluminal tumour seeding. *Br J Cancer* **81**: 6-12
- Gisselsson D, Jonson T, Petersen A, Strombeck B, Dal Cin P, Hoglund M, Mitelman F, Mertens F, Mandahl N (2001) Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 12683-12688
- Hafner C, Knuechel R, Stoehr R, Hartmann A (2002) Clonality of multifocal urothelial carcinomas: 10 years of molecular genetic studies. *Int J Cancer* **101**: 1-6
- Harris AL, Neal DE (1992) Bladder cancer--field versus clonal origin. *N Engl J Med* **326**: 759-761
- Hartmann A, Schlake G, Zaak D, Hungerhuber E, Hofstetter A, Hofstaedter F, Knuechel R (2002) Occurrence of chromosome 9 and p53 alterations in multifocal dysplasia and carcinoma in situ of human urinary bladder. *Cancer Res* **62**: 809-818

- Kuukasjarvi T, Karhu R, Tanner M, Kahkonen M, Schaffer A, Nupponen N, Pennanen S, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Isola J (1997) Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer. *Cancer Res* **57**: 1597-1604
- Li M, Cannizzaro LA (1999) Identical clonal origin of synchronous and metachronous low-grade, noninvasive papillary transitional cell carcinomas of the urinary tract. *Hum Pathol* **30**: 1197-1200
- Louhelainen J, Wijkstrom H, Hemminki K (2000) Allelic losses demonstrate monoclonality of multifocal bladder tumors. *Int J Cancer* **87**: 522-527
- Prat E, Bernués M, Caballín MR, Egozcue J, Gelabert A, Miró R (2001) Detection of chromosomal imbalances in papillary bladder tumors by comparative genomic hybridization. *Urology* **57**: 986-992
- 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**: 1615-1621
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sidransky D, Frost P, Von Eschenbach A, Oyasa R, Preisinger AC, Vogelstein B (1992) Clonal origin bladder cancer. *N Engl J Med* **326**: 737-740
- 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**: 1025-1029
- Simon R, Eltze E, Schafer KL, Burger H, Semjonow A, Hertle L, Dockhorn-Dworniczak B, Terpe HJ, Bocker W (2001) Cytogenetic analysis of multifocal bladder cancer supports a monoclonal origin and intraepithelial spread of tumor

- cells. *Cancer Res* **61**: 355-362
- Takahashi T, Habuchi T, Kakehi Y, Mitsumori K, Akao T, Terachi T, Yoshida O (1998) Clonal and chronological genetic analysis of multifocal cancers of the bladder and upper urinary tract. *Cancer Res* **58**: 5835-5841
- Takahashi T, Kakehi Y, Mitsumori K, Akao T, Terachi T, Kato T, Ogawa O, Habuchi T (2001) Distinct microsatellite alterations in upper urinary tract tumors and subsequent bladder tumors. *J Urol* **165**: 672-677
- van Tilborg AA, de Vries A, de Bont M, Groenfeld LE, van der Kwast TH, Zwarthoff EC (2000) Molecular evolution of multiple recurrent cancers of the bladder. *Hum Mol Genet* **9**: 2973-2980
- Williams SV, Adams J, Coulter J, Summersgill BM, Shipley J, Knowles MA (2005) Assessment by M-FISH of karyotypic complexity and cytogenetic evolution in bladder cancer in vitro. *Genes Chromosomes Cancer* **43**: 315-328
- Yamamoto S, Romanenko A, Wei M, Masuda C, Zaparin W, Vinnichenko W, Voizianov A, Lee CC, Morimura K, Wanibuchi H, Tada M, Fukushima S (1999) Specific p53 gene mutations in urinary bladder epithelium after the Chernobyl accident. *Cancer Res* **59**: 3606-3609
- Yao A, Rubin H (1994) A critical test of the role of population density in producing transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 7712-7716

FIGURE LEGENDS

Figure 1. (a) Cytogenetic relationship between subclones of tumours A and B. Numbers indicate each sample analysed. (b) Cytogenetic relationship among different synchronous tumours from patients C, D and E. Patients and tumours are indicated by capital letters, and numbers indicate each tumour of the same patient.

Amplifications are in bold. (*) Chromosome regions which were gained in one sample and amplified in another sample. Expanding imbalances are inside circles.

Figure 2. Hierarchic cluster showing the similarity between the analysed samples.

Figure 3. Classification tree showing the imbalances which determine the different categories of the patients.

Figure 1

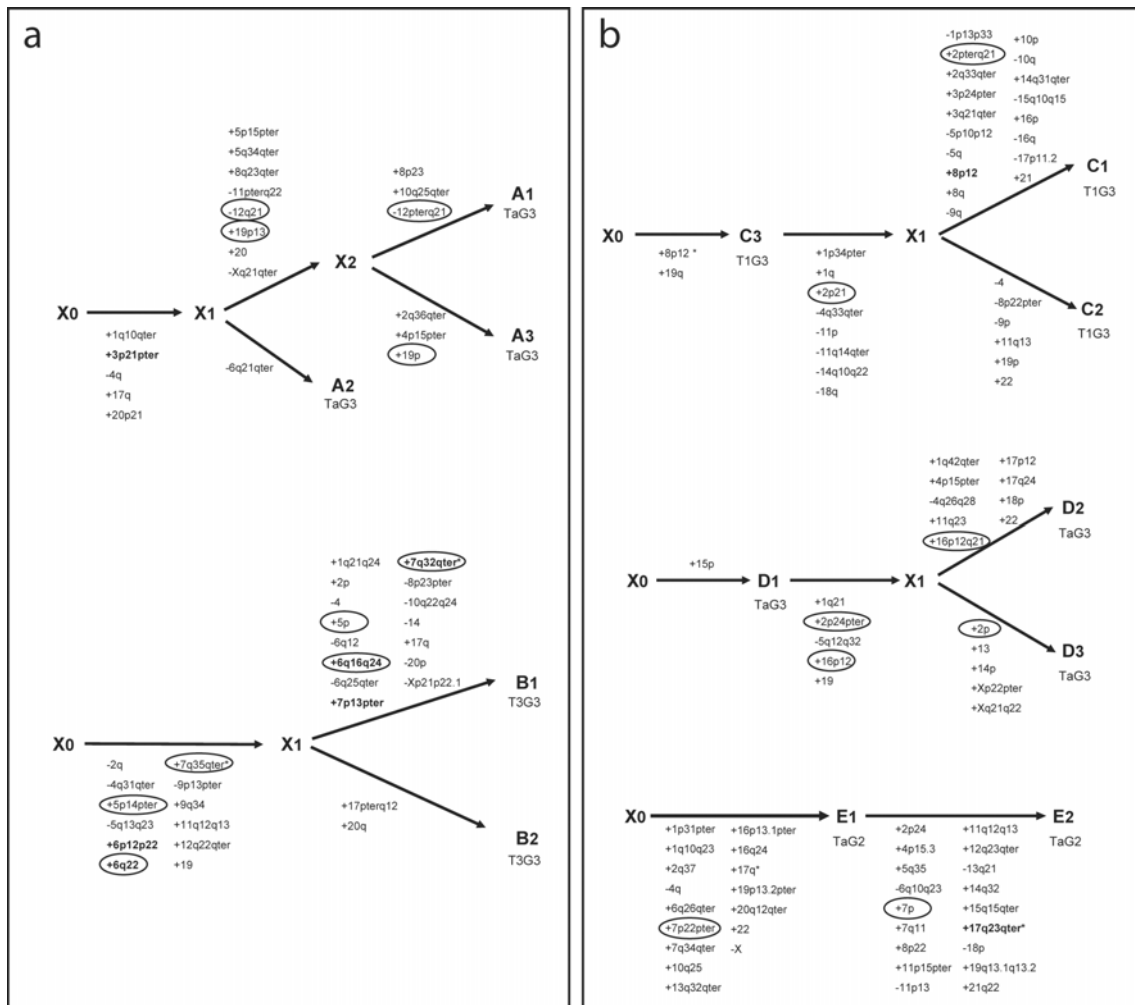


Figure 2

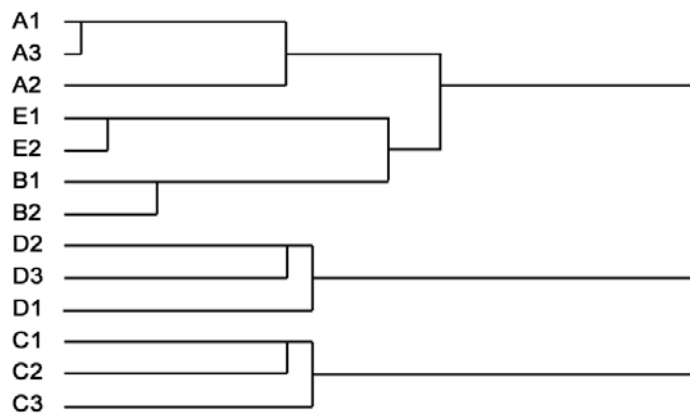
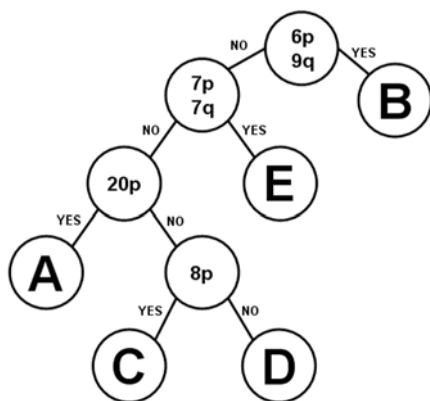


Figure 3



Treball- 5

Common pattern of unusual chromosome abnormalities in hereditary papillary renal carcinoma.

Prat E, Bernués M, del Rey J, Camps J, Ponsa I, Algaba F, Egozcue J, Caballín MR, Gelabert A, Miró R.

Cancer Genetics and Cytogenetics. (Acceptat Ref. MM-4801-05)

Index by Thomson-ISI Journal Citation Reports

ISI 2004 Impact Factor: 1.577

Common Pattern of Unusual Chromosome Abnormalities in Hereditary Papillary Renal Carcinoma

Esther Prat, Marta Bernués, Javier del Rey, Jordi Camps, Immaculada Ponsa, Ferran Algaba, Josep Egozcue, M^aRosa Caballín, Antoni Gelabert, and Rosa Miró

ABSTRACT: In this study we have summarized cytogenetic and comparative genomic hybridization (CGH) results, mutation analysis of the *MET* gene, and immunohistochemistry results of tumors from three patients of a same family affected by hereditary papillary renal carcinoma (HPRC). All of three patients showed a germline mutation in the tyrosine kinase domain of the *MET* proto-oncogene and developed bilateral and multiple papillary renal tumors. DNA mutation analysis showed an increase of dosage of the mutant allele in all cases but in tumors of one patient. Surprisingly, immunohistochemistry analysis revealed expression of *MET* protein only in tumors from the same patient, where it appeared a discrete reactivity.

Cytogenetic analyses revealed the presence of a trisomy or tetrasomy of chromosome 7 in all tumors analyzed. In addition to other chromosome alterations typically found in papillary renal carcinomas (PRC), we have detected a t(2;15)(q13;p11) in two different tumors from one patient (III-3). Moreover, the same pattern of autosomal trisomies (+7, +12, +13, +17) was detected by CGH analysis in two tumors of different patients. Our results confirm those from other authors suggesting that the genetic predisposition of HPRC might condition the acquisition of genomic alterations in specific chromosomal regions.

INTRODUCTION

Papillary renal carcinomas (PRC) of Type I are characterized cytogenetically by chromosomal trisomies/tetrasomies, most often including chromosomes 7 and 17, and the loss of chromosome Y. Additional 3,12,16 and 20 trisomies may appear in association with a more aggressive behavior of the tumor [1]. These common imbalances also have been detected by CGH, in addition to overrepresentation of 5q and losses of 1p, 4q, 6q, 9p, 13q, as well as losses of chromosomes X and Y [2,3]

Hereditary papillary renal carcinoma (HPRC) is a familial cancer syndrome characterized predominantly by Type I PRC. Renal tumors in these patients show an involvement of a common chromosome region, namely 7q31[4]. Common gain of chromosome 17 and complex chromosome imbalances have been reported in a CGH study of two HPRC families [5].

Germline and somatic mutations in the *MET* proto-oncogene (located at chromosome 7q31) have been identified in both hereditary and sporadic PRC[6,7]. The *MET* proto-oncogene encodes the tyrosine-kinase receptor for

hepatocyte growth factor/scatter factor. Mutations of this gene identified in HPRC activate the *MET*-receptor function, causing its constitutive activation and cell transformation [8]. The *MET* protein, barely detectable in tubular cells of the normal adult kidney, is overexpressed in a high percentage of PRC [9]. This suggests that *MET*-receptor expression is required for the development of these tumors. Jeffers *et al* [8], in biochemical and a biological assay also observed that tumorigenesis by *MET* is quantitatively related to its level of activation. Moreover, the existence of a non-random duplication of chromosome 7 bearing the mutated *MET* gene in HPRC, suggesting that this is necessary in tumorigenesis [9,10] has been demonstrated in the literature.

Herein is presented a summary of cytogenetic and CGH results, mutation analysis, and immunohistochemistry results of tumors from three patients of the same family affected by HPRC.

MATERIALS AND METHODS

Family history

Normal kidney and tumor tissue samples were obtained from three members of the same family, two brothers (III-3 and III-5) and a first cousin (III-17) affected by HPRC. The three patients presented multiple, bilateral PRC. Pedigree of the family, as well as cytogenetic characterization of tumors from two members (III-5 and III-17), was reported previously [4]. Soon thereafter Schmidt *et al.*[6] determined a germline mutation G3906A (V1238I) in exon 19 of the tyrosine-kinase domain of the *MET* proto-oncogene in this family.

Tumor Samples

All tumors analyzed were macroscopically well differentiated. Each specimen was divided in two parts, after surgery and assessment of a pathologist, one for cytogenetic analysis and the other one for CGH and DNA mutation analysis.

Cytogenetic analysis

Two primary tumors from the third member of this family (III-3), as well as normal kidney tissue, were obtained prior to any radiation treatment or chemotherapy. Cell cultures and chromosome analysis were performed as previously described.[11] The International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1995)[12] was used to describe normal kidney and tumor karyotypes.

Comparative Genomic Hybridization

Two tumors of patient III-3, one of patient III-5 and five of patient III-17 were analyzed. CGH analysis was performed according to the method described by Prat *et al.*[13].

Tumor mutation analysis

Tumor DNA samples from patients were analyzed for mutation at exon 19 of the tyrosine-kinase domain of *MET* proto-oncogene using a

Polymerase Chain Reaction (PCR). Primer sequences are available from the authors. Reactions were performed in a final volume of 25 μ l, containing 100ng of genomic DNA, 0.5 μ M of each primer, 3mM MgCl₂, 160 μ M dNTP mix, 1XPCR Taq polymerase buffer and 1U of Taq polymerase. PCR conditions were as follows: one cycle of 95°C for 7 min; 40 cycles each of 95°C for 30s, 65°C for 45s, 72°C for 45 s and a final cycle of 72°C for 7 min. Each reaction was repeated three times in different experiments. PCR products were directly sequenced after being purified using an ABI373 a Stretch sequencer. Automatic sequences (forward and reverse) were performed.

Immunohistochemistry

Normal kidney and tumor samples were fixed in 10% buffered formalin, paraffin-embedded, sectioned at 4 μ m, mounted on 3-aminopropyltriethoxysilane-coated slides, and dried overnight. In each case, all available haematoxylin and eosin-stained sections were reviewed, and a representative block was chosen for further studies.

Each specimen was subjected to a standard immunohistochemistry methodology. Epitope retrieval was allowed by dipping tumor-sectioned slides in 0.21% citric acid in PBS in a pressure cooker.

Specimens were incubated with C-12 Anti MET (Santa Cruz), rinsed with PBS and incubated with a biotin-conjugated goat antirabbit IgG. After washing with PBS, sections were incubated with peroxide followed by an antibiotin. Slides were washed with PBS, exposed to DAB and contrasted with HE.

c-MET expression was identified by a brown coloration in the cytoplasm and/or membrane of cells in select fields with optimum staining quality in the sections.

Table 1. Summary of results obtained by G-banding karyotype and CGH.

Case n°	Tumor	G-Banding karyotype	CGH
III-3	L1	49-50,-X[2],-Y[22],t(2;14)(q37;q22)[3],+7x2[22],t(8;19)(q13;q13.3)[3],+12[22],+13[22],+17[22],t(15;17)(p11;q21)[6],t(2;15)(q13;p11)[5][cp22]	rev ish enh (7,12,13,17), dim (X,Y)
	L2	46-50,X,-Y[20],+7x2[18],+12[20],+13[20],t(2;15)(q13;p11)[9],+17[18][cp20]	rev ish enh (7,12,13,17), dim (X,Y)
III-5*	L1	43-47,X,-Y[7],+7[4],del(7)(p13;p14)[3],+16[5][cp8]	rev ish enh (7,16), dim (Y)
	L2	47-52,X,-Y[10],t(2;15)(p13;q15)[3],+7[10],+12[10],+17[7][cp10]	ND
III-17*	L1	48,XY,+7,+17[10]	rev ish enh (7,17)
	L2	45-47,XY,del(3)(q21q23)[2], t(7;7)(q35;q21)[11],t(13;21)(q12;q22)[4], der(15)t(15;?)(q24;?)[4],t(17;20)(p11.2;p12)[4][cp11]	rev ish enh (7q22qter)
	L3	47-48,X,-Y[16],+7[16],+12[16],+17[11],+20[7][cp16]	rev ish enh (7,12, 17), dim (Y)
	R4	45-48,X,-Y[14],+7[13],+12[12],+del(12)(p11.2)[2],+17[12],+20[3],-21[5][cp14]	rev ish enh (7,12,13,17), dim (Y)
	R5	ND	rev ish enh (1p31q23.7, 17), dim (Y)

(*) G-banding karyotypes of tumors of these cases have been previously published. [4]

ND: Not done.L:Left.R:Right.

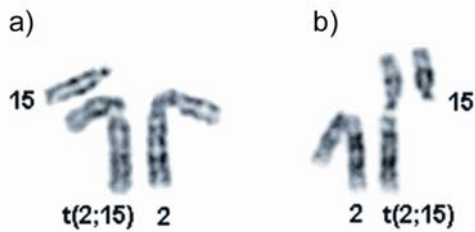


Figure 1 Partial karyotypes illustrating a structural chromosome aberration $t(2;15)$ detected in two macroscopically distinct tumors of the same patient (III-3). a) Tumor L1 b) Tumor L2. Normal chromosomes 2 and 15 are also showed in the figure.

RESULTS

Cytogenetic and CGH data of the primary renal tumors and normal kidney are summarized in Table 1. G-banding analysis revealed that all tumors were trisomic (patients III-5 and III-17) or tetrasomic (patient III-3) for chromosome 7. Other alterations typically found in PRC were also observed.

Interestingly, the same imbalanced translocation $t(2;15)(q13;p11)$ was detected in two different tumors (L1 and L2) of patient III-3 (Figure 1). A translocation $t(2;15)$ with different breakpoints was also detected in three cells from a tumor (L2) in patient III-5.

CGH analysis showed a gain of chromosome 7 in all tumors analyzed except for the tumor carrying a $t(7;7)$ which revealed a gain of chromosome 7q. Gains of chromosomes 12 and 16, and losses of chromosome Y, typically observed in PRC, and were also detected. A normal karyotype was observed in normal kidneys from all three patients.

Overall, our results revealed a close relationship between cytogenetic and CGH data in all the tumors analyzed. Some discrepancies were observed in those tumors where some changes affecting minority cell populations were observed by G-banding analysis but not by CGH. On the other hand, a gain of chromosome 13 detected by CGH in tumor R4 of patient III-17 was not observed by G-banding analysis.

Schmidt et al. [6] described a *c-MET* germline mutation in the three patients, which was a G→A transition at exon 19 resulting in a Valine-to-Isoleucine change at codon 1238 of the *MET* gene. DNA sequence analysis of tumors from these patients revealed an increase of dosage of the mutated nucleotide (Adenine) in relation to the wild-type one (Guanine) in patients III-5 and III-17. This imbalance was not detected in tumor cells from patient III-3 (Figure 2A-D).

All tumors from patients III-5 and III-17 were negative for cytoplasmatic and membranous c-MET staining. A discrete c-MET expression

(cytoplasmatic) was noted in tumors from patient III-3 when compared to normal kidney c-MET-positive immunostaining (Figure 2E-H).

DISCUSSION

The V1238I germline mutation in the tyrosine-kinase domain of the *MET* proto-oncogene is predisposed to HPRC in the family presented here. This mutation does not produce a change of the amino-acid class but rather probably affects the kinase domain because it is very close to a phosphorylation site of this protein, at codon 1235. The mutation described here is predicted to destabilize the self-inhibiting conformation of MET protein in an indirect way, promoting conformational transition to an active MET kinase [14]. An identical mutation had been recently described in another Spanish family and a founder effect can not be discarded [15].

Cytogenetic and CGH results are in agreement with those published in the literature where trisomy 7 and/or gain of chromosome 7 are related to PRC [1].

DNA mutation results, as well, support the fact that a non-random duplication of the *MET* mutant allele is involved in HPRC [9,10]. Immunohistochemistry analysis, however, showed contradictory results in relation to those described previously, where over-expression of *MET* proto-oncogene was related to hereditary and sporadic PRC [9]. To investigate this discrepancy, the epitope recognized by C-12 Anti MET was analyzed. We observed that this protein region is quite close to the mutation site in this family. It is probable that mutation V1238I produces a structural MET protein change that leads to a loss of this epitope. This could explain why tumors from patient III-3, which had a similar dosage of mutant and wild-type alleles, presented a discrete protein expression, similar to that in normal kidney tissue (Figure 2E-H). And, in tumors from patients III-5 and III-17, where the predominant allele was the mutated one, no expression of MET protein was observed. These results, however, do not discard an over-expression of the *MET* proto-oncogene. Taking into account that C-12 Anti MET is able to detect the normal protein in control kidney tissue, it could be suggested that the mutated protein predominates in the tumors. The most striking result of the present work corresponds, nevertheless, to the presence of an identical chromosome translocation $t(2;15)(q13;p11)$ in two tumors of the same patient (Fig 1). This type of rearrangement is uncommon in papillary renal tumors. It was present in a minority cell population in both tumors and, consequently, went unnoticed by CGH.

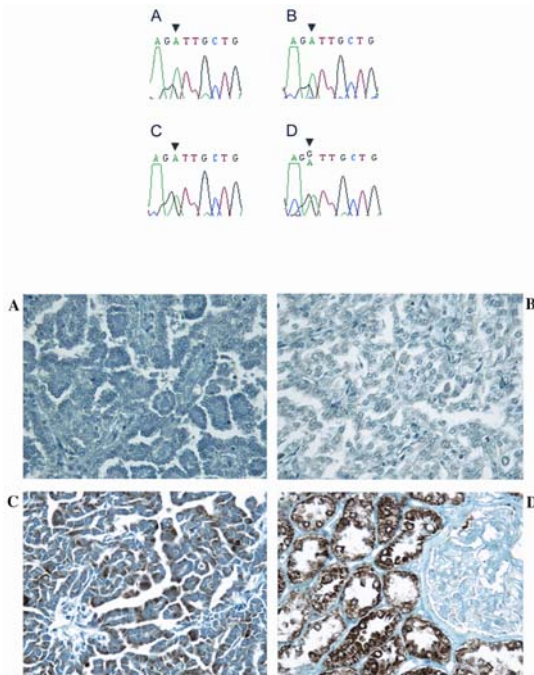


Figure 2 A-D) Sequences analysis of MET showing the germline mutation, G→A transition. Mutant nucleotide is indicated by arrows. A, B) Tumor DNA from patients III-5 and III-17 respectively shows a higher intensity of the mutant nucleotide compared with the wild-type nucleotide. C) Tumor DNA from patient III-3 shows the mutation but no nucleotide imbalances. D) Lymphocyte DNA from patient III-3 shows the germline mutation. E-H) c-MET immunostaining. E, F) Negative c-MET immunostaining in renal tumors from patients III-5 and III-17 respectively, G) Discrete cytoplasmic staining of c-MET in one tumor from patient III-3. H) Cytoplasmic staining in tubular cells of a normal kidney tissue.

To our knowledge, the presence of the same structural chromosomal aberration in two tumors of the same HPRC patient has not been described before. Interestingly, the presence of another translocation, also involving chromosomes 2 and 15 t(2;15)(p13;q15), has been detected in patient III-5.

Moreover, the same pattern of autosomal trisomies (+7, +12, +13, +17) was detected by CGH analysis in two tumors of patient III-3 and in one tumor of patient III-17. Apart from trisomies 7, 12 and 16, the other imbalances, such as trisomy 13, shared by these cases, are uncommon in papillary renal tumors. The presence of identical structural chromosome aberrations in macroscopically distinct tumors of the same patient could be indicative of a common clonal origin of the tumors. Nonetheless multiple bilateral renal tumors of hereditary PRC were shown to arise as different clones in the renal parenchyma [10]. Similar progressional changes due to a combination of inherent patient susceptibilities and identical exposures could

again be invoked as an alternative and probably less controversial explanation.

Interestingly, in a CGH study of HPRC from two different families, a closely related pattern of genetic alterations in tumors of siblings was also detected [5]. Our results are in agreement with those from these authors suggesting that the genetic predisposition of HPRC might condition the acquisition of genomic alterations at specific chromosomal regions. Alternatively, selection of cells harboring specific chromosome imbalances may have already occurred.

A common pattern of chromosome abnormalities has also been observed in other tumor types, both family-related and sporadically synchronous. In this sense, the presence of identical structural chromosome aberrations in macroscopically distinct tumors of the same patient has been reported in two previous classical cytogenetic works in synchronous colorectal lesions [16,17]. In both cases, a strong karyotypic similarity was observed in independent synchronous lesions arising in the same patient [16,17]. On the other hand, the analysis of 45 adenomas and 2 carcinomas from six family-related adenomatous polyposis cancer (FAP) patients by CGH [18] showed a strong genetic relationship among adenomas and carcinomas arising in a given patient. In all cases, recurrent CGH changes were detected in at least three adenomas, suggesting the existence of genetic evolutive pathways in which a preferential order in the occurrence of chromosome losses and gains was observed.

A common pattern of chromosome abnormalities has also been reported in a cytogenetic study of clear cell renal carcinomas from two brothers [19]. According to the authors, the presence of the same numerical chromosome abnormalities in the tumors, as well as the presence of trisomy 3 in normal kidney tissue of these patients could be due to a common genetic basis.

In all cases described above, a strong karyotypic similarity has been observed in independent synchronous lesions arising both in the same and different patients.

These karyotypic similarities between macroscopically distinct lesions in the same organ could be explained as a result of a clonal expansion or intra-renal metastasis. This possibility, however, is valid in sporadic synchronous tumors but is difficult to assume in family-related cancers, such as FAP or HPRC, where multiple tumors with a set of common genetic alterations arise simultaneously.

On the basis of our results we can conclude that a particular genetic background together with environmental conditions could restrain the genetic evolution patterns of both familial and

sporadic synchronous tumors. And secondly, that the genetic predisposition of HPRC might condition the acquisition of genomic alterations at specific chromosomal regions.

Even with the advances in cancer research, the most intriguing question still refers to how a common genetic pattern can arise in some family-related cancers.

REFERENCES

- [1] Kovacs G. Molecular cytogenetics of renal cell tumors. *Adv Cancer Res* 1993; 62:89-124.
- [2] Jiang F, Richter J, Schraml P, et al. Chromosomal imbalances in papillary renal cell carcinoma: genetic differences between histological subtypes. *Am J Pathol* 1998; 153:1467-1473.
- [3] Rigola MA, Casadevall C, Bernues M, et al. Analysis of kidney tumors by comparative genomic hybridization and conventional cytogenetics. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 137:49-53.
- [4] Bernues M, Casadevall C, Miro R, et al. Cytogenetic characterization of a familial papillary renal cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; 84:123-127.
- [5] Bentz M, Bergerheim US, Li C, et al. Chromosome imbalances in papillary renal cell carcinoma and first cytogenetic data of familial cases analyzed by comparative genomic hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1996; 75:17-21.
- [6] Schmidt L, Duh FM, Chen F, et al. Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the *MET* proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet* 1997; 16:68-73.
- [7] Schmidt L, Junker K, Nakaigawa N, et al. Novel mutations of the *MET* proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Oncogene* 1999; 18:2343-2350.
- [8] Jeffers M, Schmidt L, Nakaigawa N, et al. Activating mutations for the met tyrosine kinase receptor in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:11445-11450.
- [9] Fischer J, Palmedo G, von Knobloch R, et al. Duplication and overexpression of the mutant allele of the *MET* proto-oncogene in multiple hereditary papillary renal cell tumours. *Oncogene* 1998; 17:733-739.
- [10] Zhuang Z, Park WS, Pack S, et al. Trisomy 7-harboring non-random duplication of the mutant *MET* allele in hereditary papillary renal carcinomas. *Nat Genet* 1998; 20:66-69.
- [11] Berrozpe G, Caballin MR, Miro R, Gelabert A, Egozcue J. Centromere splitting in bladder cancer. *Hum Genet* 1990; 85:184-186.
- [12] Mitelman F. *ISCN (1995): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. 1995.
- [13] Prat E, Bernues M, Caballin MR, Egozcue J, Gelabert A, Miro R. Detection of chromosomal imbalances in papillary bladder tumors by comparative genomic hybridization. *Urology* 2001; 57:986-992.
- [14] Miller M, Ginalski K, Lesyng B, Nakaigawa N, Schmidt L, Zbar B. Structural basis of oncogenic activation caused by point mutations in the kinase domain of the *MET* proto-oncogene: modeling studies. *Proteins* 2001; 44:32-43.
- [15] Schmidt LS, Nickerson ML, Angeloni D, et al. Early onset hereditary papillary renal carcinoma: germline missense mutations in the tyrosine kinase domain of the *MET* proto-oncogene. *J Urol* 2004; 172:1256-1261.
- [16] Bardi G, Parada LA, Bomme L, et al. Cytogenetic comparisons of synchronous carcinomas and polyps in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 1997; 76:765-769.
- [17] Bomme L, Bardi G, Pandis N, Fenger C, Kronborg O, Heim S. Cytogenetic analysis of colorectal adenomas: karyotypic comparisons of synchronous tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 106:66-71.
- [18] Tarafa G, Prat E, Risques RA, et al. Common genetic evolutionary pathways in familial adenomatous polyposis tumors. *Cancer Res* 2003; 63:5731-5737.
- [19] De Vita R, Eleuteri P, Pomponi D, et al. Unusual chromosome patterns of renal cell carcinomas common to two brothers. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 1999; 112:149-155.

Treball- 6

Common genetic evolutionary pathways in familial adenomatous polyposis tumors.

Tarafa G, Prat E, Risques RA, González S, Camps J, Grau M, Guinó E, Moreno V, Esteller M, Herman JG, Germà JR, Miró R, Peinado MA, Capellà G.

Cancer Research 2003 Sep 15;63(18):5731-7.

PMID: 14522893

Index by Thomson-ISI Journal Citation Reports

ISI 2004 Impact Factor: 7.690

Common Genetic Evolutionary Pathways in Familial Adenomatous Polyposis Tumors¹

Gemma Tarafa,² Esther Prat,² Rosa-Ana Risques, Sara González, Jordi Camps, Mónica Grau, Elisabeth Guinó, Víctor Moreno, Manel Esteller, James G. Herman, Josep-Ramon Germà, Rosa Miró, Miguel Angel Peinado, and Gabriel Capella³

Laboratori de Recerca Translacional [G. T., S. G., M. G., J.-R. G., G. C.] and Servei d'Epidemiologia del Càncer [E. G., V. M.], Institut Català d'Oncologia, Barcelona 08907, Spain; Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Spain [E. P., J. C., R. M.]; Cancer Epigenetics Laboratory, Molecular Pathology Program, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Majadahonda 28220, Spain [M. E.]; The Johns Hopkins Oncology Center, Baltimore, Maryland 21231 [M. E., J. G. H.]; and Departament d'Oncologia Molecular, Institut de Recerca Oncològica, Barcelona 08907 [R.-A. R., M. A. P.]

ABSTRACT

Cancer cells progress through the accumulation of genetic alterations. Familial adenomatous polyposis (FAP) tumors provide an excellent model to unravel the molecular steps underlying malignant transformation. Global genomic damage was assessed in 56 adenomas and 3 carcinomas from six FAP patients and compared with that of sporadic adenomas and carcinomas. Evolutionary trees were traced after application of maximum likelihood clustering and split decomposition methods to the analysis of comprehensive genetic profiles generated by diverse molecular approaches: arbitrarily primed PCR, comparative genomic hybridization, and flow cytometry. Overall, genomic damage as assessed by arbitrarily primed PCR was lower in familial adenomas than in sporadic adenomas and carcinomas. Comparative genomic hybridization data also show a low number of alterations in the majority of FAP adenomas. Tumors of the same patient were likely to share specific genetic alterations and may be grouped into one or two clusters. Putative common pathways were also identified, which included tumors of up to three different patients. According to our data, FAP tumors accumulate specific genetic alterations and in a preferred order that is characteristic of each individual. Moreover, the particular genetic background and environmental conditions of a FAP patient restrain the molecular evolution portrait of synchronous tumors.

INTRODUCTION

The complexity and heterogeneity of the molecular processes driving cell transformation preclude the outline of progression models beyond theoretical postulates of limited practical application. Hereditary nonpolyposis colorectal cancers may be an exception, displaying very specific clinicopathological and molecular profiles, including clinical outcome. In this case, the evolutive driving force is the impairment of the DNA mismatch repair machinery, resulting in a specific mutator phenotype denoted by ubiquitous microsatellite instability (1). FAP⁴ is a hereditary syndrome characterized by the presence of hundreds to thousands of adenomatous lesions in the colon at early ages that eventually transform into malignant adenocarcinomas. It is well known that the predisposition lays, in the majority of cases, in the presence of a defective *APC* gene (2).

Recently, alterations of the MutY homolog (MYH) have been associated with some classical FAP cases after a recessive pattern (3). However, the genetic steps underlying the malignant transformation have been only partially elucidated.

Chromosomal instability has been blamed as the driving force in this type of tumor, but unlike in cancers with microsatellite instability, no characteristic fingerprints are observed (4). In addition to *APC*, the genetic background and environmental factors may condition the evolutive pathway of these tumors. In fact, a recent study has demonstrated that the same defective *APC* gene in two strains of mice results in very different penetrance of the disease (5), depicting the importance of modifying factors.

The study of cancer genomic disruption profiles may provide with clues to unveil the driving forces of tumor progression in FAP patients. Because of the heterogeneous nature of the alterations observed, comprehensive approaches are required to fully characterize the molecular patterns. We have used AP-PCR, which provides a comprehensive and unbiased estimation of the genomic damage (6), jointly with CGH and flow cytometry. The molecular profiles and the type and degree of genetic damage of 56 adenomas and 3 carcinomas from six FAP patients have been assessed. Specific genetic alterations in the *APC* gene and neighboring regions have also been investigated. Molecular data have been analyzed with different statistical methods, including phylogenetic analyses. These approaches can shed light into the relationships between distinct adenomas, and they can be used to identify characteristic pathways of genetic evolution.

MATERIALS AND METHODS

Material

Fifty-six adenomas and 3 colorectal carcinomas from five classical FAP cases (defined by the presence of more than 100 colonic adenomas) and one attenuated FAP were included. Six to 12 adenomas per case were analyzed. Main characteristics of FAP patients and tumors are shown in Table 1. Age at diagnosis was high because most patients were not following screening programs, and five of six cases were *de novo*. In all cases, microscopically normal mucosa was available and analyzed concomitantly. Adenomas were collected from well-separated regions including distal, transverse, and right colon, although the precise location of each collected adenoma was not recorded. Cases were coded with letters, and adenomas were numbered consecutively after the letter code for a given case. "T" was used for carcinomas. In addition, for AP-PCR analysis, 10 paired normal mucosa-adenoma-sporadic carcinoma samples and 113 sporadic paired normal tumors-colorectal samples were studied. In all cases, tumor cell enrichment ensuring that 80% of all nuclei analyzed were tumoral was performed by manual microdissection. DNA was extracted from frozen sections by the phenol/chloroform method.

Methods

APC Gene Alterations

Mutational Analysis. Mutations at exons 1–12, 14, and the first 5.260 bp of exon 15 of the *APC* gene, covering 90% of the coding region and 95% of

Received 6/24/02; revised 6/16/03; accepted 7/8/03.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ Supported by grants from Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, Fondo de Investigación Sanitaria, and Fundació La Marató de TV3. G. T. is a fellow of the Ministerio de Ciencia y Tecnología. E. P. is a fellow of Institut Municipal d'Investigacions Mèdiques. R.-A. R. is a fellow of Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica. J. C. is a fellow of Universitat Autònoma de Barcelona.

² G. T. and E. P. contributed equally to this study.

³ To whom requests for reprints should be addressed, at Laboratori de Recerca Translacional, Institut Català d'Oncologia, Av. Gran Via s/n, km 2,7 08907 L'Hospitalet, Barcelona, Spain. Phone: 34-93-260-7952; Fax: 34-93-260-7466; E-mail: gcapella@ico.scs.es.

⁴ The abbreviations used are: FAP, familial adenomatous polyposis; AP-PCR, arbitrarily primed PCR; CGH, comparative genomic hybridization; LOH, loss of heterozygosity; APC, adenomatous polyposis coli; GDF, genomic damage fraction.

Table 1 Clinical and molecular characteristics of FAP patients and tumors

Characteristics	Case A	Case B	Case C	Case D	Case E	Case F
Age	41	38	50	60	48	67
Sex	Female	Male	Female	Male	Female	Male
Adenomas present	120	223	81	196	230	106
Adenomas analyzed	6	7	12	10	9	12
Size (cm)	0.4–0.55	0.6–0.8	0.4–0.45	0.4–0.5	0.35–0.4	0.25–0.4
Carcinoma	Yes	Yes	No	No	Yes	No
APC gene status						
Germline mutation	Deletion (4 nt) at codon 1551	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
LOH	1/6 adenomas and 1/1 carcinoma	No	No	No	No	No
Hypermethylation	No	No	No	No	No	No
Flow cytometry	Diploid	Hypodiploid	Diploid	Diploid	Diploid	Hypodiploid
AP-PCR						
Quantitation of genomic damage						
GDF adenomas	0.07–0.09	0.08–0.14	0.06–0.09	0.09–0.12	0.06–0.11	0.06–0.12
GDF carcinomas	0.155	0.03			0.23	
Phylogenetic assessment						
Subfamilies within the case	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes
Putative common ancestor	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes
Pathways	I	IV	III, IV	III	II, III	II
CGH						
Adenomas with alterations	6/6	2/7	6/8	5/6	6/8	8/10
Range of alterations	2–3	0–8	0–6	0–4	0–5	0–20
Putative common ancestor	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes

reported mutations in classical, attenuated, and late onset FAP, were analyzed by single-strand conformational polymorphism using fluorescein-labeled primers described previously (7) and, more recently, direct sequencing of the PCR products. In our experience, we have detected mutations, mainly small deletions, in 43 of 92 Spanish classical FAP families analyzed (47%). No attempt has been made to detect mutations at the 3' end of the gene or gross deletions. Samples were processed in the ALFexpress DNA Sequencer and analyzed with Fragment Manager software (Pharmacia Biotech). Whenever an abnormal single-strand conformational polymorphism pattern was evidenced, sequencing was performed.

LOH and Haplotype of the APC Locus. Two intragenic polymorphisms (nt 1458, *RsaI*; *SspI* at the 3' untranslated region) and two neighboring microsatellite markers (D5S299, D5S318) were used to perform haplotype analyses and, when comparing tumor and normal tissues, to analyze LOH at the APC locus. PCR products were labeled with $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP and electrophoresed on 6% acrylamide/7 M urea sequencing gels.

Methylation-specific PCR. DNA methylation patterns in the CpG islands of the APC gene promoters 1 and 1B spanning 7 and 6 CpGs, respectively, were determined as described (8). Placental DNA treated *in vitro* with Sss I methyltransferase was used as a positive control for methylated alleles. DNA from normal lymphocytes was used as negative control.

Detection of Genetic Alterations by AP-PCR

The AP-PCR is a PCR-based DNA fingerprinting technique in which a single arbitrarily chosen primer is used to coamplify multiple and independent sequences by low-stringency conditions during the first cycles. Competition between these annealing events results in the reproducible and quantitative amplification of multiple bands. AP-PCR was used in our study because it produces fingerprints (of tagged bands) of moderate complexity that can be compared easily.

Primer Selection and Band Analysis. Three different AP-PCR experimental conditions (with a single primer or sets of primers) were selected based on pattern reproducibility and readability (6, 9). The primers used were: 331DB2, 5'-ACAGATCTGAAGGGTGAAATATTCTCC-3'; Blue, 5'-CCG-AATTCGCAAAGCTCTGA-3'; D12S77a, 5'-GAGGGCAACAACAGT-GAA-3'; D12S77b, 5'-CTTTTTTTTCTCCCCACTC-3'. Assay conditions were performed as described previously (for primers 331DB2 and D12S77, see Ref. 6; for primer Blue, see Ref. 9). All samples included were analyzed in duplicate. Films were scanned (Epson GT8500 with transparency unit). Intensity of bands was quantified using Phoretix 1D Advanced version 3.0 (Non-linear Dynamics, Newcastle upon Tyne, United Kingdom). Absolute values were corrected for background signal and interexperiment variability. A total of 122 different bands, informative for all cases, were analyzed.

Definition of Changes of Intensity. To define a significant change in intensity when comparing tumor and normal tissues, intra-assay reproducibility was assessed. Four distinct AP-PCR reactions of a given paired tumor-normal DNA sample were performed in quadruplicate. The mean and SD of the intensity of the bands were calculated. A clear relationship was observed between band intensity and SD, more intense bands showing the highest SD. Therefore, a change of intensity was considered significant when the difference was above the 95% confidence interval in regard to a regression constant, depending on band intensity and calculated in reproducibility experiments (data not shown). Alteration status of every AP-PCR-informative band in the normal-tumor paired tissues was scored as 0 (no difference), +1 (gain in tumor), and -1 (loss in tumor).

Quantitation of Genomic Damage. An index estimating the overall degree of genomic damage was calculated. The gains fraction is the sum of positive changes (gain in tumor) divided by the total number of informative bands, and the loss fraction is the sum of negative changes (loss in tumor) divided by the total number of informative bands (7). Finally, the GDF was calculated as the sum of gains fraction and loss fraction.

Chromosomal Localization. Chromosome assignment and localization of given bands was performed following procedures described previously (9). For chromosome assignment, the monochromosome human/rodent hybrid (National Institutes of General Medical Sciences mapping panel 2; Coriell Institute for Medical Research, Camden, NJ) was used. A more refined subchromosomal assignment was achieved after using the Stanford G3 Radiation hybrid panel (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL).

CGH

The technique used has been described previously (9). Slides were analyzed using Cytovision Ultra workstation (Applied Imaging, Sunderland, United Kingdom) and Quips Smart Capture Software from Vysis (Downers Grove, IL). Ratio values above 1.20 and below 0.80 were considered to represent chromosomal gains and losses, respectively. A high-level DNA amplification was considered when the fluorescence ratio values exceeded 1.5 and, in addition, a distinct band-like hybridization signal of the tumor DNA was seen. Negative control experiments were performed using differentially labeled male *versus* male DNA and female *versus* female DNA. In addition, control experiments in which the Red-dUTP and Green-dUTP labels were interchanged between normal and tumor were also performed. CGH analyses were performed blindly regarding case ascription, and tumors of the same patient were not analyzed consecutively. Chromosomal regions 1pter, 16p, and 19 were excluded from the analyses.

DNA Flow Cytometry

Flow cytometry was performed from OCT-embedded fresh frozen tissue as described previously (10). Normal mucosa was used as external control, showing a mean coefficient of variation (of the diploid G_0 - G_1 peaks) of 3.43 ± 0.39 . Aneuploidy was considered when the DNA content was above 1.1 (hyperdiploidy) or below 0.9 (hypodiploidy). Tumors with a DNA content between 1.1 and 1.3 were classified as near-diploid.

Statistical Analysis

All values are exposed as mean \pm SD. Statistical differences between variables (adenoma *versus* carcinoma) were analyzed with unpaired *t* test or ANOVA, as appropriate. Either AP-PCR or DNA copy number as assessed by CGH were scored as 0 (no change), +1 (gains), or -1 (losses). Distance matrix was used to study similarity between every two adenomas. Values near 1 reveal a close relationship. Factor analyses were used to study similarity when all adenomas were considered. Both analyses were performed with SPSS software. Phylogenetic trees were assessed using continuous character maximum likelihood clustering methods from the PHYLIP software (PHYLogenic Inference Package) version 3.5c (provided by J. Felsenstein, Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA).⁵ Tree drawing software (Treeview, version 1.6.1) was used to graphically display PHYLIP-generated data. Real evolutionary data often contain a number of different and, sometimes, conflicting signals that do not always support a unique tree. Therefore, a split-decomposition method implemented by Splitstree software version 2⁶ was also used. In this case, less ideal data are not forced into a tree. Therefore, the software gives rise to a tree-like network that can be interpreted as possible evidence for different and conflicting phylogenies. Finally, changes of intensity in paired tumor-normal samples were analyzed with the Scanalyze/TreeView utilities (10). Whenever these programs clustered adenomas in different categories, a general logarithm method was used to define those bands characteristic of each group (those showing *P*s higher than 1.96).

RESULTS

APC Gene Characterization of Patients and Tumors

We have detected an *APC* germline mutation in one of the six patients studied (Table 1). LOH at the *APC* locus was only detected in 1 of the 56 adenomas and in 1 of the carcinomas, both arising in the same patient. No promoter hypermethylation was detected. No mutation in the mutation cluster region of the *APC* gene was detected in the three carcinomas analyzed.

Chromosomal and Subchromosomal Alterations: Number and Profiles

The average GDF of the 56 FAP adenomas, as determined by AP-PCR fingerprinting, was 0.095 ± 0.02 (range, 0.073–0.1147; Table 1). There were no differences between adenomas when grouped by patient. These values were lower than that observed in sporadic adenomas (GDF, 0.131 ± 0.02 ; $P = 0.05$; Fig. 1A). This difference was more striking when adenomas were compared with carcinomas (GDF, 0.18 ± 0.11 ; $P = 0.05$; Fig. 1B).

Both in adenomas and carcinomas, gains and losses were found at similar rates. Chromosomal assignment was possible in 49% of the 122 AP-PCR bands, being 70% of the chromosomes represented (1–12, 14, 17, 18, X). In adenomas, a clear trend to loss of chromosomes X and 3 was observed.

CGH was performed in 47 (45 adenomas and 2 carcinomas) of 59

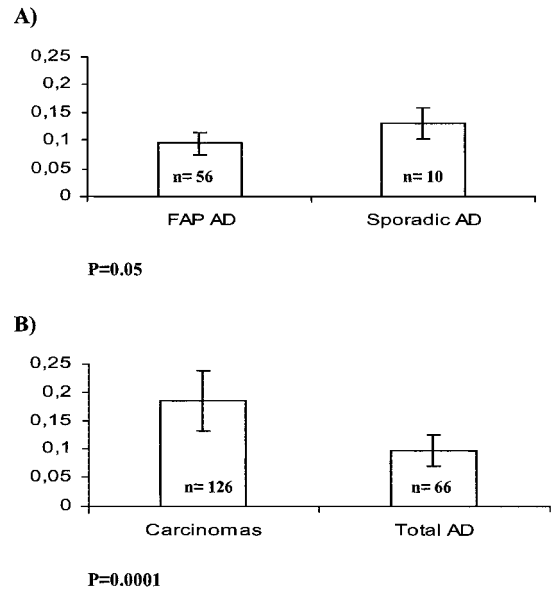


Fig. 1. Quantitation of genomic damage, as assessed by AP-PCR, in adenomas and carcinomas. A, comparison of FAP *versus* sporadic adenomas (AD). B, comparison of GDF of carcinomas *versus* all AD.

samples. There were, on average, 2.5 alterations per adenoma (range, 0–20): 1.8 gains and 0.6 losses (Table 1). The majority of adenomas showed a low number of alterations (range, 1–5), and in 12 cases, no imbalances were detected (Table 2). The two FAP carcinomas analyzed by CGH (AT and ET) showed two and six chromosome abnormalities, respectively. The most frequent chromosome imbalances were gains of chromosome Xp (9 of 47 tumors), 9q34 (9 of 47 tumors), and 22 (6 of 47 tumors; Table 2). The more prevalent losses involved the whole chromosome X (12 of 47 tumors), whereas gain of this chromosome was detected in six tumors. Recurrent gains on 4p16, 10q, and 12q as well as losses on Xq and 18q were also present in two or more adenomas of distinct cases (Table 2).

Relationships between Adenomas

Adenomas Display Common Genetic Features That Are Distinctive of Every FAP Patient. CGH showed a strong genetic relationship among adenomas and carcinomas arising in a given FAP patient. In all cases, recurrent CGH changes can be detected in at least three adenomas (Fig. 2). In line with this observation, DNA content analysis also showed that adenomas arising in the same patient displayed the same diploid or hypodiploid (DNA content, <0.9) pattern (Table 1). However, factorial analyses of raw data of AP-PCR fingerprints did not provide relevant data. Several bands showed distinct patterns in different individuals. Because of the polymorphic display of these bands, tumors and paired mucosa of a given patient always clustered together.

Genetic Heterogeneity in Adenomas of the Same FAP Patient. The relative weight of polymorphisms in raw AP-PCR data precluded the identification of common genetic profiles among adenomas of distinct patients. Thus, data were normalized to reflect changes in intensity between normal and tumor tissue to allow for interpatient comparison (see “Statistical Analysis” in “Material and Methods”). Tree software packages showed that in four of the six cases (A, B, E, and F) at least two distinct subfamilies of tumors could be depicted (Fig. 3). Fingerprintings of the three carcinomas (AT, BT, and ET) were more complex but always related to one of the subfamilies of the

⁵ Internet address: <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>.

⁶ Internet address: <ftp://ftp.uni-bielefeld.de/pub/math/plits/splitstree2>.

Table 2 CGH karyotype of FAP tumors

Case	Tumor	Recurrent alterations ^a	Nonrecurrent alterations
A	AT	rev ish enh(Xp10p21)	rev ish enh(17p11.2)
	A1	rev ish enh(X)	rev ish enh(4p16,22q13)
	A2	rev ish enh(Xp10p11.4)	rev ish dim(18q)
	A3	rev ish enh(Xp10p21,9q34)	
	A4	rev ish enh(Xp10p21,9q34)	
	A5	rev ish enh(Xp10p11.4)	
B	A6	rev ish enh(X)	rev ish enh(22)
	B1	No imbalances detected	
	B3	No imbalances detected	
	B5	No imbalances detected	
	B6	No imbalances detected	
	B7	No imbalances detected	
	B8		rev ish enh(13q11q21,13q32qter, 20q13.2qter), dim(XXq22q24,1p21p31,4q25,5q15q23)
	B9		rev ish enh (13q22qter)
C	C1	rev ish enh(4p16,9q34,22), dim(X)	rev ish enh (12q24,1q24.2,17)
	C2	rev ish dim (Xp11.2p22.1, Xq21q25)	
	C3	rev ish dim(X)	
	C4	No imbalances detected	
	C5	rev ish enh(4p16,9q34,22), dim(X)	rev ish enh(9p13)
	C6	rev ish enh(9q34), dim(X)	
	C7	rev ish enh(9q34), dim(X)	rev ish enh (17p11.2)
	C8	No imbalances detected	
D	D3	rev ish enh(Xp11.2),dim (Y)	rev ish enh(Xq27),
	D4	rev ish enh(Xp11.2)	rev ish enh(Xq24qter,9q34)
	D5	rev ish dim(Y)	
	D6	No imbalances detected	
	D7	rev ish enh(Xp11.2),dim (Y)	rev ish enh(Xp21p22,Xq21)
	D8	rev ish enh (Xp11.2q13)	
	ET	rev ish dim(Xq22q25,7p21.)	rev ish enh(16q,17p00p12), dim(13q21,18q11.2q12)
E	E1	rev ish dim(7p21)	rev ish enh(Xq26)
	E2	rev ish enh(9q34)	rev ish enh(Y, 22)
	E3		rev ish enh (16q24)
	E4	dim (Xq24q26)	rev ish enh (10q26)
	E5	No imbalances detected	
	E6	rev ish enh(9q34)	rev ish dim(2,3,4,5q23q24)
	E7	No imbalances detected	
	E8		rev ish enh (X)
F	F1	rev ish enh (1q21q23,1q32q42,2pterq22,3q21q23,7p13p15,9p21qter, 10q,11q13q14,11q23q24,12q24.1qter,15q23q25,16q,17.2) dim (X)	rev ish enh (7q11.2,8p22pter,8q24.2qter,14, ,20)
	F2	rev ish enh(Y), dim(X)	
	F3	rev ish enh (1q21q23,1q32q42,2pterq22,3q21q23,7p13p15,10q,11q13q14,11q23q24,12q24.1qter,15q23q25,16q,17,22)	rev ish enh (7q21q34,18q12.3.)
	F4	rev ish enh(Y,9p21qter), dim(X)	
	F5	No imbalances detected	
	F7	rev ish enh(Y), dim(X)	
	F6	rev ish enh(Y), dim(X)	
	F8	rev ish enh(Y), dim(X)	
	F9	rev ish enh(Y), dim(X)	
	F10	No imbalances detected	

^a Nomenclature follows Mitelman F, ISCN 1995 Guidelines for Cancer Cytogenetics. enh, gain; dim, loss.

adenomas. Interestingly, in the majority of the cases, a common putative ancestor regarding allelic losses or gains pattern could be envisioned for each subfamily (Fig. 3). Subfamilies of adenomas could not be evidenced in two cases (C and D).

This intracase heterogeneity was also observed when CGH data were analyzed. Despite the clear genetic relationship observed in tumors arising in a single patient, divergent evolution was also observed. In four of the six cases (Table 1), most of the adenomas could be tracked to a single pathway (data not shown). We conclude that significant genetic heterogeneity regarding specific allelic or chromosomal imbalances is present in synchronous FAP adenomas.

Phylogenetic Assessment of All FAP Tumors (Adenomas and Carcinomas) Arising in Distinct Patient Cases Shows Common Genetic Evolutionary Pathways. Next, we analyzed whether this intracase heterogeneity was maintained among different FAP patients. Phylogenetic assessment of the AP-PCR fingerprints of all 56 FAP adenomas and 3 carcinomas was performed. Maximum likelihood analysis revealed four main branches or putative pathways (Fig. 4; Ref. 11). In addition, a fifth one, containing only two adenomas from case B, was also observed.

It is noteworthy that several changes occurred when phylogenetic analysis was performed with all adenomas when compared with assessment of individual cases. First, adenomas belonging to cases A [APC(+)] and B that showed distinct subfamilies, when considered individually, are now ascribed to a single pathway and in case B in conjunction with other adenomas. Second, case C adenomas, previously classified as not having distinct subfamilies, are now grouped into two distinct pathways, III and IV, shared with adenomas of other patients. Third, up to three of the four categories include adenomas of two or even three distinct FAP patients. Finally, in three patients (A, D, and F), all tumors were arranged in a single primary group. In the other three patients (B, C, and E), the tumors were grouped into two different primary groups. Altogether, phylogenetic analyses of all FAP adenomas and carcinomas strongly suggest common genetic evolutionary pathways be shared by three of the six FAP patients analyzed. This observation is even more striking, taking into account the strong similarity observed in adenomas arising in the same patient as assessed by matricial and factorial analysis. Unfortunately, the low number of alterations identified by CGH precluded this type of analysis using CGH data.

PROFILES CASES E AND F

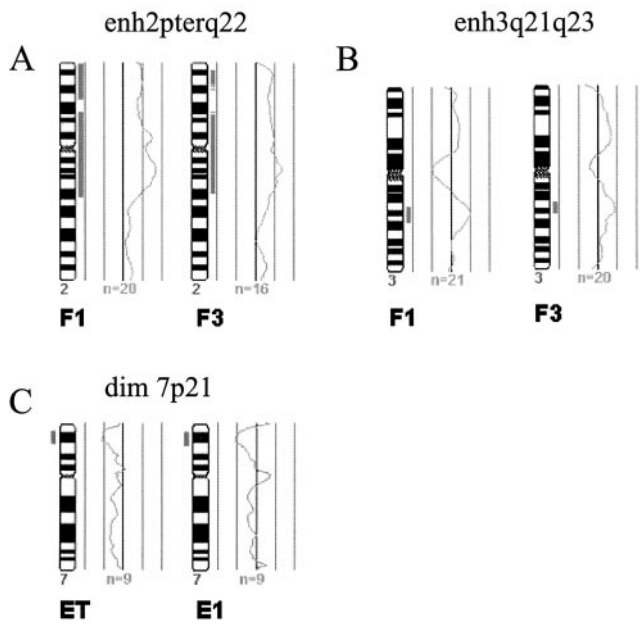


Fig. 2. CGH profiles showing recurrent chromosome imbalances occurring in distinct tumors of the same patient. A and B, similar gains on 2pterq22 and 3q21q23 were found in synchronous adenomas of case F (F1 and F3). C, identical losses on 7p21 were shared by the carcinoma (ET) and one adenoma (E1).

DISCUSSION

Tumorigenesis is a multistep process involving the accumulation of somatic mutations and clonal expansions. The genetic dynamics of human tumor growth are still poorly understood, because serial ob-

servations are rare. Most colorectal tumors belong to the tumor suppressor pathway of which FAP tumors are among the clearest exponent (12). FAP patients provide a natural model for the study of the role of genetic instability in early tumor growth and may be of help in gaining insight into the clonal dynamics in macroscopically independent tumors. We have used different techniques (AP-PCR, CGH, and flow cytometry) to study genetic instability in these tumors.

Here, we show that allelic imbalances (gains or losses) are consistently present in early colorectal adenomas, although at a low frequency when compared with carcinomas. In some cases, they are also associated with mild DNA content abnormalities or scarce chromosomal changes. In agreement with previous observations, a significant increase in the total number of allelic imbalances or chromosome alterations was observed in carcinomas, probably depicting the increased genetic instability observed in the adenoma-carcinoma transition. An APC gene mutation is believed to be necessary and sufficient to promote early adenoma growth (13, 14). Accordingly, we have detected no promoter hypermethylation and only occasionally LOH at the APC locus in the only APC(+) case that we have studied. This result suggests that the genetic abnormalities detected by AP-PCR and CGH, in this case, is likely to be secondary to APC gene inactivation. Recently, APC has been associated with the generation of chromosome instability (15), although this issue remains controversial (16). In the remaining cases with no APC alterations, it has not been elucidated yet their molecular basis that could be other APC gene alterations not detectable by direct sequencing or MYH glycosylase alterations (3). In any case, the molecular nature of the first genetic alteration apparently has a profound impact on subsequent tumorigenesis (17), because GDF of FAP adenomas are lower than that of sporadic ones.

Despite significant heterogeneity, synchronous adenomas of a given FAP patient showed common patterns of molecular evolution. In fact, phylogenetic assessment of the unbiased AP-PCR data evi-

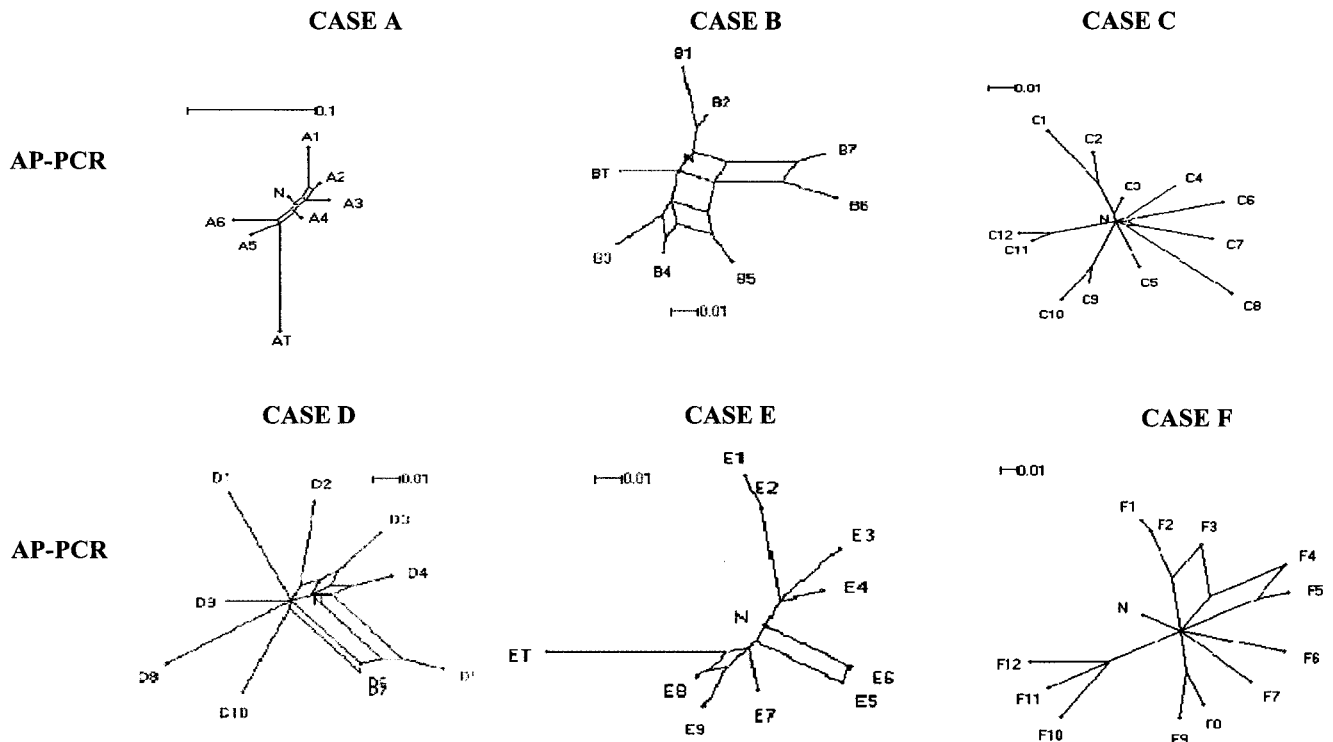


Fig. 3. Phylogenetic trees, using split decomposition analysis, of all FAP cases studied. AP-PCR trees are depicted. Adenomas are shown as identification letter of the FAP case, followed by numbers. N, normal mucosa; T, carcinoma.

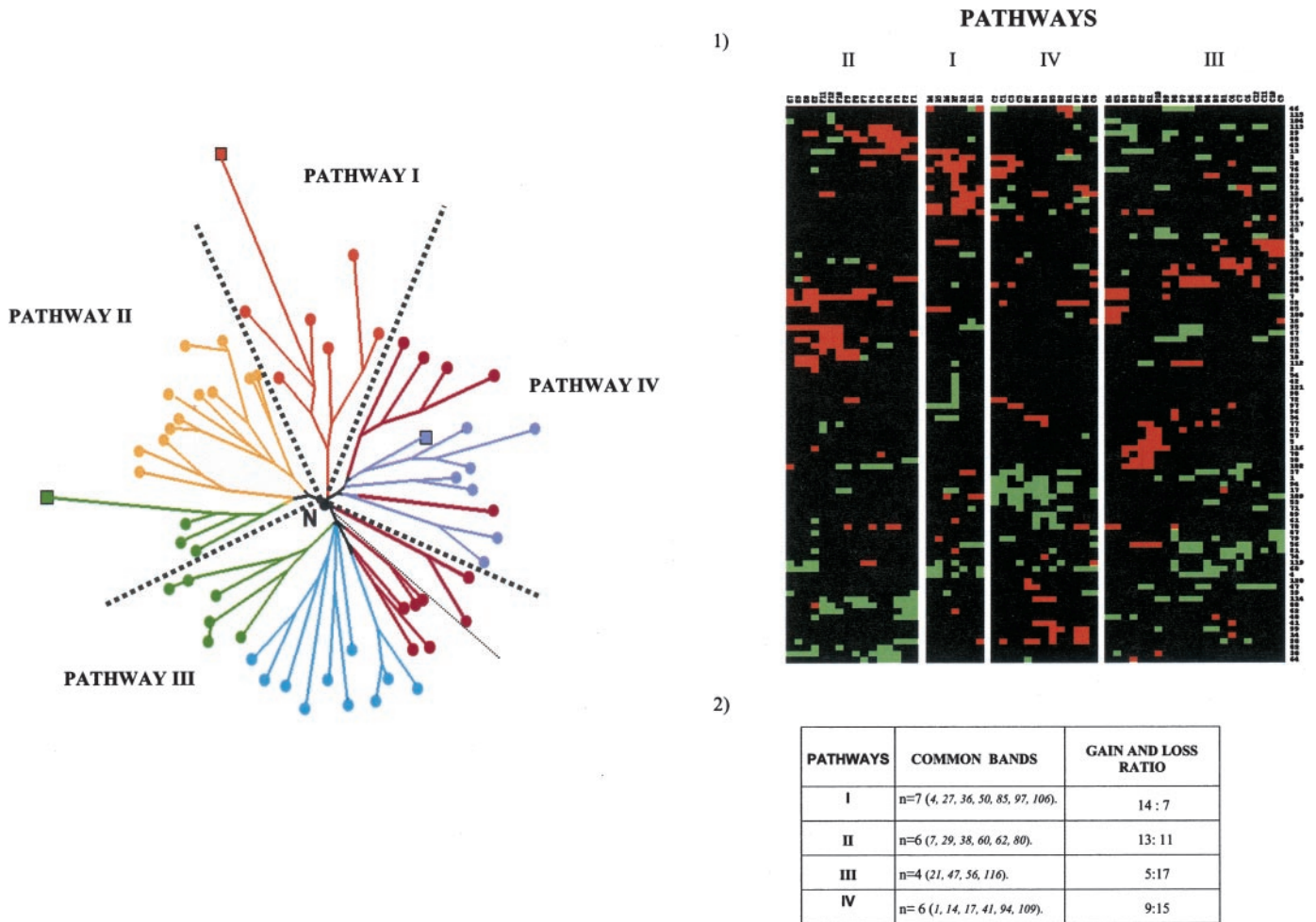


Fig. 4. A, Phylogenetic tree of all FAP tumors analyzed. ●, adenomas ($n = 56$); ■, carcinomas ($n = 3$); N, normal mucosa. Colors identify each FAP case: red, case A; violet, case B; deep red, case C; blue, case D; green, case E; yellow, case F. ■■■■■, lines divide tumors in the four main pathways identified; line depicts a putative fifth pathway including only two tumors (see "Results"). B, cluster analysis of AP-PCR data obtained from FAP adenomas and carcinomas. B1, ordering of samples (adenomas and carcinomas) has been forced to maintain the arrangement observed in Fig. 3. Red depicts increases of intensity in tumors, whereas green depicts losses. B2, the common bands (in *italics*) and gain and loss ratio characteristics of the four pathways identified.

denced multiple common nonrandom alterations among these complex networks. The lack of serial arrangement in most cases disregards a preferred order in the accumulation of genomic damage, although it is possible to track subfamilies of adenomas in a patient. These observations suggest that most genomic damage detected by AP-PCR is likely to be a manifestation of intrinsic genetic instability. In consequence, common genetic profiles might be more related to the susceptibility of certain chromosome regions to be altered rather than to selective pressures.

The strong relationship among synchronous adenomas was further confirmed by CGH analyses. In our set of tumors, a scarce number of chromosomal imbalances, as assessed by CGH, was observed. In a previous study (16) no imbalances were detected in a small series of FAP tumors with two *APC* mutational hits. Here, recurrent alterations were detected in synchronous tumors of the same patient, suggesting the existence of evolutive pathways in which a preferential order in the occurrence of chromosomal losses and gains was observed. This is in line with previous classical cytogenetic works in synchronous colorectal lesions (18, 19) or CGH analyses in papillary renal cell carcinomas (20). In both cases, a strong karyotypic similarity has been observed in independent synchronous lesions arising in the same (18, 19) or different (20) patients. Thus, the genetic predisposition of FAP patients might condition the acquisition of genomic alterations in specific chromosomal subregions. Alternatively, selection of cells

harboring specific chromosomal imbalances may have already occurred.

Arrangement of genetic profiles of independent tumors in phylogenetic trees may contribute to describe their historical relationships. FAP adenomas and carcinomas of different patients show common genetic evolutionary pathways. Concurrence of tumors from up to three patients was observed in three of the main branches. In addition, adenomas arising in the same patient may be ascribed to two different pathways. We hypothesize that restricted pathways are selected during early tumor progression in FAP patients. Therefore, a scenario in which hereditary-increased genetic instability continuously modulates clonal divergence could be postulated. Several factors may shape the molecular evolution of these tumors: (a) the genetic background (*i.e.*, the molecular nature of *APC* gene mutation or other genetic alterations leading to overlapping phenotypes; Refs. 3 and 17) of the initiated clone; (b) a common embryonic origin; and (c) a shared exposure to carcinogens. Novelli *et al.* (21) have convincingly shown that up to 67% of microadenomas in a FAP patient may be polyclonal, requiring the interaction of multiple cells. This situation makes it further unlikely that multiple interaction results in common pathways unless restricted pathways are present.

Altogether, we have shown that allelic gains and losses occur early in FAP colorectal tumorigenesis, further supporting the multistep nature of tumorigenesis and perhaps related to the principal role of

chromosomal instability in human colorectal tumorigenesis. Scarce chromosomal alterations are also present in a subset of adenomas. Phylogenetic assessment of these changes has shown that restricted nonrandom genetic pathways are allowed in the early stages of the disease, probably conditioning its biological behavior. These restricted pathways can only be seen in early growth. Once the carcinoma is established, the significant increase in genetic instability results in random proliferation (22, 23). The resulting extensive genomic damage precludes the identification of early restricted patterns that, nevertheless, have significantly influenced tumor biology.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ramón Seminago (Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona, Spain) for excellent technical support.

REFERENCES

- Ionov, Y., Peinado, M. A., Malkhosyan, S., Shibata, D., and Perucho, M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature (Lond.)*, *363*: 558–561, 1993.
- Heppner-Gross, K., and Groden, J. Biology of adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J. Clin. Oncol.*, *18*: 1967–1979, 2000.
- Sieber, O. M., Lipton, L., Crabtree, M., Heinemann, K., Fidalgo, P., Phillips, R. K. S., Bisgaard, M-L., Orntoft, T. F., Aaltonen, L. A., Hodgson, S. V., Thomas, H. J. W., and Tomlinson, I. P. M. Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis and germ-line mutations in MYH. *N. Eng. J. Med.*, *348*: 791–799, 2003.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature (Lond.)*, *396*: 643–649, 1998.
- Oshima, M., Oshima, H., Kobayashi, M., Tsutsumi, M., and Taketo, M. M. Evidence against dominant negative mechanisms of intestinal polyp formation by *Apc* gene mutations. *Cancer Res.*, *55*: 2719–2722, 1995.
- Arribas, R., Capella, G., Tortola, S., Masramon, L., Grizzle, W. E., Perucho, M., and Peinado, M. A. Assessment of genomic damage in colorectal cancer by DNA fingerprinting: prognostic applications. *J. Clin. Oncol.*, *15*: 3230–3240, 1997.
- Groden, J., Thliveris, A., Samowitz, W., Carlson, M., Gelbert, L., Albertsen, H., Joslyn, G., Stevens, J., Spirio, L., Robertson, M., Sargeant, L., Krapcho, K., Wolff, E., Burt, R., Hughes, J. P., Warrington, J., McPherson, J., Wasmuth, J., Paslier, D. L., Abderrahim, H., Cohen, D., Leppert, M., and White, R. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*, *66*: 589–600, 1991.
- Esteller, M., Sparks, A., Toyota, M., Sanchez, C., Capella, G., Peinado, M. A., Gonzalez, S., Tarafa, G., Sidransky, D., Meltzer, S. L., Baylin, S. B., and Herman, J. G. Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res.*, *60*: 4366–4371, 2000.
- Arribas, R., Risques, R. A., Gonzalez-Garcia, I., Masramon, L., Aiza, G., Ribas, M., Capella, G., and Peinado, M. A. Tracking recurrent quantitative genomic alterations in colorectal cancer: allelic losses in chromosome 4 correlate with tumor aggressiveness. *Lab. Invest.*, *79*: 111–122, 1999.
- Risques, R. A., Moreno, V., Marcuello, E., Petriz, J., Cancelas, J. A., Sancho, F. J., Torregrosa, A., Capella, G., and Peinado, M. A. Redefining the significance of aneuploidy in the prognostic assessment of colorectal cancer. *Lab. Invest.*, *81*: 307–315, 2001.
- Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O., and Botstein, D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *95*: 14863–14868, 1998.
- Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, *87*: 159–170, 1996.
- Spiro, L., Samowitz, W., Robertson, J., Robertson, M., Burt, R., Leppert, M., and White, R. Alleles of *APC* modulate the frequency and classes of mutations that lead to colon polyps. *Nat. Genet.*, *20*: 385–388, 1998.
- Lamlum, H., Papadopoulou, A., Ilyas, M., Rowan, A., Gillet, C., Hanby, A., Talbot, I., Bodmer, W., and Tomlinson, I. *APC* mutations are sufficient for the growth of early colorectal adenomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *97*: 2225–2228, 2000.
- Fodde, R., Kuipers, J., Rosenberg, C., Smits, R., Kielman, M., Gaspar, C., H. van Es, J., Breukel, C., Wiegant, J., Giles, R. H., and Clevers, H. Mutations in the *APC* tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat. Cell Biol.*, *3*: 433–438, 2001.
- Sieber, O. M., Heinemann, K., Gorman, P., Lamlum, H., Crabtree, M., Simpson, C. A., Davies, D., Neale, K., Hodgson, S. V., Roylance, R. R., Phillips, R. K. S., Bodmer, W. F., Tomlinson, I. P. M. Analysis of chromosomal instability in human colorectal adenomas with two mutational hits at *APC*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *99*: 16910–16915, 2002.
- Lamlum, H., Ilyas, M., Rowan, A., Clark, S., Johnson, V., Bell, J., Frayling, I., Efstathiou, J., Pack, K., Payne, S., Roylance, R., Gorman, P., Sheer, D., Nealy, K., Phillips, R., Talbot, I., Bodmer, W., and Tomlinson, I. The type of somatic mutation at *APC* in familial adenomatous polyposis is determined by the site of the germline mutation: a new facet to Knudson's 'two-hit' hypothesis. *Nat. Med.*, *5*: 1071–1075, 1999.
- Bardi, G., Parada, L. A., Bomme, L., Pandis, N., Willén, R., Johansson, B., Jeppsson, B., Beroukas, K., Heim, S., and Mitelman, F. Cytogenetic comparisons of synchronous carcinomas and polyps in patients with colorectal cancer. *Br. J. Cancer*, *76*: 765–769, 1997.
- Bomme, L., Bardi, G., Pandis, N., Fenger, C., Kronborg, O., and Heim, S. Clonal karyotypic abnormalities in colorectal adenomas: clues to the early genetic events in the adenoma-carcinoma sequence. *Genes Chromosomes Cancer*, *10*: 190–196, 1994.
- Bentz, M., Bergerheim, U. S. R., Li, C., Joos, S., Werner, C. A., Baudis, M., Gnarr, J., Merino, M. J., Zbar, B., Linehan, W. M., and Lichter, P. Chromosome imbalances in papillary renal cell carcinoma and first cytogenetic data of familial cases analyzed by comparative genomic hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.*, *75*: 17–21, 1996.
- Novelli, M. R., Williamson, J. A., Tomlinson, I. P. M., Elia, G., Hodgson, S. V., Talbot, I. C., Bodmer, W. F., and Wright, N. A. Polyclonal origin of colonic adenomas in an XO/XY patient with FAP. *Science (Wash. DC)*, *272*: 1187–1190, 1996.
- Shibata, D., Navidi, W., Salovaara, R., Li, Z. R., and Aaltonen, L. A. Somatic microsatellite mutations as molecular tumor clocks. *Nat. Med.*, *2*: 676–681, 1996.
- Tsao, J., Zhang, J., Salovaara, R., Li, Z., Järvinen, H., Mecklin, J., Aaltonen, L., and Shibata, D. Tracing cell fates in human colorectal tumors from somatic microsatellite mutations: evidence of adenomas with stem cell architecture. *Am. J. Pathol.*, *153*: 1189–2000, 1998.

DISCUSSION

1. ALGUNES CONSIDERACIONS SOBRE LA TÈCNICA DE CGH

Aquesta tesi doctoral s'emmarca dins del camp de la citogenètica molecular; que com a tal comença a obrir-se camí al voltant dels anys 80, i un dels avantatges més importants respecte la citogenètica convencional, és la possibilitat de treballar amb cèl·lules en interfase. Per altra banda les tècniques més habitualment utilitzades que es vinculen a la citogenètica molecular són tècniques basades en protocols d'hibridacions *in situ* fluorescent (FISH), i variants d'aquesta com la hibridació genòmica comparada (CGH), són les diferents tècniques de pintat cromosòmic com són el "multiplex" FISH (MFISH), SKY-FISH, mMCB, cenM-FISH i stM-FISH. Aquestes tècniques permeten ampliar la informació que s'obté de la citogenètica clàssica però no la substitueixen, ja que la informació que ens aporta cadascuna de les tècniques és diferent i per tant entre elles són complementaries.

La major part del treball s'ha realitzat mitjançant les tècniques de CGH (ha estat la tècnica més àmpliament utilitzada) i FISH (per tal d'assolir part dels objectius que ens havíem fixat). És per això que sembla interessant fer alguns comentaris pel que fa a la tècnica de GCH, abans d'entrar en l'anàlisi i discussió global dels resultats obtinguts.

La CGH és una tècnica molt potent, ja que ens permet tenir una visió global dels desequilibris genòmics que es produeixen en una determinada mostra, sense tenir la necessitat de disposar de cèl·lules en creixement. Altres tècniques més precises i per tant de més resolució necessiten disposar d'una informació prèvia sobre la regió o gen que es pretén estudiar. La CGH proporciona una informació general de quines regions es perden o es guanyen, de manera que això indicarà quines regions són susceptibles de contenir gens supressors de tumors i quines, per altra banda, podrien contenir oncògens. La informació que s'obté és per tant el punt de partida, bé per estudiar el comportament de gens (ja coneguts) dins de processos de càncer, bé per acotar possibles regions d'interès de cara a buscar nous gens implicats en el procés de la carcinogènesi. Una altra possible aplicació és la de buscar associacions entre diferents regions alterades de manera que es puguin traçar models o perfils d'evolució tumoral. Aquesta tècnica però, presenta entre moltes avantatges, algunes limitacions que és important de tenir present des de l'inici, per tal de poder assolir els objectius proposats. A continuació s'exposaran les seves principals avantatges (♦) i els seus principals inconvenients (●):

- ♦ Permet fer un estudi global de tot el genoma, minimitzant les possibilitats d'analitzar únicament un petit subclon. Part de la informació que aportin les subpoblacions minoritàries, pot quedar reflectida en forma de tendències.

- ◆ Requereix una quantitat de DNA relativament petita (300-900ng).
 - ◆ No necessita que es realitzi cultiu cel·lular (a diferència d'altres tècniques de citogenètica molecular), ja que es treballa amb DNA. En ocasions al realitzar un cultiu es pot estar atorgant un avantatge proliferatiu a certes subpoblacions, que podrien ser no representatives del total de la mostra original (Nacheva et al. 1998).
 - ◆ Permet estudiar alguns tumors sòlids que per citogenètica clàssica són difícils d'analitzar degut a la dificultat d'obtenir metafases, o bé per la gran quantitat de reorganitzacions desequilibrades que presenten.
 - ◆ Es pot treballar amb diferents tipus de mostra, ja sigui congelada, parafinada o bé petits grups de cèl·lules que vinguin de microdissecció.
 - ◆ El fet de poder treballar amb mostres parafinades, facilita el poder realitzar estudis retrospectius.
-
- No detecta reordenaments cromosòmics equilibrats, com són les translocacions equilibrades, o les inversions (aquestes alteracions no impliquen guany o pèrdua de material genètic).
 - No pot valorar canvis a nivell de ploïdia.
 - No es poden valorar regions pericentromèriques i regions riques en heterocromatina.
 - S'ha de tenir molta precaució a l'hora de valorar tant les regions telomèriques, com els braços curts dels cromosomes acrocèntrics.
 - A l'igual que en altres metodologies en les que s'utilitza DNA cal tenir cura de que no hi hagi teixit normal que contamiï la mostra analitzada. Això és especialment problemàtic en alguns tipus de tumors que no són homogenis com és el cas del càncer de pròstata i en el que les cèl·lules tumorals es troben barrejades amb cèl·lules normals, o bé amb cèl·lules inflamatòries. És per aquest motiu que s'ha de treballar amb mostres que continguin un elevat percentatge de cèl·lules tumorals; és aconsellable un mínim del 50-70% d'aquestes, si això no és possible i per tal que el resultat sigui el màxim informatiu és aconsellable fer microdissecció del teixit. Cal tenir present que no s'observen diferències significatives pel que fa a la detecció en nombre d'alteracions si la puresa de la mostra es troba per sobre del 70% (Albertson et al. 2000).
 - La CGH no permet detectar la heterogeneïtat intratumoral, fet característic dels tumors sòlids.

- Té un límit de resolució de 3Mb en el cas de les amplificacions, encara que en el cas de les delecions és inferior 7-10Mb.
- Els cromosomes o regions cromosòmiques 1p32pter, 16p, 17p, 19 i 22 són regions problemàtiques (15-23% dels casos) quan es marca el DNA del tumor amb verd, ja que es poden donar com a pèrdues sense ser-ho, hi ha però altres regions problemàtiques que es posen de manifest quan es marca el DNA del tumor amb vermell, tot i que el percentatge de falsos guanys és menor (10%) 7q21, 9q34, 16q, 17q i 20 (Kallioniemi et al. 1994; Larramendy et al. 1998).

Per acabar cal destacar que aquesta és una tècnica amb un fort potencial per a una posterior aplicació clínica, tant pel que fa al diagnòstic com al tractament, tot està en funció de que en diferents neoplàsies s'acabin trobant regions alterades que tinguin un paper pronòstic vinculant amb l'evolució de la malaltia, de manera que certes alteracions permetin pronosticar amb un elevat grau de certesa l'evolució que tindrà el pacient, i per tant adoptar la solució clínica més adient.

2. ALTERACIONS GENÒMIQUES EN TUMORS UROTELIALS

Més del 90% dels carcinomes de bufeta són tumors urotelials, aquests presenten característiques molt semblants als carcinomes urotelials originats a altres àrees de les vies urinàries (pelvis renal, urèters, ductes prostàtics o uretra prostàtica), tant a nivell histològic, morfològic, embrionari com genètic; la qual cosa permet que s'estudiïn de manera conjunta.

En aquesta primera part de la discussió es farà un estudi global sobre els tres treballs de bufeta que hi ha a l'apartat de resultats (treballs 1 (Prat et al. 2001), 3 (Prat et al. enviat b) i 4 (Prat et al. enviat a)), agrupant les dades d'un total de 79 tumors. La distribució per estadis i graus tumorals, el nombre de tumors estudiats de cadascun d'ells, així com el rang i la mitjana d'alteracions que presenten es troben indicats a la taula XI.

De la sèrie de tumors urotelials estudiats gairebé la totalitat són tumors vesicals, excepte un de pelvis renal i un altre que es trobava localitzat al urèter dret.

Dany genòmic i estadis tumorals

És conegut el fet de que a mida que augmenta l'estadi dels tumors incrementa el nombre d'alteracions, això és molt evident entre tumors pTa i pT1, mentre que deixa de ser significatiu a l'hora de comparar pT1 i pT2-T4 (Sauter et al. 1997). Aquest fet ha estat observat a la nostra sèrie de tumors (Taula XI), de manera que els tumors pTa presenten una mitjana d'alteracions de 6.09 (n=32), mentre que en els tumors pT1 és de 10.06 (n=40), i en els pT2-T4 és de 10.42 (s'ha de tenir en compte que aquest valor s'ha obtingut a partir d'un nombre de tumors infiltrants molt petit (n=7) i per tant, possiblement s'està cometent un error).

Taula XI: Relació dels tumors d'uroteli estudiats.

Estadi/Grau	Nº de casos estudiats	Rang d'alteracions	Mitjana d'alteracions
pTaG1	11	0-16	5,45
pTaG2	17	0-32	5,64
pTaG3	4	1-14	9,75
pT1G2	16	0-15	5,93
pT1G3	24	0-26	8,62
pT2-T4	7	0-23	10,42

Estudis realitzats per Simon i col. (1998, 2000) descriuen resultats similars als nostres tant en tumors pTa on la mitjana és de 3.7 (n=20), pels pT1 on la mitjana és de 10 (n=30), com pT2-T4 on el valor és de 11.1 (n=37), cal tenir en compte el fet de que en aquest estudi el nombre de tumors infiltrants analitzats és elevat. Altres estudis però troben que el nombre d'alteracions augmenta a mesura que augmenta l'estadi tumoral i descriuen valors en el cas del pTa de 2.3, en els pT1 de 6.5 i en els pT2-T4 de 13 (Richter et al. 1997, 1998). A la bibliografia trobem dades que posen de manifest que el nombre d'alteracions també augmenta a mida que augmenta el grau tumoral, Zhao i col. (1999) troben que tumors pTaG1 presenten una mitjana d'alteracions de 1.9 mentre que aquest valor augmenta fins a 3.1 en el cas dels pTaG2. En el present estudi (Taula XI) la diferència més significativa es va trobar entre tumors pT1G2 i pT1G3, confirmant la importància del grau en els tumors considerats superficials o d'invasió mínima.

Un estudi recent portat a terme per Blaveri i col. (2005a) en una sèrie de 98 tumors de bufeta estudiats mitjançant CGH en microxips de DNA, mostra que la fracció del genoma alterat més elevada es troba en tumors pT1 sent aquesta d'un 27%, mentre que en tumors pTa és d'un 12%, i en tumors pT2-T4 d'un 18%. Aquests autors troben que les diferències d'aquest paràmetre són significatives entre tots els estadis

tumorals, tot i que destaquen el fet que la comparació entre pTa i pT1 és la que resulta ser més significativa ($p=0.0003$).

Alteracions més freqüents. Alteracions diferencials entre estadis tumorals

Els tumors d'uroteli es caracteritzen citogenèticament per presentar cariotips força complexes, que van des de cariotips diploides fins a cariotips pseudo-tetraploides, els quals presenten sovint un nombre elevat de marcadors sobretot en estadis avançats de la malaltia.

Els desequilibris cromosòmics que s'han observat de manera més recurrent en el nostre estudi (treballs 1, 3, i 4) es mostren a la taula XII. La selecció dels cromosomes a analitzar s'ha fet tenint en compte no només els nostres resultats sinó també les dades que hi ha a la bibliografia (Richter et al. 1997, 1998; Bruch et al. 1998; Simon et al. 1998; Zhao et al. 1999).

Taula XII: Desequilibris cromosòmics més freqüents, en relació amb els diversos estadis tumorals.

GUANYYS	Treball 1 de resultats: Prat et al. Urology (2001)			Treball 4 de resultats: Prat et al. Cancer Letters (enviat)			Treball 3 de resultats: Prat et al. Genes Chromosomes and Cancer (enviat)			TOTAL		
	pTa	pT1	pT2-T4	pTa	pT1	pT2-T4	pTa	pT1	pT2-T4	pTa	pT1	pT2-T4
1q	0/9	6/15	3/6	5/6	2/3	1/1	3/17	4/22	0	25%	30%	57%
3p	0/9	2/15	3/6	1/6	1/3	0/1	4/17	2/22	0	15,6%	12,5%	42,8%
5p	0/9	1/15	2/6	1/6	0/3	1/1	0/17	2/22	0	3%	7,5%	42,8%
6p	0/9	1/15	1/6	0/6	0/3	1/1	1/17	1/22	0	3%	5%	28,5%
7p	1/9	0/15	2/6	2/6	0/3	1/1	0/17	2/22	0	9%	5%	42,8%
8q	2/9	7/15	3/6	1/6	1/3	0/1	1/17	4/22	0	12,5%	30%	42,8%
10p	0/9	1/15	3/6	0/6	1/3	0/1	0/17	3/22	0	0%	12,5%	42,8%
11q	0/9	4/15	0/6	2/6	1/3	1/1	1/17	3/22	0	9%	20%	14,2%
17q	1/9	4/15	2/6	4/6	0/3	1/1	4/17	2/22	0	28%	15%	42,8%
20q	1/9	5/15	2/6	3/6	0/3	1/1	2/17	2/22	0	18,7%	17,5%	42,8%
Xq	0/9	1/15	2/6	1/6	0/3	0/1	8/17	10/22	0	28%	27,5%	28,5%
PÈRDUES												
2q	0/9	2/15	1/6	0/6	0/3	1/1	1/17	4/22	0	3%	15%	28,5%
5q	0/9	3/15	2/6	2/6	1/3	1/1	1/17	8/22	0	9%	30%	42,8%
6q	0/9	1/15	2/6	2/6	0/3	1/1	0/17	4/22	0	6%	12,5%	42,8%
8p	2/9	6/15	2/6	0/6	1/3	1/1	1/17	4/22	0	9%	27,5%	42,8%
9p	2/9	4/15	0/6	0/6	1/3	1/1	2/17	8/22	0	12,5%	32,5%	14,2%
9q	3/9	9/15	1/6	0/6	1/3	0/1	2/17	6/22	0	15,6%	40%	14,2%
10q	0/9	0/15	1/6	0/6	1/3	1/1	0/17	5/22	0	0%	15%	28,5%
11p	0/9	5/15	0/6	2/6	0/3	1/1	0/17	2/22	0	6%	17,5%	14,2%
11q	0/9	3/15	0/6	1/6	2/3	0/1	2/17	6/22	0	9%	27,5%	0%
13q	0/9	2/15	1/6	1/6	0/3	0/1	3/17	2/22	0	12,5%	10%	14,2%
14q	0/9	1/15	1/6	0/6	2/3	1/1	2/17	2/22	0	6%	12,5%	28,5%
17p	1/9	2/15	0/6	0/6	1/3	0/1	0/17	2/22	0	3%	12,5%	0%
18q	0/9	3/15	1/6	0/6	2/3	0/1	1/17	2/22	0	3%	17,5%	14,2%

Per tal de valorar quins dels desequilibris més freqüents, (descrits a la taula XII), presenten una diferència significativa ($p < 0.05$) entre uns estadis tumorals i uns altres, s'ha realitzat un test estadístic de Fisher. D'aquestes alteracions les que presenten una diferència significativa entre pTa i pT1 són -5q, -9p, -9q i -10q; i les que presenten una diferència significativa entre pT1 i pT2-T4, i que per tant podrien ser importants de cara a fenòmens de progressió són +5p i +7p. De totes maneres hi ha una sèrie d'alteracions que es troben al límit de la significació i que també és interessant de tenir en compte; en el cas de diferències entre pTa i pT1 serien -8p, +8q, +10p, -11q i -18q; i pel que fa a pT1 respecte pT2-T4 serien +3p, -6q i +10p.

Alhora d'intentar trobar alteracions implicades de manera diferencial en progressió, hem de tenir en compte que els nostres resultats s'han obtingut a partir d'un nombre de casos relativament reduït ja que el nombre de tumors infiltrants analitzat és molt petit ($n=7$). És per això que els nostres resultats s'han inclòs en una recopilació de les dades existents a la literatura (Richter et al. 1997, 1998; Bruch et al. 1998; Simon et al. 1998; Zhao et al. 1999). Del conjunt de tots ells ha resultat un recull de aproximadament 350 tumors urotelials (178 pTa, 114 pT1, 55 pT2-T4). Els desequilibris cromosòmics que s'han observat de manera més freqüent (la pèrdua del cromosoma Y no s'ha valorat, ja que no es tenien les dades d'aquest cromosoma de tots els treballs) són: la pèrdua del cromosoma 9, en més d'un 30% dels tumors (amb un 37% de pèrdua a 9q, i un 33% a 9p). Els guanys de 1q, 8q, 17q, i la pèrdua de 6q, en més d'un 20%. Els guanys de 5p, 7p, 11q, 20q i Xq, i les pèrdues de 2q, 5q, 6q, 10q, 11p, 13q i 18q, en més d'un 10% dels tumors.

Podríem pensar que aquells desequilibris que es troben de manera més freqüent dins els tumors urotelials són alteracions que es produeixen de manera primerenca dins la carcinogènesi; i que per tant són alteracions que es poden trobar en tumors de qualsevol estadi i grau; aquest és el cas del cromosoma 9. El elevat percentatge de pèrdua observada en aquest cromosoma, coincideix amb el fet que des de diferents estudis (i emprant diversitat de tècniques: LOH, citogenètica clàssica, CGH, CGH en microxips, entre d'altres) (Dalbagni et al. 1993; Richter et al. 1997; Czerniak et al. 1999; Chow et al. 2000; Fadl-Elmula et al. 2000; Habuchi et al. 2001; Blaveri et al. 2005a) s'ha proposat aquesta alteració com a primerenca dins del procés de la carcinogènesi vesical. La pèrdua reiterada d'aquest cromosoma es troba fins i tot en aquells casos on el tumor presenta un elevat nombre cromosòmic (Sandberg and Berger 1994; Fadl-Elmula et al. 2000). Dins la present recopilació de 350 tumors, la pèrdua del cromosoma 9 es manté entre el 32-38% en els diferents estadis tumorals

(figura 18), fet que corrobora que aquesta pèrdua es dona de manera primerenca. Altres estudis (Hoglund et al. 2001b; Blaveri et al. 2005a) i utilitzant altres metodologies troben una freqüència de pèrdua del cromosoma 9 lleugerament superior (42-51%). Tot i que aquest valor és constant en tumors superficials. Curiosament en un d'aquests treballs realitzat amb CGH en microxips, aprecien una davallada de freqüència (21%) de pèrdua de 9p en el cas dels tumors infiltrants (Blaveri et al. 2005a).

Cal destacar que fins i tot en estudis fets en lesions premalignes com són les hiperplàsies de bufeta es detecten pèrdues d'heterocigositat a 9q (Chow et al. 2000). També s'ha proposat que la hipermetilació de 9q32q33 (*DBC1*) podria ser un fenomen implicat en el desenvolupament inicial dels TCC de bufeta (Habuchi et al. 2001).

S'ha de tenir en compte que la recurrència elevada d'una determinada alteració podria ser deguda al fet que no s'han estudiat el mateix nombre de tumors de tots els estadis tumorals, de manera que alguns desequilibris podrien presentar un percentatge elevat pel fet de ser propis de tumors superficials, ja que aquests tenen un pes específic més important dins la sèrie a la que fèiem referència. Per tal d'establir quines alteracions estan de manera significativa ($p < 0.05$) més presents en uns estadis tumorals que en uns altres, s'ha realitzat un test estadístic de Fisher, d'aquesta manera sabrem quines d'aquestes alteracions es podrien trobar implicades en processos de progressió. De les alteracions abans citades, les que presenten una diferència significativa entre pTa i pT1 són +1q, +8q, +10p, -2q, -8p, -11p, -11q, -14, -10q, +6p, -5q, +3p, -13 i +20q; les que presenten una diferència significativa entre pT1 i pT2-T4 són +5p, +7p, -6q, -17p i +10p, aquestes regions cromosòmiques podrien contenir per tant gens, la pèrdua o guany dels quals, conferiria un avantatge que seria important pel que fa a la progressió del tumor.

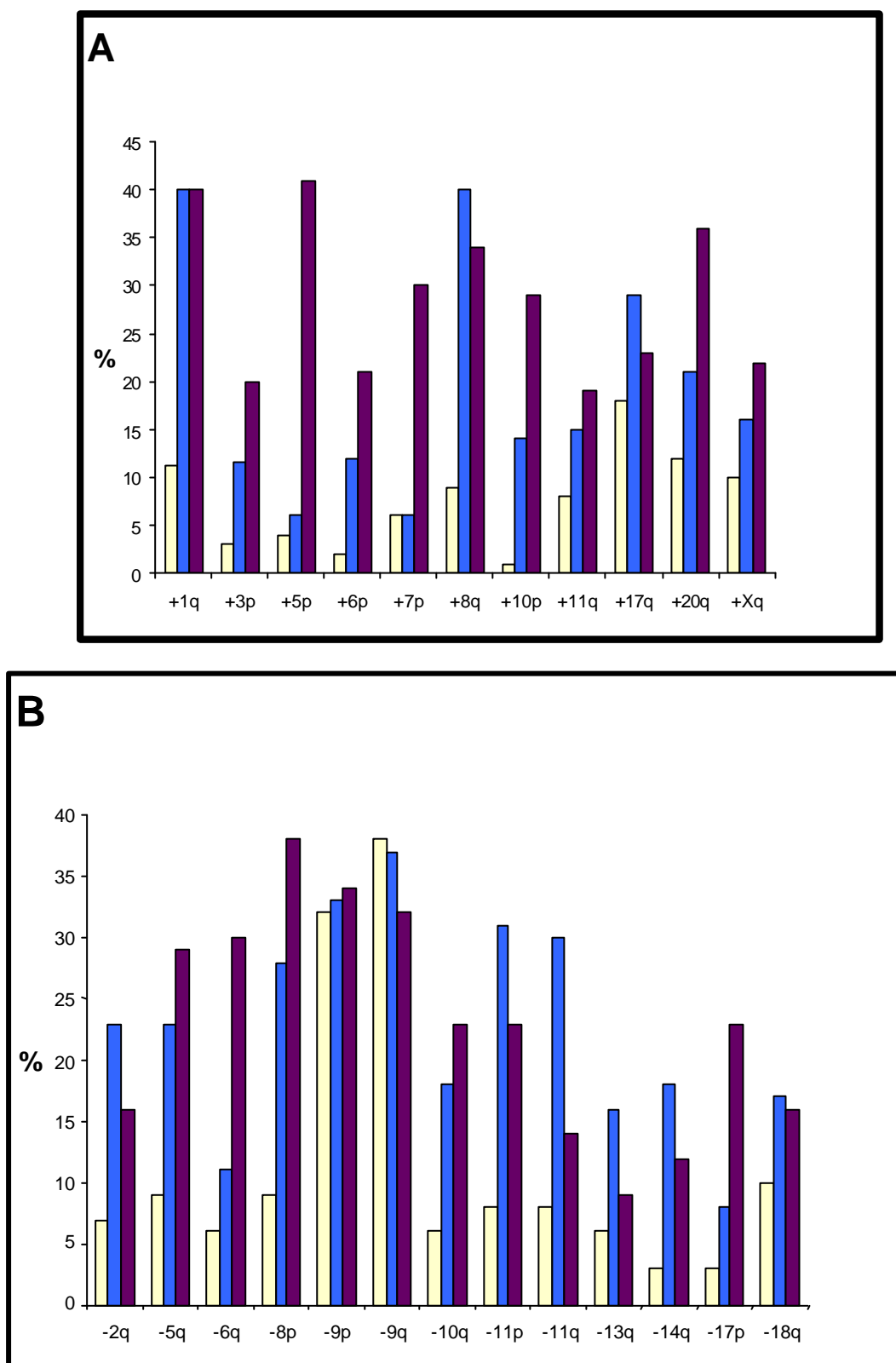


Figura 18: Desequilibris cromosòmics més freqüents, d'una recopilació d'aproximadament 350 tumors urotelials de cèl·lules transicionals de tipus papil·lar. Els guanys estan indicats a la figura (A) i les pèrdues la figura (B). El color groc representa els tumors d'estadi tumoral pTa, el color blau representa els tumors d'estadi tumoral pT1 i el color lila representa els tumors d'estadi tumoral pT2-T4.

Cal destacar que algunes d'aquestes alteracions ja les havíem descrit com a diferencials entre estadis tumorals a partir de les dades dels resultats de CGH dels treballs 1, 3 i 4 de resultats; en el cas d'alteracions diferencials entre pTa i pT1 les alteracions que són coincidents en tots dos anàlisis són -5q, -8p, +8q, +10p i -10q; i les que ho són entre pT1 i pT2-T4 són +5p, -6q, +7p i +10p. Hi ha però algunes alteracions cromosòmiques que en l'estudi de 79 tumors havien presentat unes diferències entre estadis i que a l'augmentar el nombre de casos canvia el seu comportament, un d'aquests casos és el del cromosoma 9, a l'anàlisi dels nostres resultats (n=79) la pèrdua tant del braç curt com del braç llarg del cromosoma 9 presentava diferències significatives entre els d'estadi tumorals pTa i pT1, en canvi a l'augmentar el nombre de tumors estudiats la diferència deixa de ser significativa ja que la pèrdua d'aquest cromosoma es manté de manera constant en tots els estadis. Altres alteracions interessants de comentar són -18q i +3p; pel que fa a la pèrdua de 18q que a l'anàlisi de 79 tumors presentava un valor proper al límit de la significació entre pTa i pT1, deixa de presentar un valor significatiu per tal de diferenciar estadis tumorals al augmentar el nombre de tumors estudiats. Pel que fa al guany de 3p, en el primer anàlisi (n=79) presentava un valor proper al límit de la significació entre pT1 i pT2-T4 i l'augmentar el nombre de tumors estudiats (n=350) passa a ser una alteració estadísticament significativa al comparar estadis tumorals pTa i pT1.

Cal fer un incís, per tal de puntualitzar algunes dades pel que fa al guany del cromosoma 7. En les nostres dades sembla tenir un paper important pel que fa a marcar diferències entre els tumors infiltrants i els que no ho són (6% pTa, 6% pT1 i 30% pT2-T4), això coincideix amb altres autors que han observat una correlació entre l'augment en el nombre de cromosomes 7 i estadis i graus avançats (Waldman et al. 1991). Però al mateix temps trobem a la bibliografia altres dades que no són coincidents amb les nostres observacions, com són el fet que la trisomia d'aquest cromosoma ha estat descrita com a única anomalia en alguns tumors de bufeta (Berrozpe et al. 1990), o bé un estudi de Höglund i col. (2001b) on descriuen aquesta alteració com una alteració que es produïa de manera primerenca (7% pTa, 26% pT1, 17% pT2 i 21% pT3), els autors postulen que fins i tot podia aparèixer de manera simultània a la pèrdua del cromosoma 9, que com ja s'ha dit en repetides ocasions al llarg d'aquest treball és una alteració, que apareix a l'inici de la carcinogènesi vesical. Per altra banda estudis realitzats amb CGH en microxips han suggerit que guanys tant del braç curt com del braç llarg d'aquest cromosoma presenten una elevada freqüència en tumors invasius (Blaveri et al. 2005a).

Com s'ha vist a partir dels resultats de CGH, es troben una sèrie de regions cromosòmiques que estarien alterades de manera significativa segons els estadis tumorals, en aquestes regions es poden localitzar oncògens o gens supressors de tumors el guany o la pèrdua dels quals seria responsable d'aquestes diferències. Recentment s'ha publicat un treball realitzat amb *arrays* d'expressió, en el que s'analitzen 74 tumors de bufeta (27 tumors superficials i 47 tumors infiltrants), en el que es posa de manifest un llistat de 25 gens que s'expressarien de manera diferencial entre tumors de bufeta superficials (pTa-T1) i tumors infiltrants (pT2-T4). Aquest set de gens classificaria de manera correcta els tumors en un 90.5% dels casos; els autors destaquen entre tots aquests gens, *SULF1* (localitzat a 8q13.1) com el gen amb un valor de predicció més elevat (Blaveri et al. 2005b). A la taula XIII s'indiquen aquests gens juntament amb la seva localització cromosòmica. Tal i com es pot observar, moltes de les regions cromosòmiques on es situen aquests gens, són regions que ja s'han citat anteriorment alhora de comentar les regions més freqüentment alterades en el nostre estudi.

Taula XIII: Gens que presenten expressió diferencial en tumors de bufeta superficials *versus* infiltrants.

Localització cromosòmica	Símbol	Nom complet	Sinònims
1q21	<i>RFX5</i>	DNA-binding protein RFX5	regulatory factor X, 5 (influences HLA class II expression), Regulatory factor X subunit 5
1q21	<i>CTSK</i>	Cathepsin K precursor	cathepsin K (pseudodysostosis), Cathepsin O, Cathepsin O2, Cathepsin X, CTSO2, CTSO, CTSO1, CTSO2, MGC23107, PKND, PYCD
1q31	<i>CTSE</i>	Cathepsin E precursor	cathepsin E
1q31	<i>RGS1</i>	Regulator of G-protein signaling	1R20, B-cell activation protein BL34, BL34, Early response protein 1R20, IER1, IR20, regulator of G-protein signalling 1
2q34-q36	<i>FN1</i>	Fibronectin precursor	CIG, Cold-insoluble globulin, fibronectin 1, FINC, FN, LETS, MSF
2q37	<i>COL6A3</i>	Collagen alpha 3(VI) chain precursor	collagen, type VI, alpha 3
4q28	<i>FGB</i>	Fibrinogen beta chain precursor	fibrinogen, B beta polypeptide
5q32	<i>SPINK1</i>	Pancreatic secretory trypsin inhibitor precursor	PCTT, PSTI, serine protease inhibitor, Kazal type 1, Serine protease inhibitor Kazal-type 1, Spink3, TATI, Tumor-associated trypsin inhibitor
6q24-q25	<i>AKAP12</i>	A-kinase anchor protein 12	AKAP250, AKAP 250, A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12, A-kinase anchor protein 250 kDa, Myasthenia gravis autoantigen gravin
7p15-p13	<i>INHBA</i>	Inhibin beta A chain precursor	Activin beta-A chain, EDF, Erythroid differentiation protein, FRP, inhibin, beta A (activin A, activin AB alpha polypeptide)
7q21.3-q22.1	<i>COL1A2</i>	Collagen alpha 2(I) chain precursor	collagen, type I, alpha 2, HGNC:8128, OI4
8q13.1	<i>SULF1</i>	Sulfatase 1	HSulf-1, HSULF1, KIAA1077, SULF-1, sulfatase 1
10q22.1	<i>PRG1</i>	Secretory granule proteoglycan core protein precursor	Hematopoietic proteoglycan core protein, MGC9289, P.PG, Platelet proteoglycan core protein, PPG, PRG, proteoglycan 1, secretory granule, Serglycin, SERGLYCIN

Continuació taula XIII: Gens que presenten expressió diferencial en tumors de bufeta superficials *versus* infiltrants.

Localització cromosòmica	Símbol	Nom complet	Sinònims
10q25-q26	<i>ACADSB</i>	Acyl-CoA dehydrogenase, short/branched chain specific, mitochondrial precursor	2-MEBCAD, 2-methyl branched chain acyl-CoA dehydrogenase, 2-methylbutyryl-CoA dehydrogenase, 2-methylbutyryl-coenzyme A dehydrogenase, ACAD7, acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain, SBCAD
11	<i>STIP1</i>	Stress-induced-phosphoprotein 1	Hop, HOP, Hsp70/Hsp90-organizing protein, IEF-SSP-3521, P60, ST11, ST11L, stress-induced-phosphoprotein 1 (Hsp70/Hsp90-organizing protein), Transformation-sensitive protein IEF SSP 3521
12p13	<i>C1S</i>	Complement C1s subcomponent precursor	C1 esterase, Complement C1s component precursor, complement component 1, s subcomponent
12q21.3-q22	<i>LUM</i>	Lumican precursor	Keratan sulfate proteoglycan lumican, KSPG lumican, LDC, lumican, SLRR2D
13q13.3	<i>POSTN</i>	Periostin, osteoblast specific factor	OSF2, OSF-2, Osteoblast specific factor 2, periostin, periostin, osteoblast specific factor, PN
15q25	<i>MFGE8</i>	Lactadherin precursor periostin, osteoblast specific factor	BA46, Breast epithelial antigen BA46, EDIL1, HMFG, HsT19888, MFG-E8, MFGM, Milk fat globule-EGF factor 8, milk fat globule-EGF factor 8 protein, OAcGD3S
16q13	<i>MT1F</i>	Metallothionein-1F	HQP0376, metallothionein 1F (functional), MGC32732, MT1, MT-1F
16q13	<i>MT1H</i>	Metallothionein-1H	Metallothionein-0, metallothionein 1H, MT-0, MT1, MT-1H
16q13	<i>MT1L</i>	Metallothionein 1L	MT1, MT1R
16q13	<i>MT1E</i>	Metallothionein 1E	metallothionein 1E (functional), MT1, MT-1E, MTD
16q22.1	<i>NUTF2</i>	Nuclear transport factor 2	NTF2, NTF-2, nuclear transport factor 2, Placental protein 15, PP15
17q25	<i>TIMP2</i>	Metalloproteinase inhibitor 2 precursor	CSC-21K, TIMP-2, tissue inhibitor of metalloproteinase 2, Tissue inhibitor of metalloproteinases-2

Amplificacions gèniques

Les amplificacions són un fet poc freqüent, que es produeix de manera més habitual en tumors d'estadis avançats, i és per això que en les regions amplificades es podrien localitzar gens amb un paper important en la progressió tumoral. Exemples d'aquesta distribució preferent en tumors invasius els podem trobar en estudis de CGH de microxips de DNA que recentment s'ha publicat. Veltmann i col. (2003) descriuen amplificacions en dos tumors d'estadi pTa, 3 tumors d'estadi pT1 i 17 tumors pT2-T4. Un altre treball utilitzant la mateixa tècnica i amb resultats similars és el publicat per Blaveri i col. (2005a) on de 29 casos pTa, 6 presentaven amplificacions, mentre que de 14 pT1, 8 en presentaven i el nombre encara augmentava més en el cas dels pT2-T4 on de 55 casos 31 presentaven amplificacions.

Coincidint amb les dades esmentades i tenint en compte que la majoria de tumors eren superficials o d'invasió mínima (72/79), la nostra sèrie de tumors presentava un nombre relativament baix d'amplificacions; els casos que van presentar un nombre

d'amplificacions superior a 3, van ser únicament dos, i tots dos casos tenien un estadi tumoral pT3G3.

Les amplificacions que varem detectar en els nostres estudis en diferents regions del genoma han estat: 1p11p13, 3p21pter, 5p11p13, 6p12p22, 6p22pter, 6q16q24, 6q22, 7p13pter, 7q32qter, 8p12, 11q13, 12q14q15, 12q24.2q24.3, 16p12pter, 17q23qter, 19p13.2pter, 20p13pter. Però si ens fixem en les dades de la bibliografia veurem que el nombre de regions que presenten amplificacions dins els TCC augmenta: 1p22p24, 1p22p32, 1q21q24, 2q32, 3p11, 3q26, 5p15, 5q21, 7q21q31, 8q21.3q22, 8q24, 9p21, 10p12, 10p13p15, 10q22q23, 10q25, 12q12, 12q14q21, 12q25, 13q34, 16q21q22, 17q11q21, 17q12, 17q21, 17q22q23, 18p11, 20q13, 22q11q13, Xp21, i Xq21 (Kallioniemi et al. 1995; Voorter et al. 1995; Richter et al. 1997, 1998; Simon et al. 1998, 2000).

Algunes de les regions que presenten amplificacions, són regions que contenen gens coneguts, alguns d'ells són *MYCL1* a 1p34, *E2F3/CDKAL1/ID4/SOX4* a 6p22, *FGFR1* a 8p12, *KCNQ3/ZNF406/POLR2K/SPAG1/RNF19* a 8q22q24, *MYC* a 8q24.12q24.22, *SFMBT2* a 10p14, *CCND1/CTTN/FGF3/PAK1/VEGFB1/FGF4/PAK1/SHANK2* a 11q13, *PCSK7* a 11q23, *MDM2/FRS2/CCT2/VMD2L3* a 12q15, *TNFSF13B* a 13q33, *ERBB2* a 17q12, *JUNB* a 19p13.2, *CCNE1* a 19q13.11, i *CYP24* a 20q13.2 (Veltman et al. 2003; Blaveri et al. 2005a); però els gens candidats a ser oncògens de la majoria de regions amplificades són encara desconeguts.

És interessant destacar la relació que hi ha entre les regions d'amplificació i els llocs fràgils. Per mitjà d'estudis *in vitro* s'ha vist que l'activació dels llocs fràgils té una forta relació amb les regions d'amplificació genòmiques, ja que aquests inicien els cicles de trencament-fusió-pont (BFB de l'anglès: *breakage-fusion-bridge*). Diverses regions que es troben amplificades es troben també flanquejades per llocs fràgils, fet que dona suport a l'existència d'aquesta relació. Com exemple podem citar l'amplificació de 11q13 que es troba flanquejada per FRA 11A i FRA 11F, o bé l'amplicó 8q22q24 flanquejat per FRA 8B i FRA 8E. Estudis realitzats per Moriarty i Webster (Moriarty and Webster 2003), suggereixen que els llocs fràgils serien regions del genoma susceptibles a patir trencaments i amplificacions.

11q13 i ciclina D1

Un dels *loci* que s'ha trobat més freqüentment amplificat en tumors de bufeta ha estat 11q13, aquesta és però una regió que és troba també amplificada en altres tipus

de tumors com són el de mama, esòfag, cap i coll o ovari entre d'altres (Knowles 2001; Fu et al. 2004).

En aquesta regió es troben localitzats diversos gens: *CCND1*, *FGF4*, *VEGFB*, *FGF3*, *CTTN* i *PAK1*. Estudis recents suggereixen que alguns d'aquests gens (*CCND1*, *FGF3*, *CTTN* i *PAK1*) es troben implicats en el procés de carcinogènesi vesical (Veltman et al. 2003). Hi ha a més a més, altres dades que suggereixen que seria *CCND1* el gen diana principal en el amplicó que hi ha 11q13, ja que en estudis realitzats mitjançant FISH en microxips de teixit, s'observa que el nivell d'amplificació decreix a mida que ens allunyem de *CCND1* (Zaharieva et al. 2003).

Tot això va fer que ens plantegéssim estudiar per mitjà de FISH si el guany o amplificació de 11q13 era degut a *CCND1*, o bé podia ser degut a algun altre gen dels que es troben situats en aquesta banda citogenètica.

Per tal de portar a terme aquests estudis es va treballar amb talls de parafina de mostres prèviament analitzades per CGH (treball 3 de resultats), els resultats obtinguts varen mostrar que els estudis de FISH eren capaços de detectar les amplificacions del gen de la ciclina D1 amb un percentatge major (12%), del que ho era la CGH convencional (2.5%). El percentatge d'amplificacions detectades en el nostre estudi amb FISH és similar al 11% descrit per altres autors (Sauter et al. 1993; Bringuier et al. 1996).

Per tant podem concloure que la FISH ens resulta una eina molt útil, ja que permet detectar una sèrie d'amplificacions que la CGH no és capaç de posar de manifest. Al mateix temps també ha servit per descartar que en alguns casos on s'observava un guany de 11q13, aquest fos degut al guany de *CCND1*, ja que per FISH no s'ha observat aquest guany i per tant el responsable ha de ser algun altre dels gens que es troben localitzats en la mateixa regió cromosòmica.

Delecions en homozigosi

En el nostre estudi, i al tractar-se de CGH convencional, no varem poder valorar les pèrdues en homozigosi. Darrerament, però, s'estan publicant treballs utilitzant CGH en microxips de DNA que poden detectar-les; per tant la informació que aporten altres metodologies en aquest sentit és de gran interès de cara a la cerca de gens candidats a ser gens supressors de tumors.

Les regions cromosòmiques que amb una major freqüència presenten pèrdues en homozigosi són 8p23 on es troba *CSMD1*, 9p24-13 *CDNK2A* (va resultar el clon més freqüentment delecionat), 9q21-34 on es troben *AKNA/DFNB31/DBC1*, 10q22q24 on

es troba *PTEN*, altres regions que s'han descrit són 2q14-37 i 11p13 (Veltman et al. 2003; Hurst et al. 2004; Blaveri et al. 2005a).

Per tant cal pensar que aquelles regions que es troben amplificades o bé delecionades en homozigosi, són regions que clarament han de ser estudiades en detall per tal de buscar gens implicats en la carcinogènesi vesical, de totes maneres s'ha de tenir present que la cerca de gens en aquestes regions és en moltes ocasions difícil ja que es tracta de regions grans que contenen una elevada quantitat de gens.

3. TUMORS UROTELIALS SUPERFICIALS O D'INVASIÓ MÍNIMA: Ta vs T1

Degut a que la major part dels tumors d'uroteli estudiats en els diferents treballs que es presenten en aquesta tesi doctoral han estat tumors superficials o d'invasió mínima (72/79), hem considerat interessant centrar part d'aquesta discussió en aquests estadis tumorals. Per tant l'anàlisi i discussió que hi haurà a continuació estarà basada en 28 tumors pTa i 40 tumors pT1 (procedents dels treballs 1, 3 i 4 de l'apartat de resultats).

No s'han tingut en compte 4 tumors pTaG3 procedents del treball 2 de resultats, ja que al ser un nombre molt petit de tumors no podríem concloure dades de manera significativa.

Diferències quantitatives segons estadis i graus tumorals

Com ja s'ha dit anteriorment hi ha una important diferència pel que fa a la quantitat d'alteracions entre tumors pTa i pT1, mentre que l'augment d'aquestes deixa de ser significatiu a l'hora de comparar pT1 i pT2-T4 (Sauter et al. 1997; Simon et al. 1998, 2000; Fadl-Elmula et al. 2000).

Dins de la nostra sèrie de resultats hauríem d'esperar per tant que els tumors d'estadi pTa presentessin un nombre menor d'alteracions que els tumors d'estadi pT1, i així succeeix tal i com es pot observar a la taula XIV. Tot i que cal destacar, que el salt quantitatiu s'observa de manera clara entre el grup de pT1G2 i el pT1G3, per tant està més condicionat pel grau que per l'estadi tumoral.

Taula XIV: Relació de dany genòmic en funció del estadi i grau tumoral.

Estadi/Grau	Nº de casos estudiats	Guany		Pèrdues	
		rang	mitjana	rang	mitjana
pTaG1	11	0-13	3,8	0-6	1,6
pTaG2	17	0-26	4,1	0-6	1,5
pT1G2	16	0-7	2,9	0-12	3
pT1G3	24	0-13	4,4	0-13	4,3

Un altre fet important, és que els tumors d'estadi pTa presenten aproximadament el doble de guanys que de pèrdues, mentre que en els estadis pT1 el nombre de pèrdues augmenta de manera significativa i arriba a igualar-se amb el nombre de guanys.

Diferències quantitatives i qualitatives: subtipus dins dels tumors superficials

Una altra aproximació que s'ha realitzat respecte a les dades obtingudes a partir dels resultats de CGH, ha estat la classificació dels diferents casos no en funció de l'estadi i grau tumoral, sinó en funció dels patrons individuals de desequilibris genètics observats (Taula XV).

Aquesta taula posa de manifest la presència de tres grups els quals es diferencien tant quantitativament com qualitativament i que poden ser representatius de diferents vies d'evolució dins la carcinogènesi urotelial. El grup 1 i 2, tenen en comú que presenten un elevat dany genòmic (el nombre d'alteracions es mouen en un rang que va des de 5 fins a 32).

- **Grup 1** (en color vermell a la taula), es caracteritza per presentar una predominança de guanys sobre les pèrdues. Les alteracions més freqüents són +1q (66.6%), +1p (54%), +17q i +19p (45.8%).
- **Grup 2** (en color blau a la taula), es caracteritza per presentar un elevat nombre de pèrdues. Destaquen les següents alteracions (en ordre decreixent de freqüència) -9q (69%), -9p i -11q (61.5%), +Xp i +Xq (53.8%), +8q, -8p, -5q i -11p (46.1%).
- **Grup 3**, destaca per presentar poc dany genòmic, ja que presenta un nombre d'alteracions inferior a 5.

Taula XV: Alteracions observades per CGH en 68 tumors urotelials (amb negreta hi ha indicades les amplificacions)

Cas	Estadi/Grau	Guany	Pèrdues
E2	pTaG2	1p31pter,1q10q23,2p24,2q37,4p15,3,5q35,6q26qter,7p,7q11,7q34qter,8p22,10q25,11p15pter,11q12q13,12q23,13q32qter,14q32,15q15qter,16p13,1pter,16q24,17q23qter,19p13,2pter,19q13,1q13,2,20q12qter,21q22,22	4q,6q10q23,11p13,13q21,18p,X
E1	pTaG2	1p31pter,1q10q23,2q37,6q26qter,7p22pter,7q34qter,10q25,13q32qter,16p13,1pter,16q24,17q,19p13,2pter,20q12qter,22	4q,X
U-12	pTaG2	1p32pter,1q21qter,5q34qter,12q22qter,12q24,2q24,3,15q22q24,16pterq13,16q23qter,17p12q12,19p13,3,20q,21q22,22q12	2q36q37
U-8	pTaG1	1p32pter,2p25,2q37,11q13,12q24,16,17,19,20q,21,22,Xq21,Xq26qter	3p12,5q14q23,13q32
C1	pT1G3	1p34pter,1q,2pterq21,2q33qter,3p24pter,3q21qter,8p12,8q,10p,14q31qter,16p,19q,21	1p13p33,4q33qter,5p10p12,5q,9q,10q,11p,11q14qter,14q10q22,15q10q15,16q,17p11,2,18q
U-25	pT1G3	1p32pter,1q43,2p24pter,2q36qter,9q34,11q12q13,16p13,1pter,17p13,19,19p13,2pter,22,Y	5p15,2q23
U-3	pTaG1	1p34,2pter,4p16,4p11q24,7q11,17pterq12,19,Xpterq25,Y	5p15,6p22,11q23,12p12
U-5	pTaG1	1p32pter,1q25q42,3p26,9q34,12q24,1,14q24qter,17q,Xp22,21pter	Y
C2	pT1G3	1p34pter,1q,2p21,8p12,11q13,19p,19q,22	4,8p22pter,9p,11p,11q14qter,14q10q22,18q
U-27	pT1G3	1q43qter,4p15,2q21,5q11,2q12,7p21pter,7q11,2,10p11,2p10,19	7q33q35,9q21q31,10q24q25,16q22q23
15	pT1G2	1p32p34,1q,8q,11q13,13q13qter,20,20p13pter	5q,8p,11,15q15q25,Y
14	pT1G2	1,4q27qter,5,8q,17q24qter,X,Yq11,2pter	2q33qter,8p,9q22qter,13q11q14,18
U-29	pT1G3	1q21q24,1q31q32,2p14p15,7p15,8q21,3q23,17q21	9p13p23
U-19	pT1G2	2q37,5q27,9q34,17p,19p,20q13,2q13,3	4q26q27,12q15
12	pT1G2	1q21qter,3p22pter,3q,8q22qter,17q11q21	2q32qter,3p13p14,9,17p13,Y
24	pT1G3	1q,3,8p21q13,17q,Y	8p22pter,9q31qter
U-21	pT1G2	5p14pter,10p11p12,19p,20,Y	5q34,9,11
21	pT1G3	1q32qter,8q,15q,Y	2q21q24,8p,9q
U-13	pTaG2	3p26,3q28,9p21pter,Xq21q22	Y
U-26	pT1G3	1p32pter,17q11,2q12,19,Xp22,2pter	
U-17	pTaG2	1p36,2pter,16p13,2pter,X,Y	
1	pTaG1	4p22pter,4q32qter,7,16	
U-23	pT1G3	1q31,4q00q31,3,X	1p36,1pter,16,Y
18	pT1G2	1q21qter,13q21qter,Y	8p,9p11p22
U-20	pT1G2	3p24p26,6p25,11q13	
6	pTaG2	1q23qter,8q	4q31qter,8p
U-33	pT1G3	3p25pter,4q21	5q32qter
20	pT1G2	7q32qter,20	13q22q32
C3	pT1G3	8p12,19q	
U-35	pT1G3	1p36,2,9q34	
U-34	pT1G3	3p26,Xq21	
U-11	pTaG2	1q42	Xq00q13
5	pTaG2	Y	9q21qter
U-7	pTaG1	X	14q31
U-4	pTaG1	8q24,1qter	Y
U-1	pTaG1	Xp11,3q25	
U-28	pT1G3	X	
U-2	pTaG1		
U-24	pT1G3		
U-6	pTaG1		
16	pT1G2		
3	pTaG2		
7	pTaG2		
8	pTaG2		
10	pT1G2		
U-30	pT1G3		
4	pTaG2		Y
U-14	pTaG2		Y
2	pTaG2		9
U-18	pT1G2		9p23p24,Y
13	pT1G2		9q21q31,14q23qter
11	pT1G2	8q	8p,Y
U-36	pT1G3	X	2q12q22,Y
U-15	pTaG2	15	9,Y
U-10	pTaG1	3p21,Xq	9,13q22q31
U-16	pTaG2	6p21	12q15,18q22,21q21
17	pT1G2	11q13,15q13qter	9q13q22,11p,11q14qter
9	pTaG2	8q,17q,Y	8p,9,11p,17p
19	pT1G2	1q,8q,20	9,11p14pter,13q31q32,17p
U-39	pT1G3	4q12q13,8q24,3,19p,X,Y	2p23p24,2q22,9p,9q31q32,11q22q23
U-9	pTaG1	4p11q13,19p,X,Y	2p21p24,8p23,11q23,12p12,13q31,14q24q31
23	pT1G3	11q13,12,14q21qter,15,20	5q12q31,9,11p,11q14qter,18q12qter,Y
22	pT1G3	6p22p23,8q21q22,10p,11q,12p,17,20p11,2qter	4q,5q13q23,6q13q22,7q21,9q,11p14qter,18q21qter,X
U-31	pT1G3	7q11,2q22,8q13qter,11q13,12q14q15,17p12pter,Xpterq23	4p15,3p15,1,4q22qter,5q33q34,6p12,6q21qter,8p21p22,9p13,9q31,13q21q31
U-22	pT1G2	14q13,X,Y	4p15,3,5q31qter,7q34q35,8p22p23,10p13p14,10q25,11p15,11q23q24,13q31,14q31,17p12,18q12,3qter
U-37	pT1G3	7q11,8q10q21,3,19,X,Y	2p14p24,2q21,4p15,1p15,2,5q12q13,6q25,7q31q35,8p21p22,9p12q23,10q25,11q23,14q24,15q24
U-32	pT1G3	5q11,2p13,10p12,Xp21q25	2p24p23,3p13p14,3q32q33,5q34,6q24,1q24,2,8p12p22,9p12p22,9q31q33,10q24q26,11q23q24,15q23q24,17p12,18q21q22
U-38	pT1G3	4q00q21,X	1q31q41,2q12q14,3,5q23qter,6q25,7p12p14,7q32q35,9p12,10q25,11q23,12p12,12q24,1q24,2,15q24q25,Y

Com es pot observar a la taula XVI, dins de cada un dels tres grups trobem tumors de diferents estadis i graus tumorals, en percentatges variables.

Taula XVI: Relació dels diferents estadis i graus tumorals dins dels tres grups descrits.

	Estadi i Grau	Proporció de casos	Percentatge
GRUP 1	pTaG1-G2	(9/24)	37.5%
	pT1G2	(6/24)	25%
	pT1G3	(9/24)	37.5%
GRUP 2	pTaG1-G2	(3/13)	23%
	pT1G2	(3/13)	23%
	pT1G3	(7/13)	54%
GRUP 3	pTaG1-G2	(16/31)	52%
	pT1G2	(7/31)	22%
	pT1G3	(8/31)	26%

En el grup 3, hi ha diversos tumors (9/31, dels quals 4 eren pTaG1-G2, 2 eren pT1G2 i 2 més eren pT1G3) els quals no presenten cap alteració per CGH; això pot ser degut a que possibles alteracions genètiques que presentin aquestes mostres estiguin per sota el nivell de resolució de la tècnica, o que es tracti de reordenaments cromosòmics equilibrats, o per altra banda que el nombre de cèl·lules portadores dels desequilibris es trobi per sota del 50-70% necessari per obtenir un bon resultat, o bé que acumulin alteracions en el patró de metilació.... Alguns d'aquests motius podrien ser també possibles explicacions per altres tumors que si presenten alguna alteració i que també es troben en aquest grup, quan en principi estadis tumorals com el pT1G3 esperariem que presentessin més dany genòmic. Altres autors (Blaveri et al. 2005a) utilitzant CGH en microxips de DNA també descriuen casos que no presenten cap alteració genòmica, aquests resultats donen suport a l'existència del grup 3 de la nostra classificació.

Per altra banda cal destacar que en aquest grup hi ha un clar predomini de tumors pTa, fet que es podria esperar ja que en principi és normal que tumors d'estadis primerencs presentin poques alteracions.

Una altra possible lectura que es podria fer a partir de la presència de pT1G3 en aquest grup és que hi hauria una part dels tumors de bufeta que evolucionarien a partir de mecanismes que no implicarien grans canvis cromosòmics.

Dins aquest grup crida l'atenció el fet que alguns casos presenten alteracions que són característiques del grup 1 com són +1p o +1q, o del grup 2 com són -5q, -8p, -9p, -9q o +Xp. Per tant alguns dels tumors que trobem en el grup 3, amb el temps podrien acabar redistribuint-se en un dels altres grups. Per tant alguns dels tumors del grup 3

podrien representar una etapa inicial que evolucionaria cap a una via de guanys o de pèrdues. Aquesta hipòtesi estaria recolzada per resultats obtinguts en tumors de bufeta sincrònics (treball 4 de resultats) on es pot veure l'evolució des d'un tumor amb una alteració fins tumors amb dotze alteracions en un mateix pacient (Figura 19).

Els grups 1 i 2 posarien de manifest l'existència de tumors urotelials que es caracteritzen per un nombre de desequilibris importants; en principi podríem pensar que al presentar patrons tant diferents d'alteracions això ens estaria indicant que són dos vies d'evolució tumoral independents, en una d'elles els tumors tindrien una preferència per l'acumulació de guanys (grup1) i una altra on s'acumularien de manera preferent pèrdues (grup2). De totes maneres no hem d'oblidar que en tots dos grups es troben tumors de diversos estadis i graus tumorals, fet que posa de manifest que hi ha d'haver una sèrie de desequilibris dins de cada grup, que per si mateixos tinguin prou importància com per permetre l'evolució tumoral.

De fet, estudis estadístics de diferents patrons cariotípics han demostrat que la majoria de tumors segueixen dues vies d'evolució diferents, una caracteritzada per guanys genòmics, i una altra caracteritzada per pèrdues (Hoglund et al. 2005). Un exemple d'això seria el cas del càncer pulmó, que es pot produir seguint dues vies, una iniciada pel guany dels cromosomes 6p, 11q, 12 i 17q i una altra que iniciaria amb la pèrdua de 3p; ó el cas del càncer d'ovari en el qual una via iniciaria amb el guany del cromosoma 7 ó de 8q, i l'altra via s'iniciaria amb la pèrdua de 6q (Hoglund et al. 2005).

Cal tenir present la possibilitat que posteriorment tant el grup 1 com el 2 puguin patir una evolució de forma convergent; de manera que els guanys i pèrdues realment importants de cada un dels grups es mantindrien en estadis infiltrants, de manera que en aquests tumors ja no es veuria una predominança de pèrdues o guanys, sinó que estaríem davant d'un grup més homogeni; en aquest sentit estudis realitzats pel nostre grup (Rigola, tesi doctoral) indiquen que el patró d'alteracions dels tumors infiltrants observat per CGH és homogeni, i no evidencia la presència de diferents subgrups.

Per altra banda cal destacar que en el grup 2, hi ha un predomini important de tumors pT1G3; però l'especial naturalesa d'aquest grup de tumors fa que els tinguem en una consideració especial, ja que aquests són tumors que infiltren el teixit connectiu de forma local o extensa i això ha fet que en ocasions se'ls hagi anomenat com a tumors mínimament infiltrants. A més a més cal tenir present que un 70% dels tumors superficials recidiven, i d'aquests un 10-15% seran infiltrants, i al mateix temps d'aquests entre un 30% i un 50% són T1 d'alt grau (Gunlusoy et al. 2005); per això tot i que en l'actualitat hi ha una clara tendència a intentar conservar la bufeta, s'ha proposat la possibilitat de realitzar cistectomia radical i una posterior derivació urinària en casos seleccionats (Huguet et al. 2005). La important taxa de progressió d'aquest

grup de tumors respecte el tumors pTa fa suposar que tot i ser considerats com integrants d'un únic grup anomenat tumors superficials, ens trobem en realitat davant de dues entitats diferents. De manera que seria possible que sota una única entitat histopatològica de pT1G3, hi hagués realment tres grups biològicament diferents, amb històries diferents, que presentarien patrons d'alteracions diferents; perquè tot i que a nivell clínic i patològic tots els tumors infiltrants són similars hi ha d'haver alguna diferència a nivell genètic entre els que debuten de manera directa com infiltrants, i els que progressen a partir d'un tumor superficial (pTa). En el nostre estudi no s'observen però diferències pel que fa al pronòstic entre els tumors pT1G3 dels diferents grups.

Cal tenir present que ni +18, -8q, -17q, -19, -20 ni -22, són alteracions que s'hagin observat en cap del 68 tumors (pTaG1-G2, pT1G2-G3) estudiats.

4. TUMORS SINCRÒNICS: CLONALITAT I VIES D'EVOLUCIÓ

Del total de 79 tumors urotelials estudiats, n'hi ha 28 que eren múltiples en el moment del seu diagnòstic, de 20 d'aquests es va estudiar una única mostra (pertanyen als treballs 1 i 3 de l'apartat de resultats), i 8 d'aquests tumors corresponien a tumors sincrònics procedents de tres pacients (treball 4 de resultats). Pel que fa a estadis i graus tumorals, hi ha 10 tumors pTa, 17 tumors pT1 i 1 tumor pT4.

El rang pel que fa al nombre d'alteracions en aquest grup de tumors va de 0 a 32, amb una mitjana de 8.4 alteracions, i es va detectar més presència de guanys (amb una mitjana de 5.2 guanys per tumor) que de pèrdues (amb una mitjana de 3.17 pèrdues per tumor).

A la taula XVII es pot observar tan l'estadi i grau tumoral de tots els tumors múltiples estudiats, i les alteracions detectades per CGH convencional.

Dins d'aquesta sèrie de tumors, les alteracions que s'han observat de manera més freqüent han estat en més d'un 30%: +Xq, -9, +19p i +19q; en més d'un 25%: +1q, +Xp, +1p, -4q i -11p; i en més d'un 20%: -5q, +7q, +11q, -11q, +17q i +Y. S'han observat amplificacions a 3p21pter, 6p112p22, 6q16q24, 7q13pter, 7q32qter, 8p12, 11q13, 12q14q15 i 17q23qter.

Taula XVII: Alteracions observades per CGH en els tumors múltiples sincrònics (amb negreta hi ha indicades les amplificacions). E/D/C seguides d'una xifra indiquen diferents tumors d'un mateix pacient.

Cas	Estadi/Grau	Guanys	Pèrdues
U-3	pTaG1	1p34.2pter,4p16,4p11q24,7q11,17pterq12,19,Xpterq25,Y	5p15,6p22,11q23,12p12
U-13	pTaG2	3p26,3q28,9p21pter,Xq21q22	Y
E1	pTaG2	1p31pter,1q10q23,2q37,6q26qter,7p22pter,7q34qter,10q25,13q32qter,16p13.1pter,16q24,17q,19p13.2pter,20q12qter,22	4q,X
E2	pTaG2	1p31pter,1q10q23,2p24,2q37,4p15.3,5q35,6q26qter,7p,7q11,7q34qter,8p22,10q25,11p15pter,11q12q13,12q23,13q32qter,14q32,15q15qter,16p13.1pter,16q24,17q23qter,19p13.2pter,19q13,1q13,2,20q12qter,21q22,22	4q,6q10q23,11p13,13q21,18p,X
5	pTaG2	Y	9q21qter
7	pTaG2		
9	pTaG2	8q,17q,Yp	8p,9,11p,17p
D1	pTaG3	15p	
D2	pTaG3	1q21,1q24qter,2p24pter,4p15pter,11q23,15p,16p12q21,17p12,17q24,18p,19,22	4q26q28,5q12q32
D3	pTaG3	1q21,2p,13,14p,15p,16p12,19,Xp22pter,Xq21q22	5q12q32
U-22	pT1G2	14q13,X,Y	4p15.3,5q31qter,7q34q35,8p22p23,10p13p14,10q25,11p15,11q23q24,13q31,14q31,17p12,18q12.3qter
10	pT1G2		
13	pT1G2		9q21q31,14q23qter
17	pT1G2	11q13 ,15q13qter	9q13q22,11p,11q14qter
U-26	pT1G3	1p32pter,17q11.2q12,19,Xp22.2pter	
U-35	pT1G3	1p36.2,9q34	
U-34	pT1G3	3p26,Xq21	
C1	pT1G3	1p34pter,1q,2pterq21,2q33qter,3p24pter,3q21qter, 8p12 ,8q,10p,14q31qter,16p,19q,21	1p13p33,4q33qter,5p10p12,5q,9q,10q,11p,11q14qter,14q10q22,15q10q15,16q,17p11.2,18q
C2	pT1G3	1p34pter,1q,2p21,8p12,11q13,19p,19q,22	4,8p22pter,9p,11p,11q14qter,14q10q22,18q
C3	pT1G3	8p12,19q	
22	pT1G3	6p22p23,8q21q22,10p,11q,12p,17,20p11.2qter	4q,5q13q23,6q13q22,7q21,9q,11p14pter,18q21qter,X
U-23	pT1G3	1q31,4q10q31.3,X	1p36.1pter,16,Y
U-27	pT1G3	1q43qter,4p15.2q21,5q11.2q12,7p21pter,7q11.2,10p11.2p10,19	7q33q35,9q21q31,10q24q25,16q22q23
U-28	pT1G3	X	
U-30	pT1G3		
U-31	pT1G3	7q11.q22,8q13qter, 11q13 , 12q14q15 ,17p12pter,Xpterq23	4p15.3p15.1,4q22qter,5q33q34,6p12,6q21qter,8p21p22,9p13,9q31,13q21q31
U-39	pT1G3	4q12q13,8q24.3,19p,X,Y	2p23p24,2q22,9p,9q31q32,11q22q23
30	pT4G3	3p21pter,7,10p,Y	6q21q23,8p

La majoria d'aquests canvis cromosòmics coincideixen amb els que de forma més freqüent s'observen en els tumors de bufeta, cal destacar però la pèrdua de 4q, que en el cas dels tumors únics es produeix en un 5%, mentre que en tumors múltiples augmenta fins arribar a un 25%. Aquesta alteració ha estat detectada com a freqüent en línies cel·lulars de TCC d'uroteli (Williams et al. 2005), de fet en un estudi realitzat amb CGH en *arrays* de DNA es va trobar com a pèrdua més habitual (un 83%) amb una regió mínima de pèrdua localitzada a 4q13.1-q31.3 (Hurst et al. 2004). També s'ha descrit com alteració habitual en tumors invasius (Simon et al. 2000), aquesta dada podria tenir relació amb el fet clínic que la multiplicitat incrementa el risc de progressió (Kiemeney et al. 1994b; Millan-Rodriguez et al. 2000).

Sabem que el fet de presentar tumors múltiples confereix d'entrada un pitjor pronòstic, per tant esperariem trobar alguna alteració que compartissin tots els tumors, que podria ser la causant d'aquest fenomen de multiplicitat. Dins de la nostra sèrie no hem trobat cap alteració que fos compartida per totes les mostres. Simon i col. (2001) van proposar que -17p podria ser aquesta alteració, ja que trobaven la pèrdua del braç curt d'aquest cromosoma en un 100% dels casos d'un estudi realitzat a partir de tumors múltiples.

Dins de la nostra sèrie la pèrdua del braç curt del cromosoma XVII es produeix només en un 10% dels tumors. La majoria d'estudis de pèrdues al·lèliques associen -17p amb tumors de bufeta avançats (revisat per (Fadl-Elmula 2005; Wu 2005)); cal tenir present que els casos estudiats per Simon i col. procedien de pacients als que se'ls hi havia realitzat una cistectomia.

Relació clonal

Una de les possibilitats que ens obre l'estudi dels tumors urotelials múltiples, és la de esbrinar quin és l'origen dels tumors tant sincrònics com metacrònics, és a dir si aquests tumors s'originen a partir d'un epiteli inestable o bé tenen un origen monoclonal. Aquest tema ha estat àmpliament discutit al llarg del temps revisat per (Hafner et al. 2002).

L'estudi de vuit tumors procedents de tres pacients (treball 4 de resultats) va posar de manifest que la majoria de tumors sincrònics compartien d'1 a 17 desequilibris cromosòmics. Això va permetre traçar arbres filogenètics (figura 19), alhora que suggeria una relació clonal entre els diferents tumors. Aquesta relació va ser confirmada matemàticament aplicant el mètode descrit per Kuukasjarvi i col. (1997), que va indicar que la relació clonal entre mostres aparellades era igual a 1.

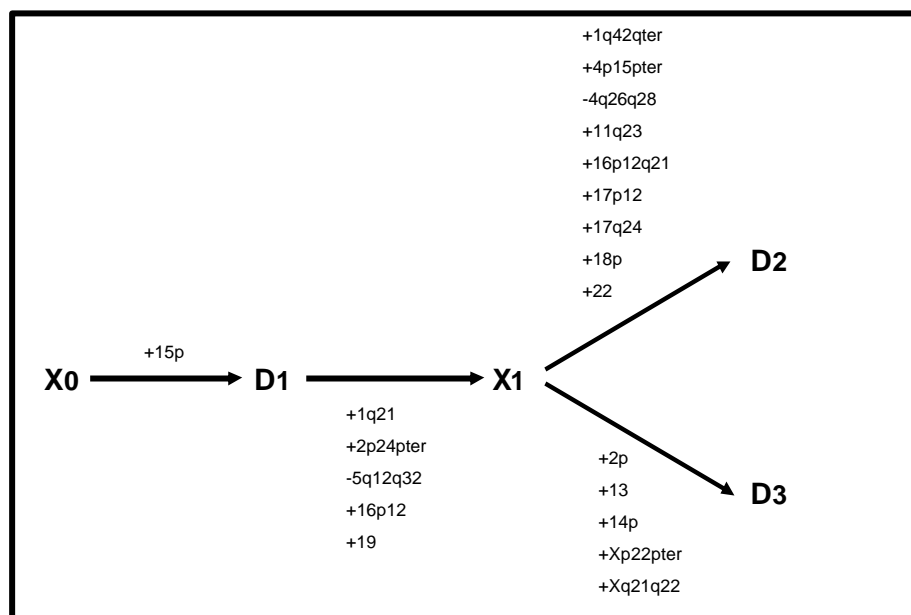


Figura 19: Exemple d'un arbre filogenètic d'un cas de tumors múltiples sincrònics (pertany al treball 4 de resultats). La D indica el pacient estudiat i els números indiquen el tumor, la X indica una població precursora hipotètica.

L'estudi d'aquests tumors ens ha permès identificar mecanismes implicats en la generació i acumulació de desequilibris cromosòmics. Així doncs hem observat que:

- Alteracions que en alguns tumors s'observaven com a guanys, després en altres tumors del mateix pacient i que, segons els nostres arbres tenien un major grau d'evolució, esdevenien amplificacions; un exemple d'això n'és el cas de 8p12 en el pacient C (figura20-A).
- Es va observar que algunes alteracions (tant guanys com pèrdues) s'expandien, de manera que en tumors que en principi estaven més evolucionats l'alteració s'havia engrandit i comprenia un nombre major de bandes cromosòmiques; exemples d'aquest fet es mostren a la figura 20-B. Expansions de pèrdua de regions amb LOH van ser observades en un estudi de tumors metacrònics (van Tilborg et al. 2000), en aquest treball es suggeria que aquest fenomen es podia produir a causa d'un augment de recombinació mitòtica. Sembla que l'expansió de desequilibris cromosòmics tals com les observades en el nostre estudi s'explicarien millor a partir de cicles consecutius de trencaments cromosòmics que s'iniciarien a prop del centròmer i s'estendrien vers les regions telomèriques tal i com varen proposar Gisselson i col. (2001).

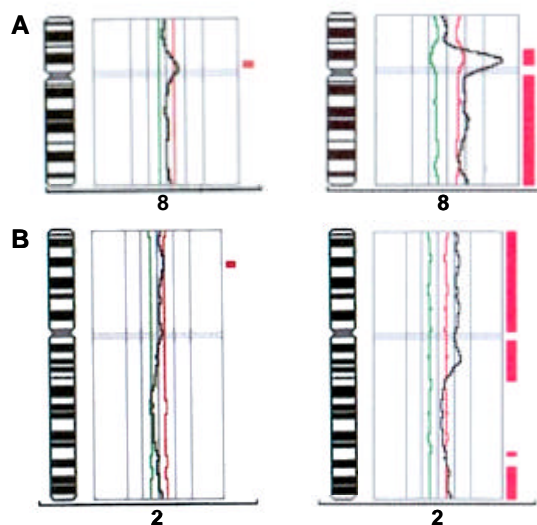


Figura 20: Exemples d'esdeveniments que indicarien l'existència d'una relació clonal entre tumors sincrònics d'un mateix pacient.

Vies d'evolució

Com ja s'ha apuntat anteriorment l'estudi d'aquest tumors també pot aportar informació sobre les possible vies d'evolució d'un procés carcinogènic determinat com a conseqüència de l'acumulació de desequilibris. És a dir, si trobem diferents alteracions que comparteixen tots els tumors s'assumeix que aquestes alteracions s'han produït a l'inici del procés tumoral, mentre que si n'hi ha d'altres que només comparteixen part dels tumors deduirem que s'han produït a posteriori; per altra banda aquelles alteracions que no comparteixin entre cap d'ells s'assumeix que són fruit de l'evolució individual de cada un dels tumors.

Les vies d'evolució observades en aquests tumors es correlacionen amb les proposades a l'apartat 3 de la discussió, confirmant l'existència de tres vies o grups. En resum, podem concloure que:

- Alguns tumors sincrònics són una clara representació del grup 1 ja que hi ha un clar predomini de guanys (cas E de l'apartat del treball 4 de resultats).
- En alguns casos, s'observen tumors amb poc dany genòmic que després evolucionaran vers la via de guanys (Figura19).
- Alguns tumors, tot i ser pT1G3 presenten una seria d'alteracions que són representatives de les més característiques dels grups 1 i 2 aquesta convergència seria més típica d'un pT2-T3 que d'un pT1G3. Per la qual cosa

suggerim que aquests tumors correspondrien genèticament a un estadi més avançat.

Aquestes vies observades en diferents tumors es correlacionen amb les que s'observen dins de poblacions d'un mateix tumor (casos A i B del treball 4 de resultats).

Aquest fet suggereix l'existència de diferents grups d'evolució cariotípica que estarien generats per diferents mecanismes d'inestabilitat cromosòmica de forma que un generaria guanys i l'altre pèrdues (Lengauer et al. 1998; Nowak et al. 2002; Sieber et al. 2003; Hoglund et al. 2005). Està demostrat, que un cop s'ha adquirit una alteració, aquesta condicionarà les alteracions següents que es puguin anar produint. Això indica que diferents vies d'evolució cromosòmica es podrien iniciar en estadis primerencs de la carcinogènesi, de manera que l'acumulació d'alteracions cromosòmiques es faria seguint diferents camins (Hoglund et al. 2005).

Per altra banda el fet de presentar els guanys o pèrdues característics del grup sense presentar simultàniament les alteracions característiques de l'altre, mantindria els tumors en estadis superficials o d'invasió mínima.

Integrant aquests resultats amb els observats en l'apartat 3 de la discussió, proposem una via d'evolució dels tumors de bufeta segons la qual a partir de tres vies divergents en tumors superficials o d'invasió mínima, s'arriba a una convergència en els tumors infiltrants que adquireixen a més altres desequilibris (Figura 21).

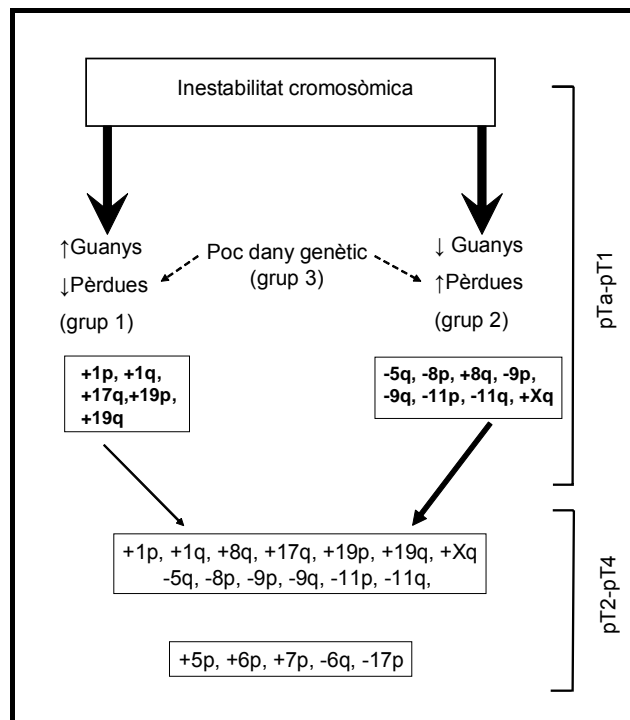


Figura 21: Proposta de via d'evolució dels tumors de bufeta.

5. TUMORS RENALS PAPIL·LARS DE TIPUS FAMILIAR. MULTIPLES TUMORS I PATRONS D'EVOLUCIÓ COMUNS

Els carcinomes renals papil·lars (PRC, de l'anglès: *papillary renal carcinomas*) de tipus 1, són de tumors renals que s'originen a l'epiteli del túbul proximal; i a l'igual que la majoria de tumors renals, estan molt ben caracteritzats a nivell citogenètic. Es caracteritzen per la trisomia dels cromosomes 7 i 17, i per la pèrdua del cromosoma Y en els adenomes. La presència de trisomies addicionals com són 3, 12, 16 i 20, està associada a carcinomes (Kovacs et al. 1991, 1993). Estudis amb CGH han posat de manifest el guany dels cromosomes 7 i 17 en un 50% dels casos, i dels cromosomes 16 i 20 en el 15% dels casos, també s'han detectat amplificacions en un tumor a 2q22-q33, 16q, 17q i X (Reutzel et al. 2001), altres estudis emprant aquesta mateixa tècnica descriuen a més a més pèrdues a 1p, 4q, 6q, 9p, 13q, X i Y així com guanys a 5q (Jiang et al. 1998; Rigola et al. 2002).

El carcinoma renal de tipus familiar o hereditari de patró de creixement papil·lar (HPRC, de l'anglès: *Hereditary papillary renal carcinoma*), representa un 4% del total de casos de PRC (Linehan et al. 1995). Els pacients que pateixen aquesta malaltia es caracteritzen per presentar un mutació a la línia germinal, del proto-oncogen *MET* que està situat a 7q31, fet que predisposa a HPRC a les famílies que presenten la mutació. Les mutacions en aquest gen s'han descrit tant en casos familiars com en casos esporàdics (Schmidt et al. 1997, 1998).

En els tumors dels pacients que presenten carcinoma renal papil·lar de tipus familiar la presència de la trisomia 7, s'ha associat a la duplicació del cromosoma portador de l'al·lel del *MET* mutat (Fischer et al. 1998; Zhuang et al. 1998).

***MET*: duplicació de l'al·lel mutat i duplicació de l'al·lel normal**

Amb l'objectiu d'estudiar el comportament de l'al·lel mutat de *MET* en tumors, varem estudiar tres pacients d'una família afecte de HPRC, que presentaven la mutació V1238I a la línia germinal (Prat et al., en premsa). Els resultats de l'anàlisi de seqüenciació van suggerir la duplicació de l'al·lel mutat en els tumors que presentaven trisomia del cromosoma 7, i duplicació tant de l'al·lel normal com de l'al·lel mutat en els tumors que presentava tetrasomia del cromosoma 7. Fischer i col. (1998) van descriure un cas equivalent al nostre en observar també una tetrasomia del cromosoma 7 associada a duplicacions dels al·lells normal i mutat, en el tumor d'un pacient afectat de PRC.

Podem concloure que els nostres resultats confirmen els d'altres autors (Fischer et al. 1998; Zhuang et al. 1998) indicant que l'activació del oncogen *MET* no és suficient per

iniciar el procés de la carcinogènesi, cal un segon pas en el que es duplicaria el cromosoma 7 portador de la mutació. En aquells casos amb tetrasomia 7 es duplicaria també l'al·lel normal. Per tant, independentment de la dosi de l'al·lel normal (és necessari com a mínim una copia) dos dosis del mutat són necessàries per iniciar el procés.

La relació entre la mutació del *MET* i la trisomia 7 explica també l'aparició de múltiples tumors en els pacients afectats del càncer renal papil·lar del tipus familiar. La trisomia del cromosoma 7 és un fenomen normal en les cèl·lules del ronyó ja que diversos estudis citogenètics (Kovacs et al. 1989; Emanuel et al. 1992) van posar de manifest que un 10% de cèl·lules del ronyó normal presenten aquesta trisomia. Les trisomies es produeixen per una no disjunció durant la mitosi d'aquestes cèl·lules, de manera que es generarien una sèrie de cèl·lules filles que serien trisòmiques i unes altres que serien monosòmiques pel cromosoma 7, aquestes últimes no serien viables.

En els casos dels pacients que presenten la mutació en línia germinal, és per tant habitual la presència de trisomies, i és més probable que moltes cèl·lules del ronyó hagin adquirit els dos passos necessaris per l'inici del procés tumorigenic.

Fischer i col. (1998) van proposar que l'activació constitutiva i la duplicació de l'al·lel mutat, endarrereixen la diferenciació de centenars de cèl·lules durant el desenvolupament embrionari. Aquestes cèl·lules retenen la capacitat de proliferació i formen restes d'origen embrionari, que creixeran lentament al llarg de la vida. Quan les cèl·lules adquireixen alteracions somàtiques addicionals com ara la trisomia del cromosoma 17 entre d'altres, el tumor es desenvolupa, és per això que és necessària la prèvia duplicació de l'al·lel mutat de *MET* abans de que es produeixi la carcinogènesi. Per tant la inestabilitat cromosòmica durant l'embriogènesi i el nombre de cèl·lules portadores del l'al·lel mutat, podrien tenir un pes important pel que fa al nombre de tumors en els membres de famílies amb HPRC.

Coincidència en el patró d'alteracions citogenètiques. patrons d'evolució comuns

En el nostre estudi (treball 5 dels resultats) els tumors van ser analitzats per CGH i per citogenètica convencional. Observant en l'estudi les alteracions típiques d'aquests tipus de tumors. En general, hi havia coincidència entre les dues tècniques.

De forma interessant es van detectar una sèrie d'alteracions poc freqüents en els tumors renals papil·lars. Pel que fa als resultats de CGH, un mateix patró de guanys (+7, +12, +13, +17) es va detectar en els dos tumors d'un pacient, i en un tumor d'un altre pacient de la mateixa família; fet rellevant ja que el guany del cromosoma 13 és un fet poc habitual en aquest tipus de tumors.

Per altra banda i pel que fa als resultats de citogenètica convencional, un altre fet destacable va ser la identificació de la translocació $t(2;15)(q13;p11)$, present en els dos tumors d'un mateix pacient. És a més a més interessant la presència en un tumor d'un altre pacient amb una altra translocació involucrant també els cromosomes 2 i 15, $t(2;15)(p13;q15)$ tot i que cal destacar que en punts diferents.

La presència de la mateixa alteració estructural en dos tumors del mateix pacient de HPRC no s'havia descrit anteriorment. Si que trobem a la literatura diversos treballs referents a tumors macroscòpicament independents de pacients amb càncer de colon, on es posa de manifest la presència d'alteracions estructurals idèntiques en els diferents tumors d'un mateix pacient (Bardi et al. 1997; Bomme et al. 1998).

Aquests resultats es veuen recolzats per un estudi realitzat per Bentz i col. (1996) en el qual ja van descriure patrons d'alteracions per CGH molt similars entre membres d'una mateixa família afecte de HPRCC; aquests autors suggereixen un mecanisme genèticament determinat resultant d'alteracions genòmiques que afectaria cromosomes o subregions cromosòmiques, o bé la selecció de cèl·lules amb mutacions que inclourien subregions cromosòmiques específiques. També i com discutirem a continuació a l'apartat 6 de discussió, adenomes de pacients afectats de FAP comparteixen un patró d'alteracions quasi idèntic.

Per tant en el cas de l'HPRC, a l'igual que en altres tipus de tumors hereditaris familiars hi ha diferents factors que podrien condicionar l'evolució dels tumors, el *background* genètic, un origen embrionari comú o una mateixa exposició a determinats carcinògens, serien l'explicació al fet de trobar alteracions idèntiques en diferents tumors d'un mateix individu, o fins i tot en individus diferents d'una mateixa família.

6. VIES D'EVOLUCIÓ GENÈTICA COMUNS EN TUMORS DE PACIENTS AFECTATS DE POLIPOSI ADENOMATOSA FAMILIAR

Del total de casos de càncer de col·lon, aproximadament 5-10% es consideren deguts a factors hereditaris; tot i que aquest és un nombre reduït, el seu estudi és de gran importància ja que ha permès conèixer mecanismes implicats també en els casos de càncer de col·lon esporàdics. La Poliposi Adenomatosa Familiar (FAP: de l'anglès, *Familial Adenomatous Polyposis*), representa aproximadament un 1% dels casos de càncer de col·lon; i es caracteritza per la presència de més de 100 pòlips adenomatosos al col·lon i recte; habitualment aquests s'inicien entre els 20-30 anys. Aquesta malaltia presenta un alt potencial de malignització, i si no s'actua a temps els malalts desenvolupen càncer abans dels 40-50 anys.

Els pacients afectats de FAP, són un model natural per l'estudi del paper de la inestabilitat genètica en estadis primerencs del desenvolupament tumoral, i ens proporcionen informació que permet estudiar patrons d'evolució a partir de l'anàlisi de tumors independents d'un mateix pacient.

Amb aquest objectiu es va portar a terme l'estudi de CGH en un total de 45 adenomes i de 2 carcinomes, procedents de 6 pacients afectats de FAP (Treball 6 de resultats); el nombre d'alteracions que es va observar de mitjana per adenoma va ser baix, de 2.5 (rang 0-20), cal tenir en compte que en 12 casos no es va detectar cap alteració per CGH, i que la majoria d'adenomes presentaven un rang entre 1 i 5 alteracions. El dany genòmic dels adenomes de pacients afectats de FAP és per tant menor al que s'observa en els casos esporàdics, ja que en aquests la mitjana es situa entre 7 i 10, segons els estudis (Meijer et al. 1998; Al-Mulla et al. 1999; De Angelis et al. 1999; Korn et al. 1999). La mitjana pel que fa al nombre de guanys va ser de 1.8, mentre que en el cas de les pèrdues, aquesta va ser de 0.6. Els guanys més recurrents van ser els de Xp i 9q34 (9 dels 47 tumors estudiats per CGH) i 22 (6/47), i les pèrdues la del cromosoma X (12/47).

A la literatura està descrit que a mida que els adenomes progressen cap a carcinomes, s'acumulen més desequilibris cromosòmics (Ried et al. 1999; Hermsen et al. 2002). Pel que fa als dos carcinomes que varem poder estudiar per CGH (Treball 6 de resultats); en un es va trobar el mateix nombre d'alteracions que en els adenomes; però en l'altre pacient, si es va observar que el carcinoma presentava un nombre d'alteracions més elevat (sis alteracions) que els adenomes (que presentaven una mitjana de dos alteracions).

A la figura 22 es poden observar els desequilibris genètics detectats en l'estudi de CGH dels casos estudiats, tant adenomes com carcinomes.

El cromosoma que s'ha trobat més vegades alterat tant pel que fa a guanys com a pèrdues ha estat el cromosoma X (+Xp en un 25%, -Xp en un 27.6% i -Xq en un 36%). En treballs previs de CGH en tumors esporàdics no s'han descrit alteracions significatives d'aquest cromosoma (Aragane et al. 2001), tot i que en un treball en el que es van analitzar per CGH adenomes de baix grau, adenomes d'alt grau i carcinomes només es va trobar el cromosoma X alterat (+Xp) en aquest últim grup (18.7%) (Ried et al. 1995). Per altra banda utilitzant citogenètica clàssica també s'ha trobat el guany d'aquest cromosoma en un percentatge elevat dels casos (40 - 50%) (Muleris et al. 1988, 1990).

Els cromosomes X i Y es troben alterats amb una alta freqüència en el present estudi (veure figura 22, de fet en aquells casos que es poden traçar vies d'evolució entre les diferents mostres d'un mateix pacient, sovint el guany o la pèrdua dels cromosomes sexuals (i en particular del cromosoma X) es troben en els primers passos, per tant podríem pensar que aquestes són unes de les primeres alteracions que es produeixen, és a dir que serien esdeveniments primerencs dins el procés de carcinogènesi dels FAP. Es podria pensar que processos de no disjunció d'aquests cromosomes podrien estar produint-se en els passos inicials de la carcinogènesi d'aquests tumors.

Aneuploidies dels cromosomes sexuals han estat descrites anteriorment per mitjà d'estudis de citogenètica clàssica en adenomes, en aquests estudis quasi la meitat de les mostres estudiades presenten guanys o pèrdues dels cromosomes sexuals (Bardi et al. 1997). També en un estudi en limfòcits de pacients amb predisposició al càncer colorectal tant esporàdic com familiar (entre els que hi havia 9 pacients de FAP) es van trobar aneuploidies en aquests cromosomes (Richard et al. 1994); aquest estudi troba que l'aneuploidia més freqüent era el guany del cromosoma X (59% en mostres masculines i el 43% en mostres femenines); alhora aquest mateix treball troba també un elevat nombre de trencaments i reorganitzacions en els cromosomes sexuals.

Els resultats de CGH van mostrar una forta relació genètica entre els adenomes i els carcinomes d'un mateix pacient, ja que en molts casos tot i presentar un nombre baix d'alteracions, diferents mostres d'un mateix pacient compartien diverses alteracions tal i com es pot observar a la figura 22.

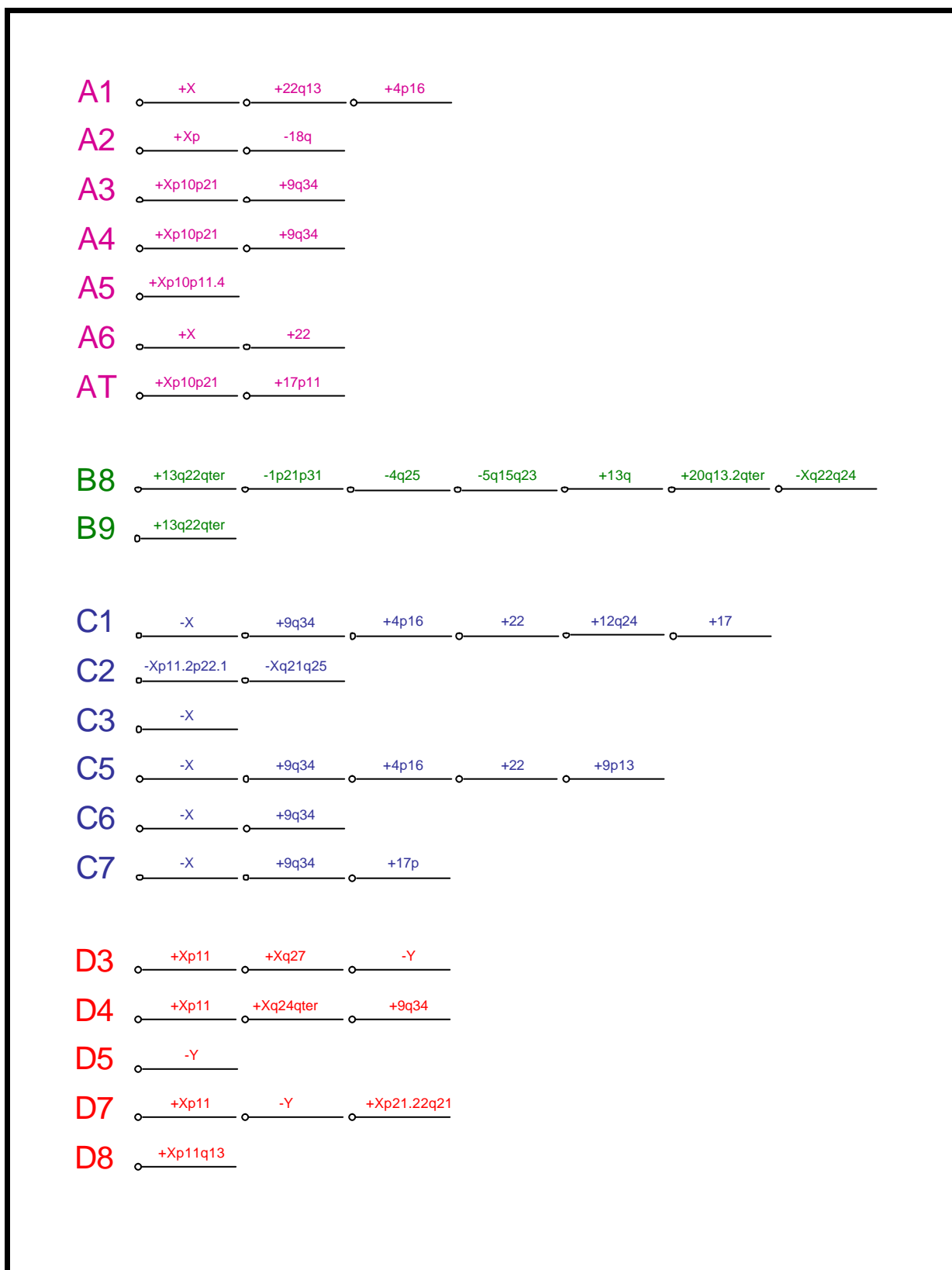


Figura 22-A: Desequilibris genètics en adenomes i carcinomes dels pacients A, B, C i D afectats de FAP.

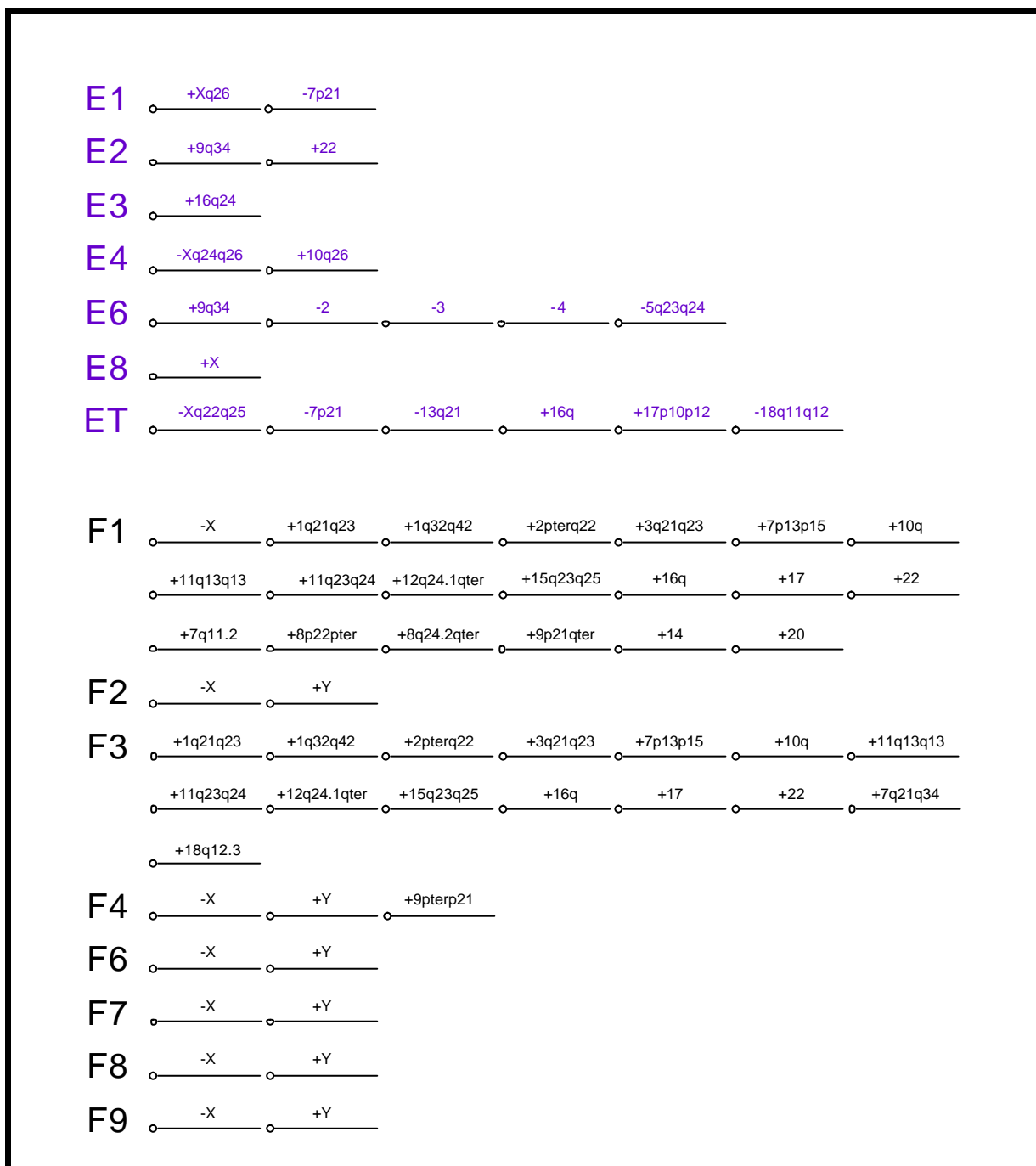


Figura 22-B: Desequilibris genètics en adenomes i carcinomes dels pacients E i F afectats de FAP. Els adenomes que no s'observen en aquesta figura, és degut a que no van presentar cap alteració en l'estudi de CGH.

Els adenomes sincrònics dels pacients amb FAP van mostrar també patrons comuns d'evolució molecular. De fet, la determinació filogenètica que van proporcionar les dades obtingudes a partir de AP-PCR (treball 6 de resultats), van evidenciar múltiples alteracions comuns entre les xarxes complexes que es van obtenir, aquestes alteracions no es donaven a l'atzar. La manca d'ordenació en sèrie en la majoria dels

casos no fa creïble l'existència d'un ordre preferent en l'acumulació de dany genòmic, tot i que és possible fer un seguiment de subfamílies d'adenomes en un pacient. Aquestes observacions suggereixen que la major part del dany genòmic que es detecta per AP-PCR és probablement una manifestació de inestabilitat genètica intrínseca. Conseqüentment, els perfils genètics comuns podrien estar més relacionats amb la susceptibilitat de certes regions cromosòmiques a ser alterades que amb l'existència de pressions selectives.

La relació entre els adenomes sincrònics que es va observar mitjançant l'anàlisi molecular, va ser fortament recolzada pel resultat de CGH. El fet que tumors sincrònics d'un mateix pacient mostressin alteracions recurrents, suggereix l'existència de camins evolutius comuns, això concorda amb treballs previs de citogenètica clàssica en lesions colorectals sincròniques, o de CGH en carcinomes de PRC. Bomme i col. (1998) després de realitzar estudis de citogenètica clàssica en adenomes sincrònics de colon, van descriure que adenomes d'un mateix pacient compartien alteracions cariotípiques iguals. En altres estudis realitzats comparant tumors malignes i benignes d'un mateix pacient, es descriuen en els cariotips no només les mateixes alteracions numèriques, sinó que també s'observen alteracions estructurals idèntiques (Bardi et al. 1997). Aquests resultats es veuen a més a més recolzats per altres estudis realitzats en un altre tipus de tumors sincrònics com és el cas de HPRCC, on es descriuen patrons d'alteracions molt similars entre membres d'una mateixa família (Bentz et al. 1996); (treball 5 de resultats).

Per tant en diversos estudis s'ha pogut comprovar l'existència d'una forta similitud entre els cariotips obtinguts en lesions sincròniques independents d'un mateix pacient o de pacients diferents. Així, la predisposició genètica dels pacients amb FAP podria condicionar l'adquisició d'alteracions genòmiques en subregions cromosòmiques específiques. Alternativament, la selecció de cèl·lules portadores de desequilibris cromosòmics ja podria haver ocorregut.

Per tant la classificació de perfils genètics de tumors independents en arbres filogenètics pot contribuir a descriure les seves relacions històriques. Els adenomes FAP i els carcinomes de diferents pacients mostren com hem vist camins comuns d'evolució genètica. La nostra hipòtesis proposa que camins restrictius són seleccionats durant la progressió primerenca del tumor en pacients afectats de FAP. Aleshores, es podria postular un escenari on la inestabilitat genètica incrementada per causes genètiques que modulés contínuament la divergència clonal. Diferents factors podrien condicionar l'evolució molecular d'aquests tumors: a) el *background* genètic (és a dir, la naturalesa molecular de la mutació del gen *APC* o d'altres alteracions

genètiques que condueixin a fenotips sobreposats b) un origen embrionari comú; i c) una mateixa exposició a agents carcinògens.

El fet de que alteracions idèntiques també es detectin en diferents tumors de pacients afectats per HPRC, suggereix que aquells tumors que presenten una alteració constitucional comú, ja sigui mutacions en *APC* o *MET* condiciona una via d'evolució genètica determinada. Els resultats obtinguts en el càncer de bufeta juntament amb els obtinguts per Hoglund i col. (2001a; 2001b; 2002a; 2002b; 2003; 2005) en diversos tumors epitelials suggereixen la presència de determinades vies d'evolució cromosòmica en el càncer. Podríem pensar que els tumors de tipus hereditari, en compartir la mateixa mutació germinal, presentin uns patrons d'evolució encara més restrictius que els tumors esporàdics; explicant aquest fet la presència d'alteracions idèntiques en tumors independents del mateix pacient.

CONCLUSIONS

Referents al mètode:

1. La tècnica de CGH, no solament permet detectar els desequilibris genòmics presents a les cèl·lules tumorals, sinó que també permet portar a terme estudis de clonalitat i detectar diferents patrons convergents o divergents d'evolució cromosòmica.
2. El disseny d'un nou protocol de tinció amb blau de toluidina i posterior aplicació de FISH sobre talls de parafina, facilita l'anàlisi dels tumors ja que permet superposar la informació histopatològica i genètica en una mateixa secció del teixit analitzat.

Referents als tumors urotelials:

3. En tumors de cèl·lules transicionals de bufeta, el dany genòmic augmenta a mida que augmenta l'estadi i grau tumoral. Els desequilibris més freqüents corresponen a pèrdues de 9q, 9p, 5q, 8p i guanys de 1q, Xq, 17q, 8q i 20q.
4. Les pèrdues de 5q, 9p, 9q, 10q, 8p, 11q, 18q i els guanys de 8q, 10p presenten diferències significatives entre tumors pTa i pT1 mentre que els guanys a 5p, 7p, 3p, 10p i pèrdua de 6q són significativament més freqüents en tumors pT2-T4 que en tumors pT1.
5. L'estudi del gen *CCND1* mitjançant la tècnica de FISH ha mostrat que l'amplificació d'aquest gen en tumors superficials o mínimament invasius és superior a la detectada per CGH (12.5% *versus* 2.5% respectivament).
6. La classificació de tumors superficials o mínimament invasius en funció dels patrons de desequilibris genètics observats, posa de manifest l'existència de tres subgrups: el primer es caracteritza per la predominança de guanys, essent +1q, +1p, +17q, +19p els més freqüents. El segon es caracteritza per pèrdues afectant principalment a 9q, 9p, 11q, 8p, 5q, 11p. La presència d'un nombre baix de desequilibris caracteritza al tercer grup.

7. L'existència de dos subgrups dins dels tumors superficials amb cariotips complexes suggereix que aquests podrien evolucionar a partir de com a mínim dues vies divergents una caracteritzada per guanys i l'altre per pèrdues.
8. La presència de desequilibris compartits per diferents tumors sincrònics d'un mateix pacient confirma el seu origen monoclonal i permet traçar les vies d'evolució a partir d'un únic tumor original.

Referents als tumors sincrònics de tipus hereditari:

9. En tumors renals papil·lars de tipus familiar (HPRC), la duplicació del gen *MET* portador de la mutació germinal va associada a la trisomia 7. En aquells tumors amb tetrasomia 7 es dupliquen l'al·lel normal i el mutant.
10. La presència d'alteracions cromosòmiques estructurals idèntiques en diferents tumors d'un mateix pacient afectat de HPRC, suggereix un origen embrionari comú o que la predisposició genètica pot condicionar l'adquisició d'alteracions a regions cromosòmiques específiques.
11. Els diferents adenomes d'un mateix pacient afectat de FAP mostren una clara relació genètica indicant un patró comú d'evolució. Aquest fet suggereix, de nou, que la predisposició genètica pot condicionar l'adquisició d'alteracions genòmiques en subregions cromosòmiques específiques.
12. Els patrons d'evolució genètica en tumors de tipus familiar (HPRC i FAP) són restrictius i poden ser resultat d'un condicionament genètic o ambiental comuns.

BIBLIOGRAFIA

A

- Adams J, Williams SV, Aveyard JS, Knowles MA (2005) Loss of heterozygosity analysis and DNA copy number measurement on 8p in bladder cancer reveals two mechanisms of allelic loss. *Cancer Res* 65: 66-75
- Albertson DG, Ylstra B, Seagraves R, Collins C, Dairkee SH, Kowbel D, Kuo WL, Gray JW, Pinkel D (2000) Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *Nat Genet* 25: 144-6
- Al-Mulla F, Keith WN, Pickford IR, Going JJ, Birnie GD (1999) Comparative genomic hybridization analysis of primary colorectal carcinomas and their synchronous metastases. *Genes Chromosomes Cancer* 24: 306-14
- Aragane H, Sakakura C, Nakanishi M, Yasuoka R, Fujita Y, Taniguchi H, Hagiwara A, Yamaguchi T, Abe T, Inazawa J, Yamagishi H (2001) Chromosomal aberrations in colorectal cancers and liver metastases analyzed by comparative genomic hybridization. *Int J Cancer* 94: 623-9
- Astler VB, Collier FA (1954) The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 139: 846-852
- Audebert M, Chevillard S, Levalois C, Gyapay G, Vieillefond A, Klijanienko J, Vielh P, El Naggar AK, Oudard S, Boiteux S, Radicella JP (2000) Alterations of the DNA repair gene OGG1 in human clear cell carcinomas of the kidney. *Cancer Res* 60: 4740-4

B

- Bakkar AA, Wallerand H, Radvanyi F, Lahaye JB, Pissard S, Lecerf L, Kouyoumdjian JC, Abbou CC, Pairon JC, Jaurand MC, Thiery JP, Chopin DK, de Medina SG (2003) FGFR3 and TP53 gene mutations define two distinct pathways in urothelial cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* 63: 8108-12
- Balint E, Vousden K (2001) Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein. *Br J Cancer* 85: 1813-1823
- Barbacid M (1987) ras genes. *Annu Rev Biochem* 56: 779-827
- Bardi G, Johansson B, Pandis N, Bak-Jensen E, Orndal C, Heim S, Mandahl N, Andren-Sandberg A, Mitelman F (1993) Cytogenetic aberrations in colorectal adenocarcinomas and their correlation with clinicopathologic features. *Cancer* 71: 306-14

- Bardi G, Sukhikh T, Pandis N, Fenger C, Kronborg O, Heim S (1995) Karyotypic characterization of colorectal adenocarcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 12: 97-109
- Bardi G, Parada LA, Bomme L, Pandis N, Willen R, Johansson B, Jeppsson B, Beroukas K, Heim S, Mitelman F (1997) Cytogenetic comparisons of synchronous carcinomas and polyps in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 76: 765-9
- Bentz M, Bergerheim US, Li C, Joos S, Werner CA, Baudis M, Gnarra J, Merino MJ, Zbar B, Linehan WM, Lichter P (1996) Chromosome imbalances in papillary renal cell carcinoma and first cytogenetic data of familial cases analyzed by comparative genomic hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 75: 17-21
- Bernués M, Casadevall C, Miró R, Caballín MR, Villavicencio H, Salvador J, Zamarron A, Egozcue J (1995) Cytogenetic characterization of a familial papillary renal cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 84: 123-7
- Berrozpe G, Miró R, Caballín MR, Salvador J, Egozcue J (1990) Trisomy 7 may be a primary change in noninvasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Genet. Cytogenet.* 50: 9-14
- Blaveri E, Brewer JL, Roydasgupta R, Fridlyand J, DeVries S, Koppie T, Pejavar S, Mehta K, Carroll P, Simko JP, Waldman FM (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, Waldman FM (2005b) Bladder cancer outcome and subtype classification by gene expression. *Clin Cancer Res* 11: 4044-55
- Bodmer W, Bishop T, Karran P (1994) Genetic steps in colorectal cancer. *Nat Genet* 6: 217-219
- Bodmer D, van den Hurk W, van Groningen JJ, Eleveld MJ, Martens GJ, Weterman MA, van Kessel AG (2002) Understanding familial and non-familial renal cell cancer. *Hum Mol Genet* 11: 2489-98
- Bodmer D, Schepens M, Eleveld MJ, Schoenmakers EF, Geurts van Kessel A (2003) Disruption of a novel gene, DIRC3, and expression of DIRC3-HSPBAP1 fusion transcripts in a case of familial renal cell cancer and t(2;3)(q35;q21). *Genes Chromosomes Cancer* 38: 107-16
- Boldog FL, Gemmill RM, Wilke CM, Glover TW, Nilsson AS, Chandrasekharappa SC, Brown RS, Li FP, Drabkin HA (1993) Positional cloning of the hereditary renal carcinoma 3;8 chromosome translocation breakpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 8509-13

- Bomme L, Bardi G, Pandis N, Fenger C, Kronborg O, Heim S (1994) Clonal karyotypic abnormalities in colorectal adenomas: clues to the early genetic events in the adenoma-carcinoma sequence. *Genes Chromosomes Cancer* 10: 190-6
- Bomme L, Bardi G, Pandis N, Fenger C, Kronborg O, Heim S (1996) Chromosome abnormalities in colorectal adenomas: two cytogenetic subgroups characterized by deletion of 1p and numerical aberrations. *Hum Pathol* 27: 1192-7
- Bomme L, Bardi G, Pandis N, Fenger C, Kronborg O, Heim S (1998) Cytogenetic analysis of colorectal adenomas: karyotypic comparisons of synchronous tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 106: 66-71
- Breivik J, Meling GI, Spurkland A, Rognum TO, Gaudernack G (1994) K-ras mutation in colorectal cancer: relations to patient age, sex and tumour location. *Br J Cancer* 69: 367-71
- Bringuier PP, Umbas R, Schaafsma HE, Karthaus HF, Debruyne FM, Schalken JA (1993) Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors. *Cancer Res* 53: 3241-5
- Bringuier PP, Tamimi Y, Schuurin E, Schalken J (1996) Expression of cyclin D1 and EMS1 in bladder tumours; relationship with chromosome 11q13 amplification. *Oncogene* 12: 1747-53
- Brooks JD, Bova GS, Marshall FF, Isaacs WB (1993) Tumor suppressor gene allelic loss in human renal cancers. *J Urol* 150: 1278-83
- Bruch J, Wöhr G, Hautmann R, Mattfeldt T, Bruderlein S, Moller P, Sauter S, Hameister H, Vogel W, Paiss T (1998) Chromosomal changes during progression of transitional cell carcinoma of the bladder and delineation of the amplified interval on chromosome arm 8q. *Genes Chromosomes Cancer* 23: 167-74
- Burt R (2000) Colon cancer screening. *Gastroenterology* 119: 837-853

C

- Cairns P, Shaw ME, Knowles MA (1993) Preliminary mapping of the deleted region of chromosome 9 in bladder cancer. *Cancer Res* 53: 1230-2
- Cao L, Yao Y, Lee V, Kiani C, Spaner D, Lin Z, Zhang Y, Adams ME, Yang BB (2000) Epidermal growth factor induces cell cycle arrest and apoptosis of squamous carcinoma cells through reduction of cell adhesion. *J Cell Biochem* 77: 569-83
- Cappellen D, De Oliveira C, Ricol D, de Medina S, Bourdin J, Sastre-Garau X, Chopin D, Thiery JP, Radvanyi F (1999) Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat Genet* 23: 18-20

- Chang F, Syrjänen S, Syrjänen K (1995) Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. *J Clin Oncol* 13: 1009-22
- Cher ML, MacGrogan D, Bookstein R, Brown JA, Jenkins RB, Jensen RH (1994) Comparative genomic hybridization, allelic imbalance, and fluorescence in situ hybridization on chromosome 8 in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 11: 153-62
- Choi C, Kim MH, Juhng SW, Oh BR (2000) Loss of heterozygosity at chromosome segments 8p22 and 8p11.2-21.1 in transitional-cell carcinoma of the urinary bladder. *Int J Cancer* 86: 501-5
- 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
- Chung DC, Rustgi AK (1995) DNA mismatch repair and cancer. *Gastroenterology* 109: 1685-99
- Cianciulli AM, Leonardo C, Guadagni F, Marzano R, Iori F, De Nunzio C, Franco G, Merola R, Laurenti C (2003) Genetic instability in superficial bladder cancer and adjacent mucosa: an interphase cytogenetic study. *Hum Pathol* 34: 214-21
- Cohen A, Li F, Berg S, Marchetto D, Tsai S, Jacobs S, Brown R (1979) Hereditary renal-cell carcinoma associated with a chromosomal translocation. *New Engl J Med* 301: 592-595
- Contractor H, Zariwala M, Bugert P, Zeisler J, Kovacs G (1997) Mutation of the p53 tumour suppressor gene occurs preferentially in the chromophobe type of renal cell tumour. *J Pathol* 181: 136-9
- Coogan CL, Estrada CR, Kapur S, Bloom KJ (2004) HER-2/neu protein overexpression and gene amplification in human transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 63: 786-90
- Coombs LM, Pigott DA, Sweeney E, Proctor AJ, Eydmann ME, Parkinson C, Knowles MA (1991) Amplification and over-expression of c-erbB-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Br J Cancer* 63: 601-8
- Cordon-Cardo C, Wartinger D, Petrylak D, Dalbagni G, Fair WR, Fuks Z, Reuter VE (1992) Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 84: 1251-6
- Corless CL, Aburatani H, Fletcher JA, Housman DE, Amin MB, Weinberg DS (1996) Papillary renal cell carcinoma: quantitation of chromosomes 7 and 17 by FISH, analysis of chromosome 3p for LOH, and DNA ploidy. *Diagn Mol Pathol* 5: 53-64

- Cote RJ, Dunn MD, Chatterjee SJ, Stein JP, Shi SR, Tran QC, Hu SX, Xu HJ, Groshen S, Taylor CR, Skinner DG, Benedict WF (1998) Elevated and absent pRb expression is associated with bladder cancer progression and has cooperative effects with p53. *Cancer Res* 58: 1090-4
- Czerniak B, Chaturvedi V, Li L, Hodges S, Johnston D, Roy JY, Luthra R, Logothetis C, Von Eschenbach AC, Grossman HB, Benedict WF, Batsakis JG (1999) Superimposed histologic and genetic mapping of chromosome 9 in progression of human urinary bladder neoplasia: implications for a genetic model of multistep urothelial carcinogenesis and early detection of urinary bladder cancer. *Oncogene* 18: 1185-96
- 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

D

- Dal Cin P, Stas M, Sciot R, De Wever I, Van Damme B, Van den Berghe H (1998) Translocation (X;1) reveals metastasis 31 years after renal cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 101: 58-61
- Dal Cin P, Roskams T, De Vos R, Van Poppel H, Balzarini P, Van Den Berghe H (2000) Involvement of chromosomes 1 and 18 in renal cell tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 116: 54-8
- Dalbagni G, Presti J, Reuter V, Fair WR, Cordon-Cardo C (1993) Genetic alterations in bladder cancer. *Lancet* 342: 469-71
- Dalbagni G, Ren ZP, Herr H, Cordon-Cardo C, Reuter V (2001) Genetic alterations in tp53 in recurrent urothelial cancer: a longitudinal study. *Clin Cancer Res* 7: 2797-801
- De Angelis PM, Clausen OP, Schjolberg A, Stokke T (1999) Chromosomal gains and losses in primary colorectal carcinomas detected by CGH and their associations with tumour DNA ploidy, genotypes and phenotypes. *Br J Cancer* 80: 526-35
- de Braud F, Maffezzini M, Vitale V, Bruzzi P, Gatta G, Hendry WF, Sternberg CN (2002) Bladder cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 41: 89-106
- de la Chapelle A (2004) Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 4: 769-80
- Decker HJ, Neumann HP, Walter TA, Sandberg AA (1988) 3p involvement in a renal cell carcinoma in von Hippel-Lindau syndrome. Region of tumor breakpoint clustering on 3p? *Cancer Genet Cytogenet* 33: 59-65

- Dijkhuizen T, van den Berg E, Storkel S, de Vries B, van der Veen AY, Wilbrink M, Geurts van Kessel A, de Jong B (1997) Renal oncocytoma with t(5;12;11), der(1)1;8) and add(19): "true" oncocytoma or chromophobe adenoma? *Int J Cancer* 73: 521-4
- Dobin SM, Harris CP, Reynolds JA, Coffield KS, Klugo RC, Peterson RF, Speights VO (1992) Cytogenetic abnormalities in renal oncocytic neoplasms. *Genes Chromosomes Cancer* 4: 25-31
- Dreijerink K, Braga E, Kuzmin I, Geil L, Duh FM, Angeloni D, Zbar B, Lerman MI, Stanbridge EJ, Minna JD, Protopopov A, Li J, Kashuba V, Klein G, Zbarovsky ER (2001) The candidate tumor suppressor gene, RASSF1A, from human chromosome 3p21.3 is involved in kidney tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 7504-9
- Druck T, Podolski J, Byrski T, Wyrwicz L, Zajaczek S, Kata G, Borowka A, Lubinski J, Huebner K (2001) The DIRC1 gene at chromosome 2q33 spans a familial RCC-associated t(2;3)(q33;q21) chromosome translocation. *J Hum Genet* 46: 583-9
- Duggan BJ, Gray SB, McKnight JJ, Watson CJ, Johnston SR, Williamson KE (2004) Oligoclonality in bladder cancer: the implication for molecular therapies. *J Urol* 171: 419-25
- Dukes (1932) The classification of cancer of the rectum. *The Journal of Pathology* 35: 323

E

- Edwards J, Duncan P, Going JJ, Watters AD, Grigor KM, Bartlett JM (2002) Identification of loci associated with putative recurrence genes in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *J Pathol* 196: 380-5
- Eleveld MJ, Bodmer D, Merx G, Siepmann A, Sprenger SH, Weterman MA, Ligtenberg MJ, Kamp J, Stapper W, Jeuken JW, Smeets D, Smits A, Geurts Van Kessel A (2001) Molecular analysis of a familial case of renal cell cancer and a t(3;6)(q12;q15). *Genes Chromosomes Cancer* 31: 23-32
- Emanuel A, Szucs S, Weier HU, Kovacs G (1992) Clonal aberrations of chromosomes X, Y, 7 and 10 in normal kidney tissue of patients with renal cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 4: 75-7
- Eppert K, Scherer SW, Ozcelik H, Pirone R, Hoodless P, Kim H, Tsui LC, Bapat B, Gallinger S, Andrulis IL, Thomsen GH, Wrana JL, Attisano L (1996) MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell* 86: 543-52

Erbersdobler A, Friedrich MG, Schwaibold H, Henke RP, Huland H (1998) Microsatellite alterations at chromosomes 9p, 13q, and 17p in nonmuscle-invasive transitional cell carcinomas of the urinary bladder. *Oncol Res* 10: 415-20

F

Fadl-Elmula I, Gorunova L, Mandahl N, Elfving P, Lundgren R, Mitelman F, Heim S (1999) Cytogenetic monoclonality in multifocal uroepithelial carcinomas: evidence of intraluminal tumour seeding. *Br J Cancer* 81: 6-12

Fadl-Elmula I, Gorunova L, Mandahl N, Elfving P, Lundgren R, Mitelman F, Heim S (2000) Karyotypic characterization of urinary bladder transitional cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 29: 256-65

Fadl-Elmula I (2005) Chromosomal changes in uroepithelial carcinomas. *Cell Chromosome* 4: 1

Falor WH, Ward-Skinner RM (1988) The importance of marker chromosomes in superficial transitional cell carcinoma of the bladder: 50 patients followed up to 17 years. *J Urol* 139: 929-32

Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767

Fearon ER, Jones PA (1992) Progressing toward a molecular description of colorectal cancer development. *Faseb J* 6: 2783-2790

Fischer J, Palmedo G, von Knobloch R, Bugert P, Prayer-Galetti T, Pagano F, Kovacs G (1998) Duplication and overexpression of the mutant allele of the MET proto-oncogene in multiple hereditary papillary renal cell tumours. *Oncogene* 17: 733-9

Fodde R, Smits R, Clevers H (2001) APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nature Rev* 1: 55-67

Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG (2004) Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 145: 5439-47

Fuhrman S, Lasky L, Limas C (1982) Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 6: 655-663

Fuzesi L, Cober M, Mittermayer C (1992) Collecting duct carcinoma: cytogenetic characterization. *Histopathology* 21: 155-60

G

- Gallucci M, Guadagni F, Marzano R, Leonardo C, Merola R, Sentinelli S, Ruggeri EM, Cantiani R, Sperduti I, Lopez Fde L, Cianciulli AM (2005) Status of the p53, p16, RB1, and HER-2 genes and chromosomes 3, 7, 9, and 17 in advanced bladder cancer: correlation with adjacent mucosa and pathological parameters. *J Clin Pathol* 58: 367-71
- Gibas E, Gibas L (1997) Cytogenetics of bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 95: 108-115
- Gibas Z, Prout G, Connolly J, Pontes JE, Sandberg AA (1984) Non random chromosomal changes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* 44: 1257-1264
- Gisselsson D, Jonson T, Petersen A, Strombeck B, Dal Cin P, Hoglund M, Mitelman F, Mertens F, Mandahl N (2001) Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 12683-8
- Goetz SE, Vogelstein B, Hamilton SR, Feinberg AP (1985) Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science* 228: 187-90
- Gontero P, Banisadr S, Frea B, Brausi M (2004) Metastasis markers in bladder cancer: a review of the literature and clinical considerations. *Eur Urol* 46: 296-311
- Goto K, Konomoto T, Hayashi K, Kinukawa N, Naito S, Kumazawa J, Tsuneyoshi M (1997) p53 mutations in multiple urothelial carcinomas: a molecular analysis of the development of multiple carcinomas. *Mod Pathol* 10: 428-37
- Grady WM, Markowitz SD (2002) Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 3: 101-28
- Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M, et al. (1991) Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 66: 589-600
- Gronwald J, Storkel S, Holtgreve-Grez H, Hadaczek P, Brinkschmidt C, Jauch A, Lubinski J, Cremer T (1997) Comparison of DNA gains and losses in primary renal clear cell carcinomas and metastatic sites: importance of 1q and 3p copy number changes in metastatic events. *Cancer Res* 57: 481-7
- Gunlusoy B, Degirmenci T, Arslan M, Nergiz N, Minareci S, Ayder AR (2005) Recurrence and progression of T1G3 transitional cell carcinoma of the bladder treated with intravesical bacillus Calmette-Guerin. *Urol Int* 75: 107-13

H

- Habuchi T, Ogawa O, Kakehi Y, Ogura K, Koshiba M, Hamazaki S, Takahashi R, Sugiyama T, Yoshida O (1993a) Accumulated allelic losses in the development of invasive urothelial cancer. *Int J Cancer* 53: 579-84
- Habuchi T, Takahashi S, Yamada H, Kakehi Y, Sugiyama T, Yoshida O (1993b) Metachronous multifocal development of urothelial cancer by intraluminal seeding. *Lancet* 342: 1087-1088
- Habuchi T, Devlin J, Elder PA, Knowles MA (1995) Detailed deletion mapping of chromosome 9q in bladder cancer: evidence for two tumour suppressor loci. *Oncogene* 11: 1671-4
- Habuchi T, Takahashi T, Kakinuma H, Wang L, Tsuchiya N, Satoh S, Akao T, Sato K, Ogawa O, Knowles MA, Kato T (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
- Hafner C, Knuechel R, Zanardo L, Dietmaier W, Blaszyk H, Chevillat J, Hofstaedter F, Hartmann A (2001) Evidence for oligoclonality and tumor spread by intraluminal seeding in multifocal urothelial carcinomas of the upper and lower urinary tract. *Oncogene* 20: 4910-5
- Hafner C, Knuechel R, Stoehr R, Hartmann A (2002) Clonality of multifocal urothelial carcinomas: 10 years of molecular genetic studies. *Int J Cancer* 101: 1-6
- Hartmann A, Schlake G, Zaak D, Hungerhuber E, Hofstetter A, Hofstaedter F, Knuechel R (2002) Occurrence of chromosome 9 and p53 alterations in multifocal dysplasia and carcinoma in situ of human urinary bladder. *Cancer Res* 62: 809-18
- Heimann P, El Housni H, Ogur G, Weterman MA, Petty EM, Vassart G (2001) Fusion of a novel gene, RCC17, to the TFE3 gene in t(X;17)(p11.2;q25.3)-bearing papillary renal cell carcinomas. *Cancer Res* 61: 4130-5
- Heinimann K, Mullhaupt B, Weber W, Attenhofer M, Scott RJ, Fried M, Martinoli S, Muller H, Dobbie Z (1998) Phenotypic differences in familial adenomatous polyposis based on APC gene mutation status. *Gut* 43: 675-9
- Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, Samid D, Duan DS, Gnarr JR, Linehan WM, et al. (1994) Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 9700-4
- Hermesen M, Postma C, Baak J, Weiss M, Rapallo A, Sciutto A, Roemen G, Arends JW, Williams R, Giaretti W, De Goeij A, Meijer G (2002) Colorectal adenoma to

- carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability. *Gastroenterology* 123: 1109-19
- Hernandez-Marti MJ, Orellana-Alonso C, Badia-Garrabou L, Verdeguer Miralles A, Paradis-Alos A (1995) Renal adenocarcinoma in an 8-year-old child, with a t(X;17)(p11.2;q25). *Cancer Genet Cytogenet* 83: 82-3
- Hoglund M, Gisselsson D, Mandahl N, Johansson B, Mertens F, Mitelman F, Sall T (2001a) Multivariate analyses of genomic imbalances in solid tumors reveal distinct and converging pathways of karyotypic evolution. *Genes Chromosomes Cancer* 31: 156-71
- Hoglund M, Sall T, Heim S, Mitelman F, Mandahl N, Fadl-Elmula I (2001b) Identification of cytogenetic subgroups and karyotypic pathways in transitional cell carcinoma. *Cancer Res* 61: 8241-6
- Hoglund M, Gisselsson D, Hansen GB, Sall T, Mitelman F, Nilbert M (2002a) Dissecting karyotypic patterns in colorectal tumors: two distinct but overlapping pathways in the adenoma-carcinoma transition. *Cancer Res* 62: 5939-46
- Hoglund M, Gisselsson D, Sall T, Mitelman F (2002b) Coping with complexity. multivariate analysis of tumor karyotypes. *Cancer Genet Cytogenet* 135: 103-9
- Hoglund M, Gisselsson D, Hansen GB, Sall T, Mitelman F (2003) Ovarian carcinoma develops through multiple modes of chromosomal evolution. *Cancer Res* 63: 3378-85
- Hoglund M, Frigyesi A, Sall T, Gisselsson D, Mitelman F (2005) Statistical behavior of complex cancer karyotypes. *Genes Chromosomes Cancer* 42: 327-41
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris C (1991) P53 mutations in human cancer. *Science* 253: 49-53
- Holmang S, Andius P, Hedelin H, Wester K, Busch C, Johansson SL (2001) Stage progression in Ta papillary urothelial tumors: relationship to grade, immunohistochemical expression of tumor markers, mitotic frequency and DNA ploidy. *J Urol* 165: 1124-8; discussion 1128-30
- Hopman AH, Moesker O, Smeets AW, Pauwels RP, Vooijs GP, Ramaekers FC (1991) Numerical chromosome 1, 7, 9, and 11 aberrations in bladder cancer detected by in situ hybridization. *Cancer Res* 51: 644-51
- Horowitz JM, Park SH, Bogenmann E, Cheng JC, Yandell DW, Kaye FJ, Minna JD, Dryja TP, Weinberg RA (1990) Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 2775-9

- Houlston R, Crabtree M, Phillips R, Tomlinson I (2001) Explaining differences in the severity of familial adenomatous polyposis and the search for modifier genes. *Gut* 48: 1-5
- Hovey RM, Chu L, Balazs M, DeVries S, Moore D, Sauter G, Carroll PR, Waldman FM (1998) Genetic alterations in primary bladder cancers and their metastases. *Cancer Res* 58: 3555-60
- Huang X, Gollin SM, Raja S, Godfrey TE (2002) High-resolution mapping of the 11q13 amplicon and identification of a gene, TAOS1, that is amplified and overexpressed in oral cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11369-74
- Huguet J, Crego M, Sabate S, Salvador J, Palou J, Villavicencio H (2005) Cystectomy in patients with high risk superficial bladder tumors who fail intravesical BCG therapy: pre-cystectomy prostate involvement as a prognostic factor. *Eur Urol* 48: 53-9; discussion 59
- 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

I

- 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
- Ishikawa J, Xu HJ, Hu SX, Yandell DW, Maeda S, Kamidono S, Benedict WF, Takahashi R (1991) Inactivation of the retinoblastoma gene in human bladder and renal cell carcinomas. *Cancer Res* 51: 5736-43

J

- Jiang F, Richter J, Schraml P, Bubendorf L, Gasser T, Sauter G, Mihatsch MJ, Moch H (1998) Chromosomal imbalances in papillary renal cell carcinoma: genetic differences between histological subtypes. *Am J Pathol* 153: 1467-73
- Jiang F, Desper R, Papadimitriou CH, Schaffer AA, Kallioniemi OP, Richter J, Schraml P, Sauter G, Mihatsch MJ, Moch H (2000) Construction of evolutionary tree models for renal cell carcinoma from comparative genomic hybridization data. *Cancer Res* 60: 6503-9
- Junker K, Boerner D, Schulze W, Utting M, Schubert J, Werner W (2003) Analysis of genetic alterations in normal bladder urothelium. *Urology* 62: 1134-8

K

- 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 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
- Kanayama H, Lui WO, Takahashi M, Naroda T, Kedra D, Wong FK, Kuroki Y, Nakahori Y, Larsson C, Kagawa S, Teh BT (2001) Association of a novel constitutional translocation t(1q;3q) with familial renal cell carcinoma. *J Med Genet* 38: 165-70
- Kardas I, Denis A, Babinska M, Gronwald J, Podolski J, Zajaczek S, Kram A, Lubinski J, Limon J (1998) Translocation (X;1)(p11.2;q21) in a papillary renal cell carcinoma in a 14-year-old girl. *Cancer Genet Cytogenet* 101: 159-61
- Kiemenev LA, Witjes JA, Heijbroek RP, Verbeek AL, Debruyne FM (1993) Predictability of recurrent and progressive disease in individual patients with primary superficial bladder cancer. *J Urol* 150: 60-4
- Kiemenev LA, Witjes JA, Heijbroek RP, Debruyne FM, Verbeek AL (1994a) Dysplasia in normal-looking urothelium increases the risk of tumour progression in primary superficial bladder cancer. *Eur J Cancer* 30A: 1621-5
- Kiemenev LA, Witjes JA, Heijbroek RP, Koper NP, Verbeek AL, Debruyne FM (1994b) Should random urothelial biopsies be taken from patients with primary superficial bladder cancer? A decision analysis. Members of the Dutch South-East Co-Operative Urological Group. *Br J Urol* 73: 164-71
- Kim ES, Khuri FR, Herbst RS (2001) Epidermal growth factor receptor biology (IMC-C225). *Curr Opin Oncol* 13: 506-13
- Kim WY, Kaelin WG (2004) Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol* 22: 4991-5004
- Knosel T, Schluns K, Stein U, Schwabe H, Schlag PM, Dietel M, Petersen I (2004) Chromosomal alterations during lymphatic and liver metastasis formation of colorectal cancer. *Neoplasia* 6: 23-8
- Knowles MA, Cairns JP, Williamson MP, Proctor AJ, Coombs LM, Eydmann ME (1992) Identification of multiple molecular genetic alterations in bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 63: 140-abstract

- Knowles MA, Shaw ME, Proctor AJ (1993) Deletion mapping of chromosome 8 in cancers of the urinary bladder using restriction fragment length polymorphisms and microsatellite polymorphisms. *Oncogene* 8: 1357-64
- Knowles MA, Elder PA, Williamson M, Cairns JP, Shaw ME, Law MG (1994) Allelotype of human bladder cancer. *Cancer Res* 54: 531-8
- Knowles MA (1998) Molecular genetics of bladder cancer: pathways of development and progression. *Cancer Surv* 31: 49-76
- Knowles MA (1999) The genetics of transitional cell carcinoma: progress and potential clinical application. *BJU Int* 84: 412-27
- Knowles MA (2001) What we could do now: molecular pathology of bladder cancer. *Mol Pathol* 54: 215-21
- 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
- Korn WM, Yasutake T, Kuo WL, Warren RS, Collins C, Tomita M, Gray J, Waldman FM (1999) Chromosome arm 20q gains and other genomic alterations in colorectal cancer metastatic to liver, as analyzed by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 25: 82-90
- Kovacs G, Szucs S, De Riese W, Baumgartel H (1987) Specific chromosome aberration in human renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 40: 171-8
- Kovacs G, Hoene E (1988) Loss of der(3) in renal carcinoma cells of a patient with constitutional t(3;12). *Hum Genet* 78: 148-50
- Kovacs G, Brusa P, De Riese W (1989) Tissue-specific expression of a constitutional 3;6 translocation: development of multiple bilateral renal-cell carcinomas. *Int J Cancer* 43: 422-7
- Kovacs G, Fuzesi L, Emanuel A, Kung HF (1991) Cytogenetics of papillary renal cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 3: 249-55
- Kovacs G (1993) Molecular cytogenetics of renal cell tumors. *Adv Cancer Res* 62: 89-124
- Kuukasjarvi T, Karhu R, Tanner M, Kahkonen M, Schaffer A, Nupponen N, Pennanen S, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Isola J (1997) Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer. *Cancer Res* 57: 1597-604

L

- Larramendy ML, El-Rifai W, Knuutila S (1998) Comparison of fluorescein isothiocyanate- and Texas red-conjugated nucleotides for direct labeling in comparative genomic hybridization. *Cytometry* 31: 174-9
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396: 643-9
- Leppert M, Dobbs M, Scambler P, O'Connell P, Nakamura Y, Stauffer D, Woodward S, Burt R, Hughes J, Gardner E, et al. (1987) The gene for familial polyposis coli maps to the long arm of chromosome 5. *Science* 238: 1411-3
- Levine AJ, Momand J, Finlay CA (1991) The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351: 453-6
- Li C, Chen L, Iwata T, Kitagawa M, Fu XY, Deng CX (1999) A Lys644Glu substitution in fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) causes dwarfism in mice by activation of STATs and ink4 cell cycle inhibitors. *Hum Mol Genet* 8: 35-44
- Li FP, Decker HJ, Zbar B, Stanton VP, Jr., Kovacs G, Seizinger BR, Aburatani H, Sandberg AA, Berg S, Hosoe S, Brown RS (1993) Clinical and genetic studies of renal cell carcinomas in a family with a constitutional chromosome 3;8 translocation. *Genetics of familial renal carcinoma. Ann Intern Med* 118: 106-11
- Li M, Cannizzaro LA (1999) Identical clonal origin of synchronous and metachronous low-grade, noninvasive papillary transitional cell carcinomas of the urinary tract. *Hum Pathol* 30: 1197-200
- Linehan WM, Lerman MI, Zbar B (1995) Identification of the von Hippel-Lindau (VHL) gene. Its role in renal cancer. *Jama* 273: 564-70
- Lipponen P, Eskelinen M (1994) Expression of epidermal growth factor receptor in bladder cancer as related to established prognostic factors, oncoprotein (c-erbB-2, p53) expression and long-term prognosis. *Br J Cancer* 69: 1120-5
- Loeb KR, Loeb LA (1999) Genetic instability and the mutator phenotype. *Studies in ulcerative colitis. Am J Pathol* 154: 1621-6
- Logothetis CJ, Xu HJ, Ro JY, Hu SX, Sahin A, Ordonez N, Benedict WF (1992) Altered expression of retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally advanced bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 84: 1256-61
- Longy M, Saura R, Schouler L, Mauhin C, Goussot JF, Grison O, Couzigou P (1990) Chromosomal analysis of colonic adenomatous polyps. *Cancer Genet Cytogenet* 49: 249-57

Lott ST, Lovell M, Naylor SL, Killary AM (1998) Physical and functional mapping of a tumor suppressor locus for renal cell carcinoma within chromosome 3p12. *Cancer Res* 58: 3533-7

M

Malats N, Bustos A, Nascimento CM, Fernandez F, Rivas M, Puente D, Kogevinas M, Real FX (2005) P53 as a prognostic marker for bladder cancer: a meta-analysis and review. *Lancet Oncol* 6: 678-86

Mancilla-Jiménez R, Stanley R, Blath R (1976) Papillary renal cell carcinoma. A clinical, radiologic and pathologic study of 34 cases. *Cancer* 38: 2469-2480

Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. (1995) Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 268: 1336-8

Meijer GA, Hermsen MA, Baak JP, van Diest PJ, Meuwissen SG, Belien JA, Hoovers JM, Joenje H, Snijders PJ, Walboomers JM (1998) Progression from colorectal adenoma to carcinoma is associated with non-random chromosomal gains as detected by comparative genomic hybridisation. *J Clin Pathol* 51: 901-9

Meloni AM, Dobbs RM, Pontes JE, Sandberg AA (1993) Translocation (X;1) in papillary renal cell carcinoma. A new cytogenetic subtype. *Cancer Genet Cytogenet* 65: 1-6

Memon AA, Sorensen BS, Melgard P, Fokdal L, Thykjaer T, Nexø E (2004) Expression of HER3, HER4 and their ligand heregulin-4 is associated with better survival in bladder cancer patients. *Br J Cancer* 91: 2034-41

Messing EM (1992) Growth factors and bladder cancer: clinical implications of the interactions between growth factors and their urothelial receptors. *Semin Surg Oncol* 8: 285-92

Millan-Rodriguez F, Chechile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, Palou J, Vicente-Rodriguez J (2000) Multivariate analysis of the prognostic factors of primary superficial bladder cancer. *J Urol* 163: 73-8

Miyaki M, Iijima T, Konishi M, Sakai K, Ishii A, Yasuno M, Hishima T, Koike M, Shitara N, Iwama T, Utsunomiya J, Kuroki T, Mori T (1999) Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene* 18: 3098-103

Miyao N, Tsai S, Lerner SP, Olumi AF, Spruck C, Gonzalez-Zulueta M, Nichols PW, Skinner DG, Jones P (1993) Role of chromosome 9 in human bladder cancer. *Cancer Res* 53: 4066-4070

- Moch H, Presti JC, Jr., Sauter G, Buchholz N, Jordan P, Mihatsch MJ, Waldman FM (1996) Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization are associated with clinical outcome in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 56: 27-30
- Moriarty HT, Webster LR (2003) Fragile sites and bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 140: 89-98
- Morita R, Saito S, Ishikawa J, Ogawa O, Yoshida O, Yamakawa K, Nakamura Y (1991) Common regions of deletion on chromosomes 5q, 6q, and 10q in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 51: 5817-20
- Moriyama M, Akiyama T, Yamamoto T, Kawamoto T, Kato T, Sato Watanuki T, Hikage T, Katsuta N, Mori S (1991) Expression of *erb-2* gene product in urinary bladder cancer. *J Urol* 145: 423-427
- Mulders PF, Hoekstra WJ, Heybroek RP, Schapers ER, Verbeek AL, Oosterhof GO, Debruyne FM (1994) Prognosis and treatment of T1G3 bladder tumours. A prognostic factor analysis of 121 patients. Dutch South Eastern Bladder Cancer Study Group. *Eur J Cancer* 30A: 914-7
- Muleris M, Salmon RJ, Dutrillaux B (1988) Existence of two distinct processes of chromosomal evolution in near-diploid colorectal tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 32: 43-50
- Muleris M, Salmon RJ, Dutrillaux B (1990) Cytogenetics of colorectal adenocarcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 46: 143-56
- Muleris M, Zafrani B, Validire P, Girodet J, Salmon RJ, Dutrillaux B (1994) Cytogenetic study of 30 colorectal adenomas. *Cancer Genet Cytogenet* 74: 104-8
- Muto S, Horie S, Takahashi S, Tomita K, Kitamura T (2000) Genetic and epigenetic alterations in normal bladder epithelium in patients with metachronous bladder cancer. *Cancer Res* 60: 4021-5

N

- Nacheva EP, Grace CD, Bittner M, Ledbetter DH, Jenkins RB, Green AR (1998) Comparative genomic hybridization: a comparison with molecular and cytogenetic analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 100: 93-105
- Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S, Hedge P (1991) Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 253: 665-669
- Nishiyama H, Hornigold N, Davies AM, Knowles MA (1999a) A sequence-ready 840-kb PAC contig spanning the candidate tumor suppressor locus DBC1 on human chromosome 9q32-q33. *Genomics* 59: 335-8

Nishiyama H, Takahashi T, Kakehi Y, Habuchi T, Knowles MA (1999b) Homozygous deletion at the 9q32-33 candidate tumor suppressor locus in primary human bladder cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 26: 171-5

Nowak MA, Komarova NL, Sengupta A, Jallepalli PV, Shih Ie M, Vogelstein B, Lengauer C (2002) The role of chromosomal instability in tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16226-31

O

Olumi AF, Tsai YC, Nichols PW, Skinner DG, Cain DR, Bender LI, Jones PA (1990) Allelic loss of chromosome 17p distinguishes high grade from low grade transitional cell carcinomas of the bladder. *Cancer Res* 50: 7081-3

Orlow I, Lianes P, Lacombe L, Dalbagni G, Reuter VE, Cordon-Cardo C (1994) Chromosome 9 allelic losses and microsatellite alterations in human bladder tumors. *Cancer Res* 54: 2848-51

Ornitz DM, Itoh N (2001) Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2: REVIEWS3005

P

Pathak S, Strong LC, Ferrell RE, Trindade A (1982) Familial renal cell carcinoma with a 3;11 chromosome translocation limited to tumor cells. *Science* 217: 939-41

Petersen I, Ohgaki H, Ludeke BI, Kleihues P (1993) p53 mutations in phenacetin-associated human urothelial carcinomas. *Carcinogenesis* 14: 2119-22

Polascik TJ, Cairns P, Epstein JI, Fuzesi L, Ro JY, Marshall FF, Sidransky D, Schoenberg M (1996) Distal nephron renal tumors: microsatellite allelotype. *Cancer Res* 56: 1892-5

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, Miró R. The clonal relationship between synchronous urothelial tumors is similar to that observed among the subclones of the same tumor. *Cancer Letters*. (Enviat).

Prat E, Camps J, del Rey J, Ponsa I, Campillo M, Gelabert A, Algaba F, Egozcue J, Miró R. CGH analysis reveals different subgroups in early stage bladder tumors. *Cancer Genetics and Cytogenetics* (Enviat).

- Prat E, Bernués M, del Rey J, Camps J, Ponsa I, Algaba F, Egozcue J, Caballín MR, Gelabert A, Miró R. Common pattern of unusual chromosome abnormalities in hereditary papillary renal carcinoma. *Cancer Genet Cytogene.* (En premsa)
- Presti JC, Jr., Rao PH, Chen Q, Reuter VE, Li FP, Fair WR, Jhanwar SC (1991a) Histopathological, cytogenetic, and molecular characterization of renal cortical tumors. *Cancer Res* 51: 1544-52
- Presti JC, Reuter VE, Galan T, Fair WR, Cordon-Cardo C (1991b) Molecular genetic alterations in superficial and locally advanced human bladder cancer. *Cancer Res* 51: 5404-5409
- Presti JC, Jr., Moch H, Reuter VE, Cordon-Cardo C, Waldman FM (1996) Renal cell carcinoma genetic analysis by comparative genomic hybridization and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Urol* 156: 281-5

R

- Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, Perucho M (1997) Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 275: 967-9
- Reiter RE, Anglard P, Liu S, Gnarr JR, Linehan WM (1993) Chromosome 17p deletions and p53 mutations in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 53: 3092-7
- Reutzel D, Mende M, Naumann S, Storkel S, Brenner W, Zabel B, Decker J (2001) Genomic imbalances in 61 renal cancers from the proximal tubulus detected by comparative genomic hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 93: 221-7
- Reznikoff CA, Kao C, Messing EM, Newton M, Swaminathan S (1993) A molecular genetic model of human bladder carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 4: 143-52
- Reznikoff CA, Sarkar S, Julicher KP, Burger MS, Puthenveetil JA, Jarrard DF, Newton MA (2000) Genetic alterations and biological pathways in human bladder cancer pathogenesis. *Urol Oncol* 5: 191-203
- Richard F, Muleris M, Dutrillaux B (1994) Chromosome instability in lymphocytes from patients affected by or genetically predisposed to colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 73: 23-32
- Richter H, Slezak P, Walch A, Werner M, Braselmann H, Jaramillo E, Ost A, Hirata I, Takahama K, Zitzelsberger H (2003) Distinct chromosomal imbalances in nonpolypoid and polypoid colorectal adenomas indicate different genetic pathways in the development of colorectal neoplasms. *Am J Pathol* 163: 287-94
- 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, 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, 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
- Ried T, Just KE, Holtgreve-Grez H, du Manoir S, Speicher MR, Schrock E, Latham C, Blegen H, Zetterberg A, Cremer T, et al. (1995) Comparative genomic hybridization of formalin-fixed, paraffin-embedded breast tumors reveals different patterns of chromosomal gains and losses in fibroadenomas and diploid and aneuploid carcinomas. *Cancer Res* 55: 5415-23
- Ried T, Heselmeyer-Haddad K, Blegen H, Schrock E, Auer G (1999) Genomic changes defining the genesis, progression, and malignancy potential in solid human tumors: a phenotype/genotype correlation. *Genes Chromosomes Cancer* 25: 195-204
- Rigola MA, Casadevall C, Bernues M, Caballin MR, Fuster C, Gelabert A, Egozcue J, Miro R (2002) Analysis of kidney tumors by comparative genomic hybridization and conventional cytogenetics. *Cancer Genet Cytogenet* 137: 49-53
- Rooney PH, Murray GI, Stevenson DA, Haites NE, Cassidy J, McLeod HL (1999) Comparative genomic hybridization and chromosomal instability in solid tumours. *Br J Cancer* 80: 862-73
- Rosin MP, Cairns P, Epstein JI, Schoenberg MP, Sidransky D (1995) Partial allelotype of carcinoma in situ of the human bladder. *Cancer Res* 55: 5213-6
- Ross JS, del Rosario AD, Figge HL, Sheehan C, Fisher HA, Bui HX (1995) E-cadherin expression in papillary transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Hum Pathol* 26: 940-4
- Ruppert J, Tokino K, Sidransky D (1993) Evidence for two bladder cancer suppressor loci on human chromosome 9. *Cancer Res* 53: 5093-5095

S

- Sandberg A (1980) *The chromosomal in human cancer and leukemia.*, New York.
- Sandberg AA (1977) Chromosome markers and progression in bladder cancer. *Cancer Res* 37: 2950-6
- Sandberg AA, Berger CS, Haddad FS, Kerr D, Hecht F (1986) Chromosome change in transitional cell carcinoma of ureter. *Cancer Genet Cytogenet* 19: 335-40
- Sandberg AA (1990) *The cromosomes in human cancer and Leukemia.*, 2nd edition edn, New York
- Sandberg AA (1992) Chromosome changes in early bladder neoplasms. *J Cell Biochem Suppl* 16l: 76-9
- 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
- Sandberg AA (2002) Cytogenetics and molecular genetics of bladder cancer: a personal view. *Am J Med Genet* 115: 173-182
- Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, Melamed J, Zhang ZF, Sheinfeld J, Fair WR, Herr HW, Reuter VE (1994) Association of P53 nuclear overexpression and tumor progression in carcinoma in situ of the bladder. *J Urol* 152: 388-92
- Sasaki K, Hamano K, Kinjo M, Hara S (1992) Intratumoral heterogeneity in DNA ploidy of bladder carcinomas. *Oncology* 49: 219-22
- Sauter G, Moch H, Gudat F, Mhatsch MJ, Haley J, Meecker T, Waldman F (1993) Demonstration of gene amplification in urinary bladder cancer by fluorescent in situ hybridization (FISH). *Verh Dtsch Ges Pathol* 77: 247-51
- Sauter G, Deng G, Moch H (1994) Physical deletion of the p53 gene in bladder cancer: Detection by fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol* 144: 756
- Sauter G, Carroll P, Moch H, Kallioniemi A, Kerschmann R, Narayan P, Mihatsch MJ, Waldman F (1995a) c-myc copy number gains in bladder cancer detected by fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol* 146: 1131
- Sauter G, Moch H, Carroll P, Kerschmann R, Mihatsch MJ, Waldman FM (1995b) Chromosome-9 loss detected by fluorescence in situ hybridization in bladder cancer. *Int J Cancer* 64: 99-103
- Sauter G, Moch H, Wagner U, Novotna H, Gasser TC, Mattarelli G, Mihatsch MJ, Waldman FM (1995c) Y chromosome loss detected by FISH in bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 82: 163-9

- Sauter G, Gasser TC, Moch H, Richter J, Jiang F, Albrecht R, Novotny H, Wagner U, Bubendorf L, Mihatsch MJ (1997) DNA aberrations in urinary bladder cancer detected by flow cytometry and FISH. *Urol Res* 25 Suppl 1: S37-43
- Schmid M, Haaf T, Grunert D (1984) 5-Azacytidine-induced undercondensations in human chromosomes. *Hum Genet* 67: 257-63
- Schmidt L, Duh FM, Chen F, Kishida T, Glenn G, Choyke P, Scherer SW, Zhuang Z, Lubensky I, Dean M, Allikmets R, Chidambaram A, Bergerheim UR, Feltis JT, Casadevall C, Zamarron A, Bernues M, Richard S, Lips CJ, Walther MM, Tsui LC, Geil L, Orcutt ML, Stackhouse T, Zbar B, et al. (1997) Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet* 16: 68-73
- Schmidt L, Junker K, Weirich G, Glenn G, Choyke P, Lubensky I, Zhuang Z, Jeffers M, Vande Woude G, Neumann H, Walther M, Linehan WM, Zbar B (1998) Two North American families with hereditary papillary renal carcinoma and identical novel mutations in the MET proto-oncogene. *Cancer Res* 58: 1719-22
- Schoenberg M, Cairns P, Brooks JD, Marshall FF, Epstein JI, Isaacs WB, Sidransky D (1995) Frequent loss of chromosome arms 8p and 13q in collecting duct carcinoma (CDC) of the kidney. *Genes Chromosomes Cancer* 12: 76-80
- Schraml P, Muller D, Bednar R, Gasser T, Sauter G, Mihatsch MJ, Moch H (2000) Allelic loss at the D9S171 locus on chromosome 9p13 is associated with progression of papillary renal cell carcinoma. *J Pathol* 190: 457-61
- Schwerdtle RF, Storkel S, Neuhaus C, Brauch H, Weidt E, Brenner W, Hohenfellner R, Huber C, Decker HJ (1996) Allelic losses at chromosomes 1p, 2p, 6p, 10p, 13q, 17p, and 21q significantly correlate with the chromophobe subtype of renal cell carcinoma. *Cancer Res* 56: 2927-30
- 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
- Shariat SF, Kim J, Raptidis G, Ayala GE, Lerner SP (2003) Association of p53 and p21 expression with clinical outcome in patients with carcinoma in situ of the urinary bladder. *Urology* 61: 1140-5
- Sherr CJ (2001) The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 731-7
- Shiple JM, Birdsall S, Clark J, Crew J, Gill S, Linehan M, Gnarr J, Fisher S, Craig IW, Cooper CS (1995) Mapping the X chromosome breakpoint in two papillary renal

- cell carcinoma cell lines with a t(X;1)(p11.2;q21.2) and the first report of a female case. *Cytogenet Cell Genet* 71: 280-4
- Shipman R, Schraml P, Colombi M, Raefle G, Ludwig CU (1993) Loss of heterozygosity on chromosome 11p13 in primary bladder carcinoma. *Hum Genet* 91: 455-8
- Shuin T, Kondo K, Sakai N, Kaneko S, Yao M, Nagashima Y, Kitamura H, Yoshida MA (1996) A case of chromophobe renal cell carcinoma associated with low chromosome number and microsatellite instability. *Cancer Genet Cytogenet* 86: 69-71
- Sidransky D, Von Eschenbach A, Tsai YC, Jones P, Summerhayes I, Marshall F, Paul M, Green P, Hamilton SR, Frost P, et al. (1991) Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 252: 706-9
- Sidransky D, Frost P, Von Eschenbach A, Oyasu R, Preisinger AC, Vogelstein B (1992) Clonal origin bladder cancer. *N Engl J Med* 326: 737-40
- Sieber OM, Heinimann K, Tomlinson IP (2003) Genomic instability--the engine of tumorigenesis? *Nat Rev Cancer* 3: 701-8
- Simon R, Burger H, Brinkschmidt C, Bocker W, Hertle L, Terpe HJ (1998) Chromosomal aberrations associated with invasion in papillary superficial bladder cancer. *J Pathol* 185: 345-51
- 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
- Simon R, Eltze E, Schafer KL, Burger H, Semjonow A, Hertle L, Dockhorn-Dworniczak B, Terpe HJ, Bocker W (2001) Cytogenetic analysis of multifocal bladder cancer supports a monoclonal origin and intraepithelial spread of tumor cells. *Cancer Res* 61: 355-62
- Smith AJ, Stern HS, Penner M, Hay K, Mitri A, Bapat BV, Gallinger S (1994) Somatic APC and K-ras codon 12 mutations in aberrant crypt foci from human colons. *Cancer Res* 54: 5527-30
- Soravia C, Berk T, Madlensky L, Mitri A, Cheng H, Gallinger S, Cohen Z, Bapat B (1998) Genotype-phenotype correlations in attenuated adenomatous polyposis coli. *Am J Hum Genet* 62: 1290-301
- Souza RF, Appel R, Yin J, Wang S, Smolinski KN, Abraham JM, Zou TT, Shi YQ, Lei J, Cottrell J, Cymes K, Biden K, Simms L, Leggett B, Lynch PM, Frazier M, Powell SM, Harpaz N, Sugimura H, Young J, Meltzer SJ (1996) Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumours. *Nat Genet* 14: 255-7

- Speicher MR, Schoell B, du Manoir S, Schrock E, Ried T, Cremer T, Storkel S, Kovacs A, Kovacs G (1994) Specific loss of chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, 17, and 21 in chromophobe renal cell carcinomas revealed by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 145: 356-64
- Spruck CHI, Ohneseit PF, Gonzalez ZM, Esrig D, Miyao N, Tsai YC, Lerner SP, Schmutte C, Yang A, Cote R, Dubeau L, Nichols PW, Herman GG, Steven K, Horn T, Skinner DG, Jones PA (1994) Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* 54: 784-788
- Stacey M, Matas N, Drake M, Payton M, Fakis G, Greenland J, Sim E (1999) Arylamine Nacetyltransferase type 2 (NAT2), chromosome 8 aneuploidy, and identification of a novel NAT1 cosmid clone: an investigation in bladder cancer by interphase FISH. *Genes Chromosomes Cancer* 25: 376-83
- Steidl C, Simon R, Burger H, Brinkschmidt C, Hertle L, Bocker W, Terpe HJ (2002) Patterns of chromosomal aberrations in urinary bladder tumours and adjacent urothelium. *J Pathol* 198: 115-20
- Stein JP, Ginsberg DA, Grossfeld GD, Chatterjee SJ, Esrig D, Dickinson MG, Groshen S, Taylor CR, Jones PA, Skinner DG, Cote RJ (1998) Effect of p21WAF1/CIP1 expression on tumor progression in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 90: 1072-9
- Steiner G, Cairns P, Polascik TJ, Marshall FF, Epstein JI, Sidransky D, Schoenberg M (1996) High-density mapping of chromosomal arm 1q in renal collecting duct carcinoma: region of minimal deletion at 1q32.1-32.2. *Cancer Res* 56: 5044-6
- Stoehr R, Hartmann A, Hiendlmeyer E, Mürle K, Wieland W, Kunuechel R (2000) Oligoclonality of early lesions of the urothelium as determined by microdissection-supported genetic analysis. *Pathobiology* 68: 165-172
- Stoehr R, Zietz S, Burger M, Filbeck T, Denzinger S, Obermann EC, Hammerschmied C, Wieland WF, Knuechel R, Hartmann A (2005) Deletions of chromosomes 9 and 8p in histologically normal urothelium of patients with bladder cancer. *Eur Urol* 47: 58-63
- Strökel S (1995) Classification of renal cell carcinomas based on morphologic and cytogenetic correlations, berlin

T

- Takahashi T, Habuchi T, Takechi Y, Mitsumori K, Akao T, Terachi T, Yoshida O (1998) Clonal and chronological genetic analysis of multifocal cancers of the bladder and upper urinary tract. *Cancer Res* 58: 5835-41

- Takayama T, Ohi M, Hayashi T, Miyanishi K, Nobuoka A, Nakajima T, Satoh T, Takimoto R, Kato J, Sakamaki S, Niitsu Y (2001) Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposi. *Gastroenterology* 121: 599-611
- Takle LA, Knowles MA (1996) Deletion mapping implicates two tumor suppressor genes on chromosome 8p in the development of bladder cancer. *Oncogene* 12: 1083-7
- Terracciano L, Richter J, Tornillo L, Beffa L, Diener PA, Maurer R, Gasser TC, Moch H, Mihatsch MJ, Sauter G (1999) Chromosomal imbalances in small cell carcinomas of the urinary bladder. *J Pathol* 189: 230-5
- Thoenes W, Störkel S, Rumpelt H (1986) Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas): the basic cytological and histological elements and their use for diagnosis. *Pathol Res Pract* 181: 125-143
- Thrash-Bingham CA, Salazar H, Greenberg RE, Tartof KD (1996) Loss of heterozygosity studies indicate that chromosome arm 1p harbors a tumor suppressor gene for renal oncocytomas. *Genes Chromosomes Cancer* 16: 64-7
- Tomlinson GE, Nisen PD, Timmons CF, Schneider NR (1991) Cytogenetics of a renal cell carcinoma in a 17-month-old child. Evidence for Xp11.2 as a recurring breakpoint. *Cancer Genet Cytogenet* 57: 11-7
- Tomlinson I, Bodmer W (1999) Selection, the mutation rate and cancer: ensuring that the tail does not wag the dog. *Nat Med* 5: 11-12

V

- van den Berg A, Hulsbeek MF, de Jong D, Kok K, Veldhuis PM, Roche J, Buys CH (1996) Major role for a 3p21 region and lack of involvement of the t(3;8) breakpoint region in the development of renal cell carcinoma suggested by loss of heterozygosity analysis. *Genes Chromosomes Cancer* 15: 64-72
- van den Berg E, Dijkhuizen T, Storkel S, de la Riviere GB, Dam A, Mensink HJ, Oosterhuis JW, de Jong B (1995) Chromosomal changes in renal oncocytomas. Evidence that t(5;11)(q35;q13) may characterize a second subgroup of oncocytomas. *Cancer Genet Cytogenet* 79: 164-8
- van Rhijn BW, van der Kwast TH, Vis AN, Kirkels WJ, Boeve ER, Jobsis AC, Zwarthoff EC (2004) FGFR3 and P53 characterize alternative genetic pathways in the pathogenesis of urothelial cell carcinoma. *Cancer Res* 64: 1911-4

- Van Tilborg A, Groenfeld L, van der Kwast T, Zwarthoff E (1999) Evidence for two candidate tumour suppressor loci on chromosome 9q in transitional cell carcinoma (TCC) of the bladder but no homozygous deletions in bladder tumour cell lines. *Br J Cancer* 80: 489-494
- van Tilborg AA, de Vries A, de Bont M, Groenfeld LE, van der Kwast TH, Zwarthoff EC (2000) Molecular evolution of multiple recurrent cancers of the bladder. *Hum Mol Genet* 9: 2973-80
- Velickovic M, Delahunt B, Grebe SK (1999) Loss of heterozygosity at 3p14.2 in clear cell renal cell carcinoma is an early event and is highly localized to the FHIT gene locus. *Cancer Res* 59: 1323-6
- Velickovic M, Delahunt B, Storkel S, Grebem SK (2001) VHL and FHIT locus loss of heterozygosity is common in all renal cancer morphotypes but differs in pattern and prognostic significance. *Cancer Res* 61: 4815-9
- Velickovic M, Delahunt B, McIver B, Grebe SK (2002) Intragenic PTEN/MMAC1 loss of heterozygosity in conventional (clear-cell) renal cell carcinoma is associated with poor patient prognosis. *Mod Pathol* 15: 479-85
- Veltman JA, Fridlyand J, Pejavar S, Olshen AB, Korkola JE, DeVries S, Carroll P, Kuo WL, Pinkel D, Albertson D, Cordon-Cardo C, Jain AN, Waldman FM (2003) Array-based comparative genomic hybridization for genome-wide screening of DNA copy number in bladder tumors. *Cancer Res* 63: 2872-80
- Vieweg J, Whitmore WF, Jr., Herr HW, Sogani PC, Russo P, Sheinfeld J, Fair WR (1994) The role of pelvic lymphadenectomy and radical cystectomy for lymph node positive bladder cancer. The Memorial Sloan-Kettering Cancer Center experience. *Cancer* 73: 3020-8
- Vogelstein B (1990) A deadly inheritance. *Nature* 348: 681
- Vogelstein B, Kinzler KW (1992) Carcinogenesis leave fingerprints. *Nature* 355: 209-210
- von Knobloch R, Bugert P, Jauch A, Kalble T, Kovacs G (2000) Allelic changes at multiple regions of chromosome 5 are associated with progression of urinary bladder cancer. *J Pathol* 190: 163-168
- Voorter C, Joos S, Bringuier PP, Vallinga M, Poddighe P, Schalken J, du Manoir S, Ramaekers F, Lichter P, Hopman A (1995) Detection of chromosomal imbalances in transitional cell carcinoma of the bladder by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 146: 1341-54

W

- Wagner U, Bubendorf L, Gasser TC, Moch H, Gorog JP, Richter J, Mihatsch MJ, Waldman FM, Sauter G (1997) Chromosome 8p deletions are associated with invasive tumor growth in urinary bladder cancer. *Am J Pathol* 151: 753-9
- Waldman FM, Carroll PR, Kerschmann R, Cohen M, Field F, Mayall B (1991) Centromeric copy number of chromosoma 7 is strongly correlated with tumor grade and labelin index in human bladder cancer. *Cancer Res* 51: 3807-3813
- Walter TA, Pennington RD, Decker HJ, Sandberg AA (1989) Translocation t(9;11)(p23;q12): a primary chromosomal change in renal oncocyoma. *J Urol* 142: 117-9
- Wang N, Perkins KL (1984) Involvement of band 3p14 in t(3;8) hereditary renal carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 11: 479-81
- Wheless L, Morreale J, O'Connell M, al. e (1996) Predictive value of aberrations of chromosome 9 following Bacillus Clmette-Guérin (BCG) therapy in bladder cancer. *J Urol* 155: 321
- Williams SV, Adams J, Coulter J, Summersgill BM, Shipley J, Knowles MA (2005) Assessment by M-FISH of karyotypic complexity and cytogenetic evolution in bladder cancer in vitro. *Genes Chromosomes Cancer* 43: 315-28
- Winawer SJ, Fletcher RH, Miller L, Godlee F, Stolar MH, Mulrow CD, Woolf SH, Glick SN, Ganiats TG, Bond JH, Rosen L, Zapka JG, Olsen SJ, Giardiello FM, Sisk JE, Van Antwerp R, Brown-Davis C, Marciniak DA, Mayer RJ (1997) Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale. *Gastroenterology* 112: 594-642
- Wu XR (2005) Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nat Rev Cancer* 5: 713-25

X

- Xu X, Stower M, Reid I, Garner R, Burns P (1996) Molecular screening of multifocal transitional cell carcinoma of the baldder using p53 mutations as biomarkers. *Clin Cancer Res* 2: 1795-1800

Y

- Yao A, Rubin H (1994) A critical test of the role of population density in producing transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 7712-6

Yoshimura I, Kuudoh J, Saito S, Tazaki H, Shimizu N (1995) p53 gene mutation in recurrent superficial bladder cancer. *J Urol* 153: 1711-1715

Z

Zaharieva B, Simon R, Ruiz C, Oeggerli M, Mihatsch MJ, Gasser T, Sauter G, Toncheva D (2005) High-throughput tissue microarray analysis of CMYC amplification in urinary bladder cancer. *Int J Cancer* 117: 952-6

Zaharieva BM, Simon R, Diener PA, Ackermann D, Maurer R, Alund G, Knonagel H, Rist M, Wilber K, Hering F, Schonenberger A, Flury R, Jager P, Fehr JL, Mihatsch MJ, Gasser T, Sauter G, Toncheva DI (2003) High-throughput tissue microarray analysis of 11q13 gene amplification (CCND1, FGF3, FGF4, EMS1) in urinary bladder cancer. *J Pathol* 201: 603-8

Zbar B (1995) Von Hippel-Lindau disease and sporadic renal cell carcinoma. *Cancer Surv* 25: 219-32

Zhang ZT, Pak J, Huang HY, Shapiro E, Sun TT, Pellicer A, Wu XR (2001) Role of Ha-ras activation in superficial papillary pathway of urothelial tumor formation. *Oncogene* 20: 1973-80

Zhao J, Richter J, Wagner U, Roth B, Schraml P, Zellweger T, Ackermann D, Schmid U, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser TC, Sauter G (1999) Chromosomal imbalances in noninvasive papillary bladder neoplasms (pTa). *Cancer Res* 59: 4658-61

Zheng M, Simon R, Mirlacher M, Maurer R, Gasser T, Forster T, Diener PA, Mihatsch MJ, Sauter G, Schraml P (2004) TRIO amplification and abundant mRNA expression is associated with invasive tumor growth and rapid tumor cell proliferation in urinary bladder cancer. *Am J Pathol* 165: 63-69

Zhuang Z, Park WS, Pack S, Schmidt L, Vortmeyer AO, Pak E, Pham T, Weil RJ, Candidus S, Lubensky IA, Linehan WM, Zbar B, Weirich G (1998) Trisomy 7 harbouring non-random duplication of the mutant MET allele in hereditary papillary renal carcinomas. *Nat Genet* 20: 66-9

AGRAÏMENTS

Ja fa una pila d'anys que vaig començar en aquesta petita-gran aventura de la recerca, per tant és evident que tinc tant al cor com al cap una llarga llista de persones que durant aquest temps he anat coneixent, i que m'han ajudat a poder fer aquest camí. Està clar per tant, que ben segur m'oblidaré d'alguna d'aquestes persones en el moment d'escriure aquests agraïments, però no és que no els recordi o no els estigui agraïda, sinó que en aquests moments caòtics, al final de l'escriptura de la tesi, és realment difícil concentrar-se i recordar a tothom. De fet ara penso que l'ideal seria haver anat escrivint-los a mida que anava fent aquest camí, perquè en aquest moment és més fàcil recordar a la gent que t'ha ajudat a última hora, a buscar un article, a fer una correcció... feina sempre d'última hora; que a aquelles persones que et van ensenyar on trobar el material del laboratori, o com posar una hibridació...

Dit això, i esperant que no s'ofenguin aquelles persones que es busquin entre aquestes ratlles, però que després d'arribar al final no hagin vist el seu nom aquí, començaré aquest últim apartat, agraint als meus "jefes", tant la Rosa com al Gelabert el fet d'haver-me donat la possibilitat de fer recerca. Suposo que per moltes persones això és un somni, i en el meu cas i gràcies a tots dos, ha estat una realitat, per tant em sento afortunada i agraïda.

A la Rosa, he d'agrir-li moltes coses i no només a nivell científic; camp en el que està clar, he après molt d'una persona amb una memòria envejable i una capacitat de treball sense límits. Sinó també i per mi és el més important, a nivell personal, perquè com a "jefa" no tenia perquè fer moltes de les coses que ha fet per mi, gràcies pel suport, per la paciència, pels consells, per facilitar-ho tot. Ha estat un luxe estar durant tots aquests anys al costat d'una persona com tu, amb la teva saviesa i amb la teva qualitat humana, està clar que serà totalment impossible oblidar-te.

Al Gelabert, gràcies pel suport, per donar-me aquesta possibilitat, per transmetre'm coneixements, per les converses, per les xerrades, pel "carinyo" i la tendresa que sempre em transmetes. Tot i que la nostra relació no ha estat tan estreta com amb la Rosa, ja se sap la UAB i l'Hospital del Mar no estan massa a prop, sempre has respòs quan t'he necessitat, gràcies per estar sempre disponible.

De tota la gent del laboratori, està clar que amb els companys de grup són de les persones amb les que acabes tenint una relació més estreta; les reunions, els projectes, els congressos... tot plegat fa que t'acabis coneixent d'un manera especial. Del grup, tot i que d'aquella manera (tu ja m'entens) forma part l'Imma, és d'aquelles persones per les quals em falten les paraules. Gràcies per estar sempre disponible i disposada a deixar les teves coses per donar un cop de mà als demés, per escoltar, per fer-me costat, per les trucades, pel ànims, per la complicitat de molt moments, per

acceptar ser la padrina del Pol... per tot. Gràcies per ser com ets i per tenir aquesta força. Ets fantàstica (creu-t'ho!!).

El Jordi ha estat un company quasi des de l'inici d'aquesta aventura, carregat de paciència i de saviesa (ja t'ho he dit moltes vegades, potser al final t'ho creuràs i tot), ens hem ajudat en moltes ocasions i hem après molt junts. T'agreixo moltes coses però sobre tot les xerrades, confidències i els ànims.

Al Javi, una persona desendreçada, caòtica, super estressada, però alhora fantàstica, curiosa, alegre, sempre disposada a ajudar i a escoltar, amb una capacitat de treball il·limitada; ha estat un autèntic plaer coneixe't i poder treballar amb tu. Gràcies també per ajudar-me amb la portada de la tesi.

I la Núria, l'última en arribar al grup, la veritat és que ens coneixem poc perquè coincidim poc, però em sembles una persona tranquil·la, serena i dolça, espero que et vagi molt bé en aquesta aventura que comences.

Una altra persona "del grup" que sempre tinc present és la Marta Bernués, és la persona que em va ajudar i ensenyar moltes coses quan vaig començar, és per això que vull agrir-li la paciència del que ensenya. He tingut la sort de seguir comptant amb el teu ajut fins a l'últim moment (gràcies per el informe). Ets una persona genial, humil, senzilla i excepcional, gràcies per tot.

Tot i que no és del grup he d'agrair de manera especial moltes coses a la Maria, una bona amiga, i també les meves mans en molt moments durant l'embaràs del Pol. Gràcies per ser alegre, riellera, xerraire, per saber escoltar, per les abraçades i els petons, i per no deixar que la distància d'aquests dos últims anys separés els nostres camins.

De la resta de la gent de la unitat he d'agrair coses a quasi tothom, perquè encara que sembli en moltes ocasions que tots anem una mica a la nostra, la relació diària, les xerrades, els cafès, les converses dels dinars...tot plegat fa que el dia a dia sigui millor, gràcies a tots els que encara hi sou: Rosana, Ignasi, Montse, Mònica, Bea, Anna, Ari, Raquel, Gemma, Yolanda, Pedro, Laia, Pere, Albert, Mery, Elsa, Aïda i Miguel. I als que ja heu marxat: Pi i Olga (gràcies també per tot el que heu fet en aquest últim temps), Mercè, Sergio, Àngels, Aïda, Vanessa, Cristina H, Cristina G i Jorge. També de manera especial a l'Àngels i a l'Anna, persones que sovint passen desapercebudes però imprescindibles durant tots aquests anys.

Als profes (sèniors): la Montse, la Quima, el Jordi, la Cristina, la Carme, la M^a Rosa i també a l'Egozcue, els agraeixo el fet d'ensenyar, perquè això fa que alguns dels alumnes els entri el cuquet de voler saber més, i potser de fer recerca, gràcies també

per ajudar i guiar a alguns dels que hem triat aquest camí, i fer així possible que es compleixin els desitjos i els somnis.

A la gent de l'IBB, la Marta, la Laura, la Núria i la Laia, gràcies per les xerrades, pel suport, per les celebracions, per ser especials.

He d'agrair també a la Sílvia Beà i a la Maria Ribas tot el temps que em van dedicar sobretot al començament de la tesi, per ensenyar-me tot sobre la CGH.

Al servei d'Urologia de l'Hospital del Mar, gràcies per deixar que de tant en tant una biòloga s'infiltrés en el vostre món. Gràcies especialment al Dr. Cortadella, per estar sempre disposat a donar un cop de mà i fer-me les coses més fàcils, gràcies també a la Montse per la seva disponibilitat i eficàcia.

He de donar gràcies també als serveis d'anatomia patològica tant de l'Hospital del Mar com de la Fundació Puigvert, i concretament al Dr. Lloreta i al Dr. Algaba, gràcies a tots dos per ajudar-nos a fer possible tota aquesta feina, per fer un espai sempre que a calgut dins de les vostres agendes impossibles, gràcies també per totes les explicacions i coneixements que m'heu transmès.

A arrel d'una col·laboració de les moltes que fa la Rosa, vaig anar a parar durant una mica més d'un any al laboratori de biologia molecular de la Fundació Puigvert, allà he conegut un grup de gent fantàstica (Elisabet, Moisès, Patricia, Lidia, Manel, Bárbara, Cristina, Merche i Lourdes), molt unida i amb una qualitat humana enorme. Ha estat un luxe compartir poiata, dinars, cafès, reunions, xerrades... amb tots i cada un de vosaltres. Gràcies especialment a alguns de vosaltres (ja sabeu qui sou) pel suport, per la complicitat, per la implicació i per la vostra amistat fora del laboratori. He de puntualitzar que de fora del laboratori però de dins del grup, també tinc molt que agrair a la M^a José i a l'Antonio, aquest últim el "culpable" de que hagi format part d'aquest grup de gent fantàstica, és aquesta però només una de les diverses coses que he d'agrair-li.

D'una altra col·laboració va sorgir una relació amb la gent del grup del Gabriel Capellà de l'ICO, gràcies per comptar amb nosaltres, per donar-nos un cop de mà en època de "vaques flaques" i facilitar així que poguéssim seguir treballant, gràcies per facilitar sempre les coses. Agrair especialment a la Gemma Tarafa la seva disposició en tot moment per ajudar-me.

Gràcies també a la gent del IMIM, perquè tot i tenir una beca d'allà, mai hi he estat físicament treballant, però sempre el personal m'ha ajudat i m'ha posat fàcil les coses.

Durant molt de temps, vaig compaginar la realització d'aquesta tesi amb una feina de microbiologia a Maymó Cosmetics S.A., agreixo especialment a la Montse Maymó i al Joan Obrador haver-me posat sempre les coses fàcils per tal de poder compaginar les dues feines, per recolzar-me i per entendre que en un moment donat decidís deixar-los, per poder-me dedicar a la tesi i a fer de mama.

Gràcies a amics i amigues, que durant aquest temps m'han recolzat i animat, al grup del corriol, als amics de la universitat, a la Bet i al Vito, al Marc i a la Tatiana, a l'Albert i la Marta, al David i a la Lorena.

Per acabar, vull donar les gràcies a la família tot i que després de tants anys encara no entenen aquesta situació i aquest món inestable de la recerca. Als meus pares per haver-me donat la possibilitat d'arribar fins aquí, per recolzar-me en les meves decisions, per intentar entendre situacions difícils d'explicar, per tenir paciència, per fer-me costat i per ajudar-me en totes les coses de la vida. A la Balbi, per estar sempre al meu costat, per donar-me suport i ànims; tenir-te de germana ha fet que pensi quan important és no créixer sol (alguns de vosaltres ja sabeu perquè ho dic). Als pares del Tomàs per estar sempre disponibles, per ajudar-nos en qualsevol moment, sobretot per fer tants cops de cangurs, quan el Pol s'ha posat malalt. I finalment al Tomàs per donar-me el seu suport de manera incondicional, per entendre aquesta situació inestable de la vida del becari, per animar-me a seguir endavant i no llençar la tovallola, per ser seré, per fer de cangur permanent i no protestar de res en aquesta etapa final de l'escriptura de la tesi, clar que fer de cangur del Pol és una sort, un luxe. Una de les millors coses, sinó la millor, que m'ha passat durant la realització d'aquesta tesi i a la vida en general, ha estat ser mare. Pol gràcies per cada somriure, per cada petó, per tot el que m'ensenyes i per tot el que em dones.

Arribats al final d'aquests agraïments, tinc molt clar que he estat una persona afortunada, no només per haver pogut fer realitat un somni, fer recerca, sinó per la gent que he conegut durant aquest temps. Gràcies a tots i cada un de vosaltres, també als que no hi sortiu però que seria just que hi fóssiu.