

**Detecció i identificació de desequilibris cromosòmics
constitucionals i adquirits mitjançant l'aplicació de
la tècnica de Hibridació Genòmica Comparada**

M^a Angels Rigola Tor
TESI-2003

ABREVIACIONS	0
1. INTRODUCCIÓ	1
1.1 TÈCNiques DE CITOGÈNÈTICA MOLECULAR	1
1.1 TÈCNICA D' HIBRIDACIÓ IN SITU DE FLUORESCÈNCIA (FISH)	3
1.2 TÈCNICA D' HIBRIDACIÓ GENÒMICA COMPARADA: CGH.....	5
1.2 . ALTERACIONS CROMOSÒMIQUES CONSTITUCIONALS	8
2.1. TIPUS I INCIDÈNCIA.....	8
2.2. ANOMALIES CROMOSÒMIQUES CRÍPTIQUES.....	11
1.3. ALTERACIONS CROMOSÒMIQUES ADQUIRIDES EN TUMORS SÒLIDS EPITELIALS	13
3.1. INTRODUCCIÓ GENERAL.....	13
3.2. CARCINOMA RENAL.....	15
a. EPIDEMIOLOGIA.....	15
1. Distribució geogràfica.....	15
2. Factors etiològics.....	15
b. CARACTERÍSTIQUES HISTOMORFOLÒGIQUES.....	16
1. Patrons de creixement	17
c. CLASSIFICACIÓ HISTOPATOLÒGICA-CITOGÈNÈTICA-MOLECULAR	17
d. GRAU I ESTADI	20
e. ESTUDIS CITOGÈNÈTICS.....	22
3.2.1. CARCINOMA RENAL DE CEL·LULES CLARES	23
3.2.1. CARCINOMA RENAL PAPIL·LAR...	27
3.2.1. CARCINOMA DE CÈL·LULES CROMÒFOBES	28
3.2.1. ONCOCITOMA...	28
3.2.1. CARCINOMES DEL DUCTE DE BELLINI...	29
3.3 . TUMORS DE LES VIES URINÀRIES.....	31
3.3.1. CÀNCER DE BUFETA.....	32
a. EPIDEMIOLOGIA.....	33
1. Distribució geogràfica.....	34
2. Factors etiològics.....	35
b. TIPUS CEL·LULAR I CLASSIFICACIÓ.....	36
2. Patrons de creixement	37
c. GRAU I ESTADI	32
d. HISTÒRIA NATURAL.....	34
e. ESTUDIS CITOGÈNÈTICS.....	22
3.3.2. CÀNCER D'URÈTER I DE PELVIS RENAL.....	33
a. Citogenètica.	37
3.3.3. CÀNCER DE BUFETA.....	41

2. OBJECTIUS.....	50
3. MATERIAL I MÈTODES.....	51
3.1. MATERIAL BIOLÒGIC.....	51
3.1.1. <i>PACIENTS AMB ANOMALIES CROMOSOMIQUES CONSTITUCIONALS..</i>	
3.1.2. <i>TUMORS UROTELIALS I RENALS.....</i>	52
3.2. TÈCNiques DE CULTIU I CITOGENÈTICA CONVENCIONAL.....	55.
3.2.1. <i>CULTIU DE SANG PERIFÈRICA.....</i>	55
3.2.2. <i>CULTIU DE LIQUID AMNIOTIC.....</i>	57
3.2.3. <i>CULTIU DE CEL·LULES TUMORALS.....</i>	58
3.3. TÈCNiques DE BANDEIG CROMOSOMIC.....	59
3.4. EXTRACCIÓ DE DNA.....	61
3.5. QUANTIFICACIÓ DEL DNA.....	63
3.6. PCR QUANTITATIVA FLUORESCENT.....	64
3.7. FISH.....	66
3.8. HIBRIDACIÓ GENÒMICA COMPARADA... ..	68
4. RESULTATS.....	78
1. Identification of two de novo partial trisomies by comparative genomic hybridization.	
<u>Rigola MA, Carrera M, Ribas I, De La Iglesia C, Mendez B, Egozcue J, Fuster C.</u> <u>Clin Genet. 2001 Feb;59(2):106-10.....</u>	2.2*
2. Characterization of a heritable partial monosomy 18p by molecular and cytogenetic analysis.	
<u>Rigola MA, Plaja A, Mediano C, Miro R, Egozcue J, Fuster C.</u> <u>Am J Med Genet. 2001 Nov 15;104(1):37-41.....</u>	2.3*
3. A comparative genomic hybridization study in a 46,XX male.	
<u>Rigola MA, Carrera M, Ribas I, Egozcue J, Miro R, Fuster C.</u> <u>Fertil Steril. 2002 Jul;78(1):186-8.....</u>	3.2*

4. Comparative genomic hybridization analysis of transitional cell carcinomas of the renal pelvis.	
<i>Rigola MA, Fuster C, Casadevall C, Bernues M, Caballin MR, Gelabert A, Egozcue J, Miró R.</i>	
Cancer Genet Cytogenet. 2001 May;127(1):59-63.....	1.7*
5. Analysis of kidney tumors by comparative genomic hybridization and conventional cytogenetics.	
<i>Rigola MA, Casadevall C, Bernues M, Caballin MR, Fuster C, Gelabert A, Egozcue J, Miro R.</i>	
Cancer Genet Cytogenet. 2002 Aug;137(1):49-53.....	1.7*
6. Comparative genomic hybridization analysis of invasive bladder tumors with different grown patterns.	
<i>Rigola MA, Hernando C, Fuster C, Gelabert A, Egozcue J, Miro R.</i>	
Journal of Urology (enviat).....	
5. DISCUSSIÓ.....	80
5.1. ALTERACIONS CROMOSÒMIQUES CONSTITUCIONALS.....	81
5.1.1. TRISOMIES I MONOSOMIES PARCIALES.....	81
5.1.2. BARONS XX.....	85
5.2. ALTERACIONS CROMOSÒMIQUES ADQUIRIDES EN TUMORS UROTELIALS I RENALS.....	89
5.2.1. TUMORS UROTELIALS DE CÈL·LULES TRANSICIONALS.....	95
5.2.2. TUMORS DE CÈL·LULES TRANSICIONALS DE PELVIS RENAL.....	96
5.2.3. TUMORS DE CÈL·LULES TRANSICIONALS DE BUFETA.....	98
6. CONCLUSIONS.....	107
7. BIBLIOGRAFIA.....	109

ABREVIACIONS

ADN	<i>Àcid desoxirribonucleic</i>
ARN	<i>Àcid ribonucleic</i>
CGH	<i>Hibridació Genòmica Comparada</i>
dUTP	<i>Deoxiuridina 5' trifosfat</i>
ISCN	<i>International System for Human Cytogenetic Numenclature</i>
Dm	<i>dm doble minutes</i>
DOT-PCR	<i>Primers oligonucleotids degenerats-reacció en cadena de la polimerasa</i>
FISH	<i>Hibridació in situ fluorescent</i>
FITC	<i>Fluoresceïna isotiocianat</i>
H-CGH	<i>Hibridació Genòmica Comparada de Alta resolució.</i>
LA	<i>Líquid amniòtic</i>
M-FISH	<i>Multi painting-Hibridació in situ fluorescent</i>
PCR	<i>Reacció en cadena de la polimerasa</i>
Pb	<i>pb Parells de bases</i>
QF-PCR	<i>Reacció en cadena de la polimerasa- quantitativa</i>
SP	<i>Sang perifèrica</i>
Tas	<i>tas associacions telomèriques</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

1. INTRODUCCIÓ

1. TÈCNiques DE CITOGÈNÈTICA MOLECULAR

Les tècniques de citogenètica convencional i molecular tenen una gran implicació en el diagnòstic i pronòstic de malalties. El desenvolupament de tècniques de hibridació in situ de fluorescència (FISH) amb les seves variants tecnològiques com la hibridació genòmica comparada CGH, el cariotip espectral (SKY-FISH), o el multiplex FISH (M-FISH), constitueixen una nova disciplina anomenada citogenètica molecular i proporcionen nous mètodes més precisos de detecció de les alteracions cromosòmiques constitucionals i de les alteracions cromosòmiques adquirides en cèl·lules tumorals.

La tècnica citogenètica de bandes G permet la identificació del cromosomes gràcies a l'aparició de un patró de bandes característic i específic de cada parell de cromosomes homòlegs. Un patró de bandes G amb un nivell de resolució 550, té un promig de 5×10^6 pb de DNA per banda; capaç de codificar per 100-200 gens. Per poder visualitzar al microscopi una alteració cromosòmica estructural ha d'ésser superior a 5 Mb i els guanys o pèrdues almenys han d'afectar a una banda o part d'ella. La tècnica del cariotip amb bandes G, anomenada citogenètica convencional, ha permès identificar nombroses alteracions cromosòmiques constitucionals i s'utilitza com a tècnica de rutina en el diagnòstic d'aquestes anomalies.

En el cas de tumors sòlids hi ha factors metodològics que han dificultat la incorporació de l'anàlisi citogenètica convencional com a rutina diagnòstica, per tal de complementar el diagnòstic anatomopatològic. Entre els obstacles tècnics per obtenir metafases analitzables a partir de mostres de tumor cal destacar les següents: baixa viabilitat cel·lular degut a la necrosi, necessitat de la disgregació enzimàtica, contaminació microbiana, contaminació de teixit amb cèl·lules normals, presència d'alteracions cromosòmiques molt complexes que fan difícil determinar el canvi cromosòmic primari associat a un tipus concret de tumor. En tumors sòlids, les tècniques de FISH i CGH, han permès evolucionar molt més ràpidament cap a la detecció d'alteracions genètiques i poder identificar aquest tipus de canvis (Nederloft al. 1990, Lichter et al 1991, Ried et al 1992).

En genètica clínica, la caracterització acurada de les anomalies cromosòmiques, tan numèriques com estructurals, es fonamental per conèixer la seva implicació en la etiologia de les diferents malalties hereditàries. La aplicació de les noves tècniques de citogenètica molecular: FISH (FISH-convencional, M-FISH, M-FISH-bands, CGH) ofereix una eina molt eficaç a nivell clínic al possibilitar un diagnòstic més precís de les alteracions genètiques tan prenatal com postnatalment. Aquestes metodologies permeten identificar regions cromosòmiques que, mitjançant bandes G, no poden arribar a ésser caracteritzades (cromosomes marcadors,

derivatius i altres) o detectades (anomalies subtils o críptiques). A mes a mes, faciliten la localització de gens específics i de seqüències de DNA dins de cromosomes concrets, la identificació de microduplicacions o microdeleccions i la detecció d'aneuploidies parcials que a vegades es manifesten donant un fenotip anòmal. Es a dir, aquestes tècniques ens permetran localitzar millor les regions cromosòmiques on es troben els gens implicats en diferents patologies.

1.1 TÈCNICA D' HIBRIDACIÓ IN SITU DE FLUORESCÈNCIA (FISH)

La tècnica de FISH ha estat la base de la citogenètica molecular, que ha permès progressar molt ràpidament en les àrees de recerca bàsica i medicina clínica. La metodologia FISH facilita l'estudi de l'arquitectura nuclear, de l'empaquetament, localització, integració, ampliació i pèrdua de gens.

La Hibridació in situ va ésser introduïda per Gall i Pardue l'any 1969. Aquests investigadors feien servir sondes de DNA marcades radioactivament per localitzar seqüències de DNA específiques dins del nucli de *Xenopus laevis*. L'any 1988, Pinkel et al. van introduir la tècnica de FISH en marcar les sondes d'hibridació amb fluorocroms. Les etapes més importants de la tècnica FISH, s'indiquen a la figura 1.

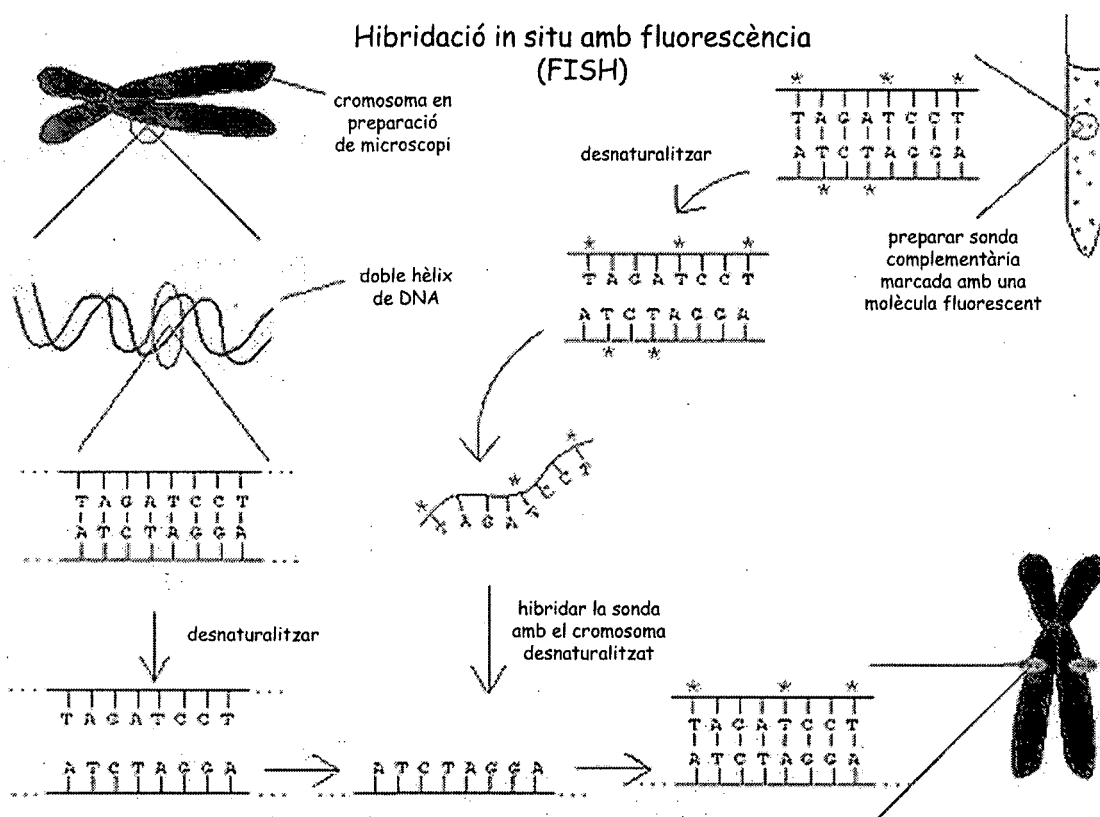


Figura 1. Esquema de la tècnica de FISH (Figura adaptada de Brien 1999)

Desnaturalització del material cromosòmic de la mostra i de la sonda comercial.

Hibridació de la sonda amb el cromosoma desnaturalitzat. Observació al microscopi.

En genètica mèdica, la detecció d'anomalies cromosòmiques és fonamental per l'identificació de cariotips específics de les malalties. La metodologia FISH ha estat particularment útil per detectar translocacions críptiques indetectables amb l'anàlisi cromosòmica de bandes.

La FISH-convencional esdevé insuficient quan no es sospita la naturalesa de l'alteració, al desconèixer el tipus de sonda cromosòmica que cal utilitzar. En aquest casos, s'apliquen les tècniques de M-FISH (multicolor) o de SKY (cariotip espectral) que permeten la ràpida identificació de tots els cromosomes en una única hibridació utilitzant un kit comercial de 24 sondes de pintat cromosòmic (Speicher et al. 1996; Schröck et al. 1996). La seva utilitat s'evidencia en la detecció i caracterització de reorganitzacions complexes, críptiques i de material cromosòmic d'origen desconegut (Uhrig et al. 1999; Joyce et al. 1999; Jalal et al 2001). Però aquesta metodologia també té limitacions, la principal es que no pot detectar anomalies intracromosòmiques tal com duplicacions i delecions.

1.2 TÈCNICA D'HIBRIDACIÓ GENÒMICA COMPARADA: CGH

La CGH és una tècnica que permet l'anàlisi total del DNA, detectant guanys i pèrdues de material genètic (Kallionemi et al. 1992). Es basa en la hibridació competitiva simultània de DNA problema i DNA control marcats diferencialment sobre cromosomes normals. En aquesta hibridació les diferències entre la unió de les seqüències de DNA marcades, indica aquelles regions que puguin estar sobre o infrarepresentades en el genoma problema. Un software especial per aquesta tècnica, interpreta els valors de la intensitat de fluorescència, generant perfils de guanys i pèrdues al llarg de cada cromosoma (Figura 2). En condicions de normalitat, com que la quantitat de DNA disponible problema i el de referència és la mateixa el resultat de la hibridació és un cromosoma de color homogeni amb un perfil normal. En condicions patològiques, si el DNA problema conté un guany cromosòmic la quantitat disponible d'aquest DNA problema és superior i la hibridació marcarà una desviació cap a un dels fluorocroms. Si en el DNA problema hi ha deleció o pèrdua, la desviació de color anirà en sentit contrari. El software elabora un perfil mig per cada cromosoma i el resultat final ens indica quines són les zones cromosòmiques guanyades, amplificades o delecionades en cada mostra.

La tècnica de CGH, inicialment descrita per analitzar el desequilibri en el nombre de còpies de DNA en tumors, pot aplicar-se a l'estudi d'alteracions cromosòmiques desequilibrades en tot tipus de mostra.

AVANTATGES

- Permet estudiar, de forma simultània, la totalitat de canvis en el nombre de còpies de DNA presents en el genoma.
- No necessita cèl·lules en cultiu a diferència d'altres tècniques SKY, M-FISH que depenen de l'obtenció de metafases.
- Es requereix molt poca quantitat de DNA (200ng-1µg)
- Es pot treballar amb petits grups cel·lulars obtinguts per microdissecció o dissecció amb làser, també permet l'anàlisi d'una única cèl·lula. Quan es treballa amb tant poc material s'ha de realitzar prèviament una DOT-PCR o PCR inespecífica, fent servir oligonucleòtids degenerats.
- Pot utilitzar-se a partir de DNA extret de mostres fresques o incloses en blocs de parafina, per possibles estudis retrospectius.

- *Aquesta tècnica ha contribuït significativament al coneixement actual de moltes alteracions genòmiques, i a la caracterització dels canvis genètics en mostres procedents de qualsevol teixit.*

DESAVANTATGES

- *La CGH pot avaluar canvis en el nombre de còpies relatives però no els nivells de ploïdia (diploide, triploide, tetraploide) degut a que el programa d'anàlisi de la CGH es basa en la normalització de la intensitat de senyal observada en cada metafase.*
- *No detecta reordenaments cromosòmics equilibrats (Kallioniemi et al.1994)*
- *No es detecten guanys menors de 3-5Mb, a menys que es trobin amplificades unes quantes vegades en el DNA problema . La mida mínima detectable en casos d'amplificació d'una regió és de 2-4Mb (Piper et al 1995), i el fragment mínim per una deleció és de 10-20Mb (Kallioniemi et al 1994). Una variant de la CGH, anomenada d'alta resolució (HR-CGH) permet la detecció de desequilibris cromosòmics submicroscòpics, de l'ordre de 3 Mb (Kirschhoff et al. 1999).*
- *No es fiable per a detectar canvis en les regions centromèriques, telomèriques i les corresponents a l'heterocromatina dels cromosomes 1,9,16,Y a l'ésser molt polimòrfiques respecte al nombre de repeticions. Per evitar problemes, aquestes regions es bloquegen amb DNA Cot-1 Kallioniemi et al 1994).*
- *No permet detectar mosaïcismes inferiors al 30%-40% ja que un clon emmascara l'altre.*
- *La CGH només pot detectar canvis presents a una part àmplia de cèl·lules tumorals i no permet detectar alteracions presents en clons minoritaris.*
- *En tumors sòlids, un contingut variable de cèl·lules normals o cèl·lules inflamatòries infiltrades dins del tumor pot reduir significativament la capacitat de la CGH per detectar aberracions. Per aquest motiu, es requereix que un mínim d'un 70% de la mostra analitzada correspongui a cèl·lules tumorals. Aquests obstacles es poden solventar mitjançant la microdissecció de petites àrees tumorals excloent material contaminat de cèl·lules normals per tal de reduir els resultats enganyosos deguts a la presència de cèl·lules no malignes.*

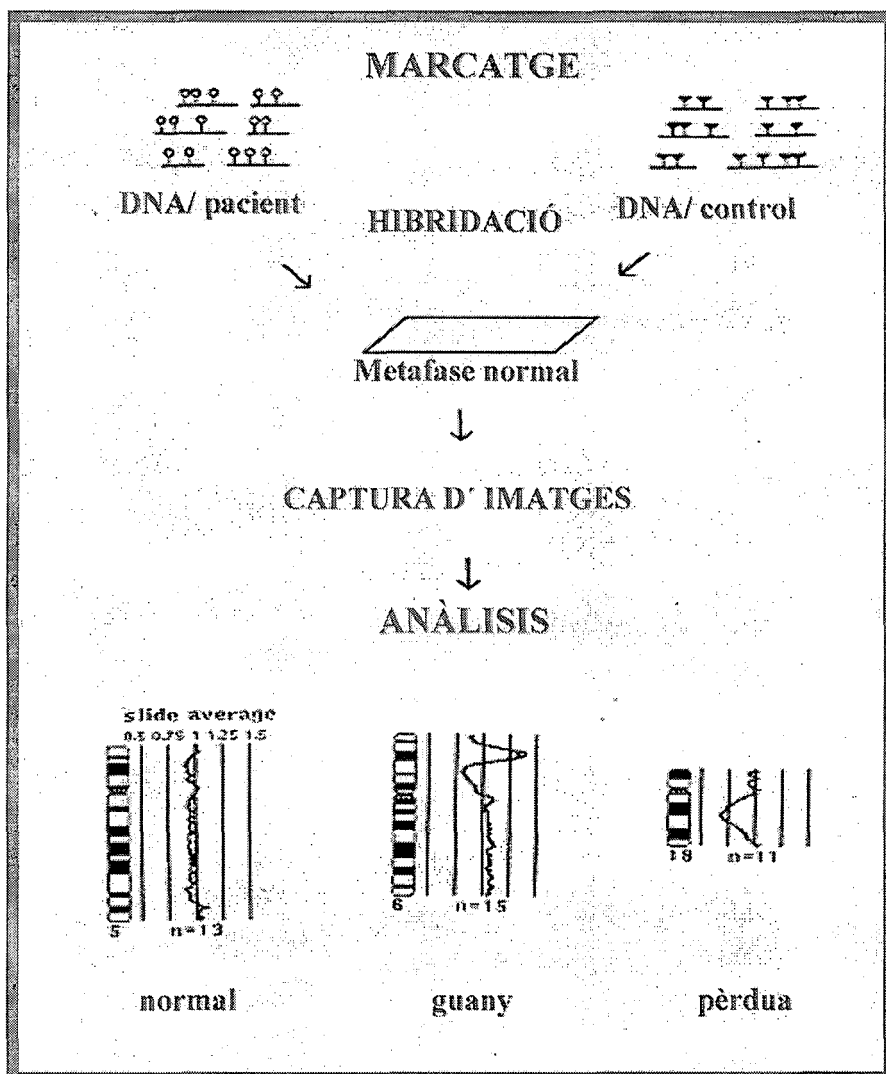


Figura 2. Esquema de la tècnica de CGH.

2. ALTERACIONS CROMOSÒMIQUES CONSTITUCIONALS

2.1. TIPUS I INCIDÈNCIA

Les alteracions cromosòmiques constitucionals poden ser causa de síndromes clíniques, infertilitat, avortaments de repetició i altres manifestacions clíniques. En l'actualitat es coneixen més de 60 síndromes degudes a anomalies dels cromosomes. Aquestes alteracions poden estar presents en totes les cèl·lules de l'individu o bé, menys sovint, en forma de mosaïcisme.

Aproximadament el 20% de totes les concepcions presenten alteracions cromosòmiques, però la majoria no arriben a implantar-se o avorten espontàniament. La incidència d'anomalies cromosòmiques a nounats es d'un 0.65%; aquesta freqüència varia segons la etapa del desenvolupament. En diagnòstic prenatal s'han detectat alteracions citogenètiques en el 3% dels embrions de primer trimestre i en el 2% de segon trimestre (Lippman et al 1992). Tanmateix s'han observat alteracions cromosòmiques en un 10% dels espermatozoides de un individu sa i aproximadament en la meitat dels embrions procedents de programes de fertilització in vitro de parelles subfèrtils i en més del 50% dels avortaments espontanis (Hsu,1992; Guttenbach et al 1997; Munné et al 1998).

Les alteracions cromosòmiques es classifiquen en numèriques i estructurals. Es considera que aproximadament 1 de cada 150 nounats té una alteració cromosòmica moderada o greu. El tipus d'anomalia cromosòmica més freqüent es la numèrica i concretament les trisomies autosòmiques 21, 13, 18 i les que afecten els cromosomes sexuals 47,XXY; 47,XYY; 47,XXX i la monosomia 45,X.

L'obtenció de DNA genòmic de qualsevol mostra permet l'amplificació per PCR d'algun gen o marcador específic d'un cromosoma concret, utilitzant oligonucleòtids complementaris. Darrerament una variant anomenada PCR fluorescent quantitativa (QF-PCR) possibilita una ràpida detecció prenatal de les aneuploidies més freqüents que afecten als cromosomes X, Y, 13, 18, i 21 (Adinolfi et al 1997; Cirigliano et al. 2001). El gran avantatge d'aquesta tècnica molecular és, a part de la seva rapidesa i fiabilitat, que es pot obtenir DNA d'una mostra molt petita que a vegades resulta insuficient per obtenir cromosomes.

Les anomalies estructurals es produeixen per trencaments dels cromosomes originant fragments cromosòmics que poden perdre's (deleció) o intercanviar-se (reorganitzacions). La pèrdua de gens en el primer cas o el possible canvi d'activitat gènica en el segon produeixen, en molt casos, disfuncions cel·lulars. Si aquestes alteracions cromosòmiques tenen lloc a la meiosi, abans de la concepció, estaran presents en totes les cèl·lules del fetus. Si els errors es produeixen a la mitosis

postconcepcional, el resultat és un fetus mosaic on existeixen cèl·lules normals i cèl·lules amb alteracions cromosòmiques.

Les anomalies estructurals representen un 10% de totes les alteracions cromosòmiques i poden ésser equilibrades o desequilibrades (Hsu, 1992). Les més freqüents són les equilibrades que estan presents en un 2% dels nounats i en el 5% d'embrions analitzats per diagnòstic prenatal; mentre les desequilibrades constitueixen un 0.04% i 0.06% respectivament (Hsu, 1992; Jacobs et al. 1992; Yu et al. 1997; Bugge et al. 2000). Les alteracions estructurals més freqüents són les translocacions.

La prevalència d'anomalies cromosòmiques de novo en nounats es mostra a la taula 1.

Taula 1. Incidència d'alteracions cromosòmiques de novo

Alteracions cromosòmiques	
Tipus	Nounats
Numèriques	
trisomia 21	1/700
trisomia 18	1/3000
trisomia 13	1/5000
47,XXY	1/1000
47,XYY	1/1000
47,XXX	1/1000
45,X	1/5000
Estructurals equilibrades	
translocacions	1/500
inversions	1/100
Estructurals desequilibrades	
translocacions	1/2000
Mosaics	1/3000
Cromosomes Marcadors	0.4-0.72/1000

Cal destacar que la freqüència en avortaments espontanis és la següent: el 52% són trisomies (d'elles, la més freqüent es la trisomia 16), el 18%, correspon a la monosomia X (45,X), el 17% triploidies i de 2-4 % translocacions.

No totes les alteracions cromosòmiques estan associades a malalties, però generalment les autosòmiques tendeixen a ésser més severes que les que afecten als cromosomes sexuals y les deleccions més severes que les duplicacions.

Es calcula que quasi el 25% de les anomalies estructurals equilibrades i un nombre molt gran de les desequilibrades s'associen a alteracions en el fenotip (Crolla, 1996; Brewer et al. 1998 y

1999; Bugge et al. 2000; Shaper and Lupski, 2000; Li et al. 2000). En aquest cas, les característiques clíniques més freqüents són retard mental, retard del creixement intrauterí, alteracions neurològiques, malformacions congènites i infertilitat. Aquest tipus de alteracions clíniques sovint són el resultat de l'alteració de molts gens.

Cadascuna de les anomalies cromosòmiques estructurals pot considerar-se com única ja que, encara que els punts de trencament observats al microscopi, es trobin a la mateixa banda, poden estar separats entre sí per varies megabases (Warburton, 1991). La pèrdua o duplicació de segments cromosòmics d'una mida semblant pot tenir conseqüències molt diferents depenent del nombre i funció dels gens que es localitzen en aquestes regions. Algunes alteracions cromosòmiques estructurals són fenotípicament innòcues (variants polimòrfiques com la inversió pericèntrica del cromosoma 9) però també s'han descrit individus que presentaven alteracions cromosòmiques sense alteracions fenotípiques aparents (Gardner and Sutherland, 1996).

La tècnica de FISH convencional està estandaritzada en la majoria dels laboratoris de citogenètica al permetre la detecció tant d'anomalies cromosòmiques numèriques com estructurals. Les dues grans avantatges de aquesta tècnica són: la rapidesa i la facilitat en la detecció d'anomalies com microdeleccions, duplicacions i reorganitzacions complexes. L'any 1993, Ward et al. varen evidenciar la utilitat de aquesta tècnica per realitzar grans screenings de aneuploidies en mostres de líquid amniòtic no cultivat (emprant sondes pels cromosomes amb més rellevància en la clínica en el diagnòstic prenatal 13, 18, 21, X e Y). La utilització de sondes de pintat cromosòmic es especialment útil per detectar reorganitzacions complexes i per la identificació dels cromosomes marcadors, al evidenciar fàcilment la existència de intercanvis entre cromosomes no homòlegs degut a la presència de colors diferents en un mateix cromosoma (Batista et al. 1993; Fuster et al. 1997; Wicczorek et al. 1998; Lee et al. 2002). Per altra banda, la possibilitat de realitzar múltiples hibridacions (no simultànies) utilitzant diferents tipus de sondes (de seqüència única, de pintat cromosòmic, centromèriques) sobre una mateixa preparació ha resultat molt útil, especialment en el diagnòstic prenatal, preimplantacional o preconcepcional i en general quan es disposa de poc material (Larin et al 1994; Escudero et al. 1997).

La tècnica de CGH constitueix una alternativa a la de FISH en la caracterització d'alteracions cromosòmiques numèriques i estructurals desequilibrades (incloent duplicacions i deleccions). L'eficàcia d'aquesta tècnica per la identificació de alteracions cromosòmiques constitucionals va quedar palesa, per primera vegada, en el treball de Bryndorf et al. (1995) al identificar un desequilibri cromosòmic, prèviament detectat per bandes G, en un cas de diagnòstic prenatal.

Posteriorment, l'aplicació de la CGH al diagnòstic postnatal va permetre caracteritzar anomalies que eren impossibles de identificar amb la citogenètica convencional (Erdel et al 1997; Levi et al 1997; Yu et al. 1997; Daniely et al. 1998; Lapierre et al. 1998; Airam-Goldring et al. 2000; Levy and Hirschhorn, 2002). La utilitat de la CGH ha quedat palesa en la identificació d'alteracions desequilibrades en diferents teixits: amniòcits no cultivats (Lapierre et al. 2000), avortaments espontanis (Daniely et al. 1999 a,b), placenta (Christiaens et al. 2000; Ozcan et al 2000; Tabet et al. 2001); blastòmers (Voullaire et al. 2000) i en corpuscle polar (Wells et al. 2002). A més, permet la detecció de mosaics confinats a placenta (Lestau et al. 1999 i 2000)

2.2. ANOMALIES CROMOSÒMIQUES CRÍPTIQUES

A causa de les limitacions de les tècniques de citogenètica convencional, fins ara, son poques les regions cromosòmiques crítiques associades a un síndrome clínic concret. Entre aquests es troben les síndromes degudes a microdelecions com la de Williams (deleció a 7q11.23), la de Prader-Willi i la d'Angelman, (deleció a 15q12), la de Smith-Magenis (deleció a 17p11.2), la de DiGeorge/velocardiofacial (deleció a 22q11.2) entre d'altres.

Actualment, amb la existència de sondes comercials específiques d'aquests loci es possible diagnosticar tan microdelecions com microduplicacions e inversions (Lichter et al 1991; Ward et al 1993; Shaffer et al. 1995). L'any 1997, Ligon et al. varen realitzar el primer estudi pilot per detectar la presència de microdelecions en pacients amb retard mental i de creixement utilitzant un còctel de sondes multicolor de les regions més freqüents implicades en aquestes síndromes. Podem concloure que la combinació d'estudis citogenètics i moleculars ha permès detectar i relacionar la presència de microdelecions i microduplicacions amb diverses síndromes (Fig.3).

Les regions telomèriques son molt riques en gens i poden presentar anomalies cromosòmiques críptiques que, en molts casos, no es poden detectar a l'utilitzar bandes G. L'any 1993, Meltzer et al. combinant els mètodes de FISH i microdissecció, varen demostrar que es podien detectar delecions i translocacions telomèriques críptiques. Però com que la tècnica de microdissecció es molt laboriosa, actualment s'utilitzen les sondes multi-subtelomèriques específiques per la caracterització d'aquests tipus d'alteracions (Flint et al. 1995; Knight et al. 2000; Bezrookove et al 2000). Amb aquesta metodologia s'han trobat anomalies cromosòmiques críptiques afectant regions subtelomèriques en el 7% de pacients amb retard mental moderat/sever associat a malformacions congènites (Knight et al. 1999).

Segons el estudis realitzats per Benz et al. (1998), la CGH-convencional permet la detecció de delecions cromosòmiques majors de 10 Mb. Però diferents equips han descrit desequilibris

cromosòmics críptics utilitzant aquesta metodologia. Així, Ghaffari et al.(1998) i Joly et al. (2001) han detectat anomalies cromosòmiques críptiques en casos on les bandes G indicaven un cariotip normal.

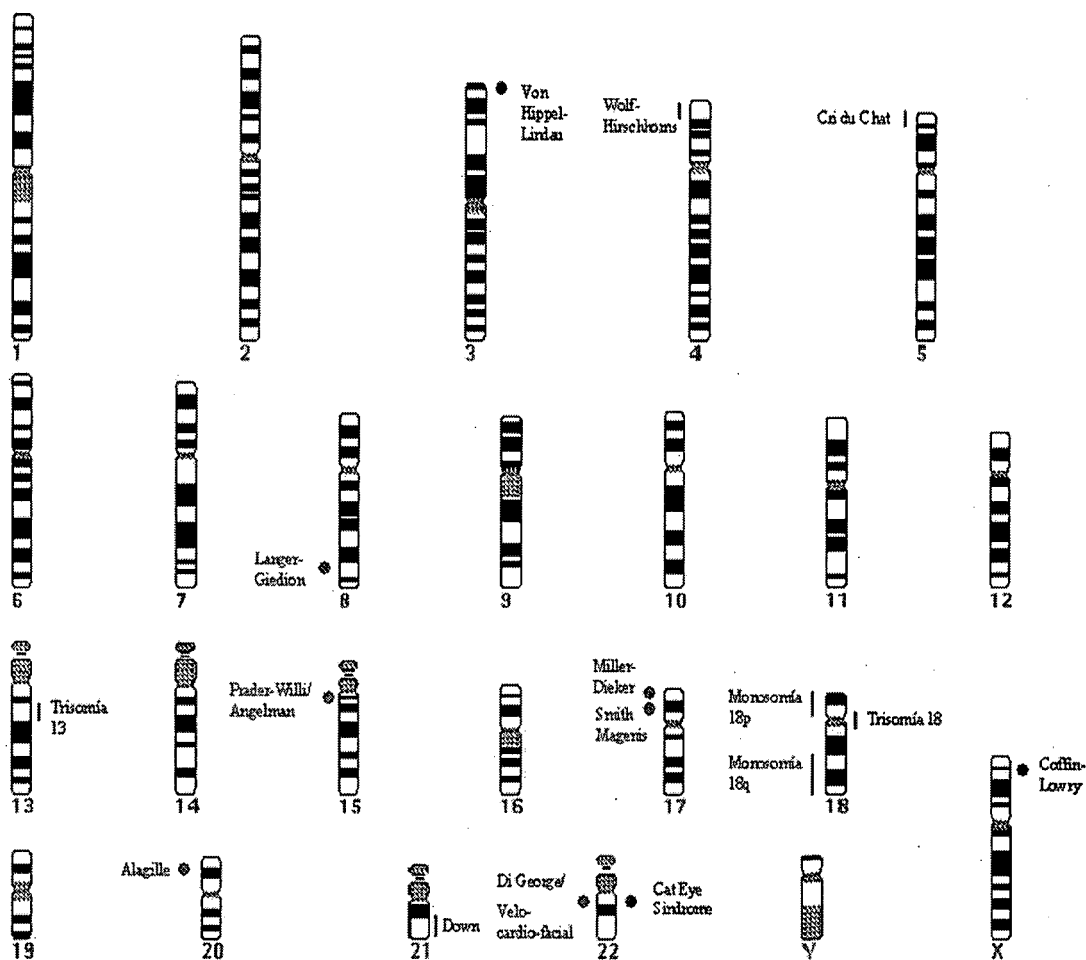


Figura 3. Microdelecions(verd) i microduplicacions(vermell) en síndromes.

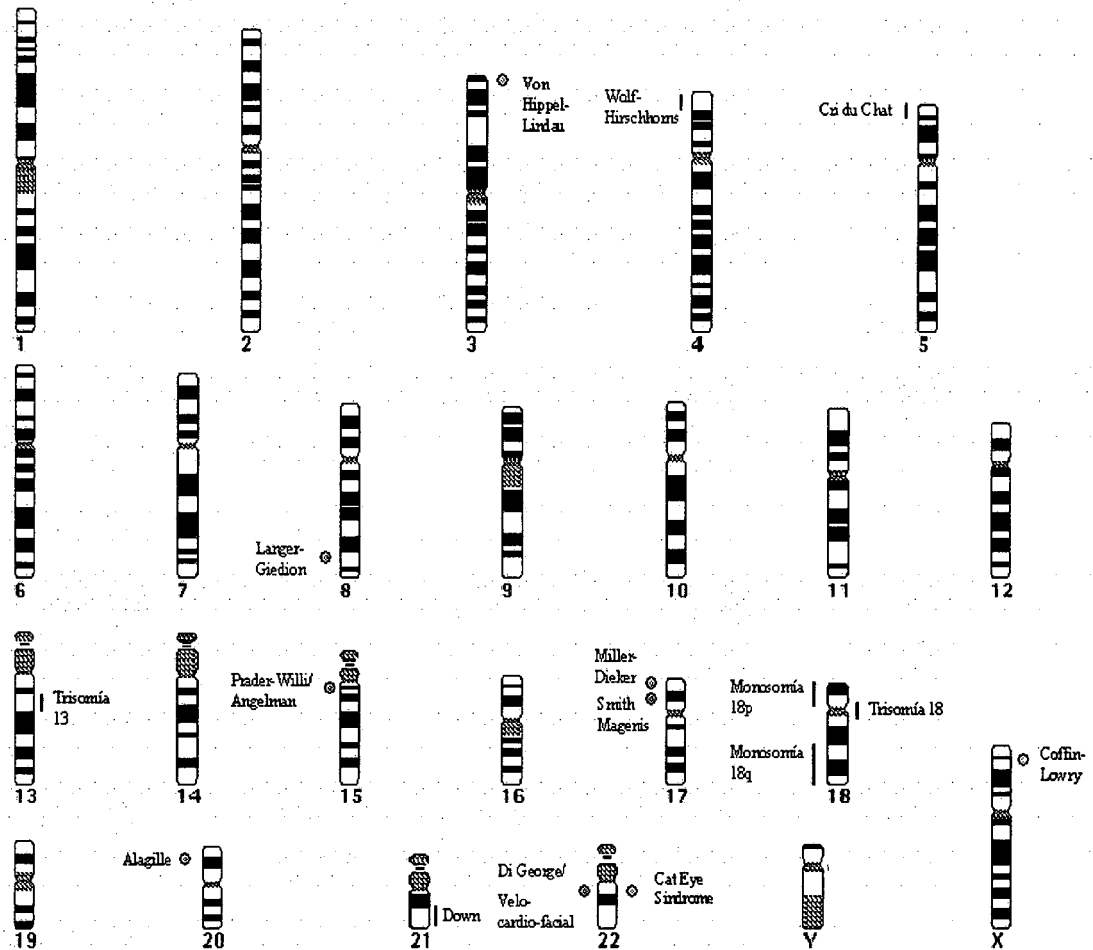


Figura 3. Microdeleccions(verd) i microduplicacions(vermell) en síndromes.

Breen et al. (1999) han demostrat que la CGH permet determinar tant l'origen de cromosomes marcadors supernumeraris com confirmar la presència de deleccions críptiques (prèviament detectades mitjançant FISH). Actualment, utilitzant aquesta tècnica es poden detectar deleccions associades a la síndrome de Prader-Willi/Angelman (de 3-5 Mb) però no les associades a les síndromes de DiGeorge i de Williams (1-2Mb) (Kirschhoff et al. 2000).

Breen et al. (1999) han demostrat que la CGH permet determinar tant l'origen de cromosomes marcadors supernumeraris com confirmar la presència de delecions críptiques (prèviament detectades mitjançant FISH). Actualment, utilitzant aquesta tècnica es poden detectar delecions associades a la síndrome de Prader-Willi/Angelman (de 3-5 Mb) però no les associades a les síndromes de DiGeorge i de Williams (1-2Mb) (Kirschhoff et al. 2000).

Darrerament, la CGH d'alta resolució (High Resolution CGH, HR-CGH) se està aplicant amb èxit per la identificació de desequilibris cromosòmics críptics en pacients amb dismorfologies i retard mental, detectant-se una major incidència d'alteracions cromosòmiques que en el screening utilitzant sondes subtelomèriques (Kirschhoff et al. 2001; Ness et al.2002). Es considera que la utilització d'aquesta metodologia en els laboratoris de citogenètica permetrà, en un futur pròxim, explicar un 10% de les alteracions del fenotip al detectar la presència d' alteracions cromosòmiques que fins ara no eren diagnosticades.

3. ALTERACIONS CROMOSÒMIQUES ADQUIRIDES EN TUMORS SÒLIDS EPITELIALS

3.1 INTRODUCCIÓ GENERAL

Quan es parla de càncer s'està fent referència a més de 300 malalties genètiques independents que el que tenen en comú és que s'originen per una acumulació de mutacions específiques o canvis adquirits en el DNA (Volgelstein i Kinzler, 1993), i per un creixement cel·lular descontrolat que esdevé maligne.

L'anàlisi citogenètica de les cèl·lules tumorals ha proporcionat una important informació en la biologia del càncer. Les cèl·lules somàtiques pateixen mutacions i si aquestes evolucionen poden induir neoplàsies. S'ha descrit la presència d'alteracions cromosòmiques clonals (únic progenitor cel·lular) en més de 30.000 neoplàsies humanes (Mitelman, 1998). Moltes d'aquestes alteracions s'han caracteritzat molecularment i han permès la identificació de nous oncogenes i gens superiors de tumors implicats en la gènesi tumoral. Així cada dia són més conegudes les alteracions citogenètiques responsables de la transformació neoplàstica i els mecanismes moleculars implicats. En neoplàsies hematològiques i sarcomes, l'anàlisi citogenètica constitueix una important eina diagnòstica i pronòstica incorporada a la rutina del laboratori, ja que en general una alteració específica caracteritza freqüentment una patologia. En tumors sòlids l'ús està força més limitat degut a problemes tècnics en el cultiu de les mostres, presència de múltiples clons cel·lulars i cariotips complexos. En particular, els tumors epitelials es caracteritzen per un nombre elevat d'alteracions cromosòmiques complexes i cap és específica d'un tipus de tumor determinat. L'elevat grau d'instabilitat genòmica en forma de nombroses alteracions numèriques i estructurals, així com l'elevada heterogeneïtat tumoral són propietats comuns a la majoria de carcinomes caracteritzats citogenèticament.

Una revisió sobre la freqüència i distribució dels desequilibris cromosòmics detectats amb bandes G en 3185 tumors sòlids corresponents a 11 tipus diferents (Mertens et al 1997) va mostrar que les alteracions més freqüents, eren les pèrdues dels cromosomes X, Y, 4, 10, 13, 14, 15, 18, 22, 1p22pter, 3p13pter, 6q14qter, 8p, 9p, 11p i els guanys dels cromosomes 7, 20, 12q i 11q. En aquest estudi s'observava que, en general, les pèrdues eren més freqüents que els guanys.

Per altre banda, la revisió de les dades aportades per la tècnica de CGH en tumors sòlids ha mostrat que els guanys són més comuns que les pèrdues (Rooney et al 1999). Aquesta diferència pot ser deguda a les dificultats d'identificació de les alteracions cromosòmiques amb bandes G en aquells casos en que el cariotip del tumor és molt complex.

Les alteracions detectades per CGH en els diferents tipus de tumors epitelials, que per altre banda són comuns a la majoria dels tumors estudiats, són els guanys a 3q,8q,20q,1q i les pèrdues a 8p, 13q,17p (revisat per Forozan et al.1997). Cal destacar que la tècnica de CGH ha permès identificar nombroses amplificacions tant en regions cromosòmiques on es localitzen oncogens coneguts com en d'altres desconegudes fins el moment.

3.2 CARCINOMA RENAL

Quan es parla de tumors renals o carcinoma de cèl·lules renals (RCC) es fa referència a neoplàsies que sorgeixen del parènquima renal excloent els tumors de la pelvis renal i els calces. Dintre dels tumors renals hi distingim dos grans grups: el carcinoma renal a l'adult i el tumor de Wilms (Nefroblastoma) a l'infant. En aquest apartat només farem referència al carcinoma renal.

EPIDEMIOLOGIA

El 80% dels tumors renals són adenocarcinomes, que poden ésser de cèl·lules clares amb patró de creixement sòlid i de cèl·lules cromofíliques amb patró de creixement papil·lar. La forma sarcomatoide representa menys del 5% dels casos, presentant pitjor pronòstic, donada la gran tendència a desenvolupar metàstasis, independent del tractament del tumor primari.

El carcinoma renal representa el 85-90% de les neoplàsies malignes del parènquima renal. És més freqüent en l'home (1.6 vegades) i l'edat d'aparició més freqüent és a partir dels 50-60 anys.

Distribució geogràfica

1. Incidència alta :Dinamarca , Nova Zelanda , Noruega, Escòcia.
2. Incidència intermitja: Austràlia, Bèlgica , França, Holanda, EEUU.
3. Incidència baixa: Irlanda, Itàlia, Japó, Espanya, Veneçuela.

Factors etiològics

El consum de tabac, cafè, grasses animals, l'obesitat (sobretot en dones), l'hipertensió , alguns tractaments amb estrògens, exposició ocupacional a productes derivats del petroli, metalls pesats, asbest, cadmi, diòxid de tori (thorotrast), productes emprats en el curtint de la pell i exposició a radiacions ionitzants. També s'ha relacionat amb el consum crònic d'analgèsics tipus fenacetina i amb certes infeccions víriques (MostolfiFK, Algaba F. Et al 19909). El risc a patir càncer renal també incrementa en pacients afectats de la malaltia quística renal adquirida associada a insuficiència renal crònica i esclerosi tuberosa (revisat a Motzer et al 1996).

En la majoria dels casos, els tumors renals apareixen de forma esporàdica sense un patró d'herència reconegut. Hi ha però formes familiars molt poc freqüents que és caracteritzen per un patró d'herència autosòmica dominant, aparició a edat jove i tumors bilaterals i multifocals. La Síndrome de Von Hippel-Lindau presenta una predisposició familiar a una varietat de neoplàsies entre les que s'inclou el càncer renal de cèl·lules clares que apareix en un 40% dels pacients amb la síndrome. El gen responsable (VHL) es localitza a 3p25-26 i codifica per una proteïna que juga un paper important en els mecanismes de control de la tumorigènesi i angiogènesi. La proteïna VHL activa els mecanismes de control en les vies de degradació mediada per ubiquitina

i regula negativament la síntesi de factors induïts per l'anòxia (Murata et al. *Cancer Research* 2002).

Altres formes familiars del carcinoma renal de cèl·lules clares s'han trobat associades a una translocació constitucional equilibrada entre el cromosoma 3p i el cromosoma 6 o el cromosoma 8 (Cohen et al 1982, Pathak et al. 1982 *NEJM*). Mes recentment s'han detectat formes familiars associades a translocacions entre 3q i els cromosomes 1 i 2 (Kanayama et al. 2001 i Bodmer et al. 2002 respectivament). La forma hereditària del carcinoma renal de tipus papil·lar s'ha associat a mutacions constitucionals del protooncogen *MET* localitzat a 7q (Schmidt et al. 1997 MARTA).

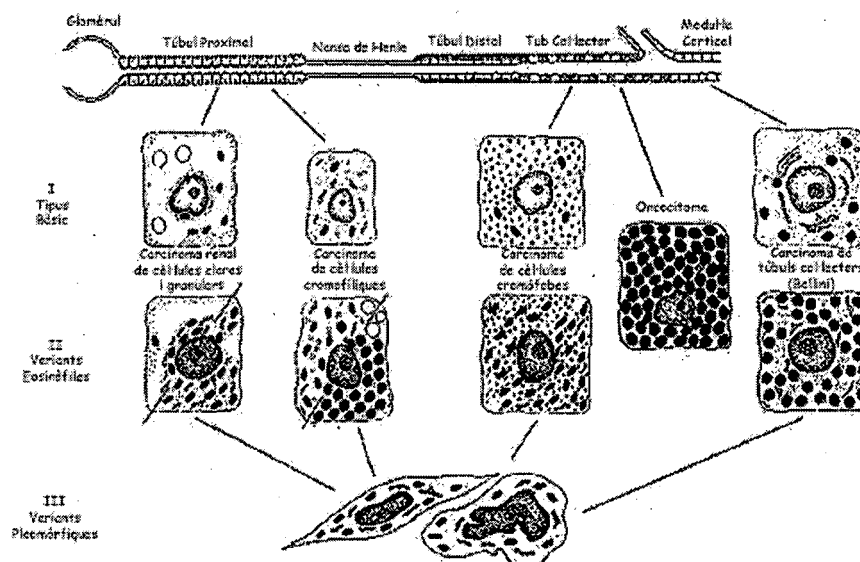
CARACTERÍSTIQUES HISTOMORFOLÒGIQUES

La nefrona ha anat adquirint una rellevància en oncologia cada vegada més gran, des del moment que s'han començat a subdividir els tipus cel·lulars dels carcinomes segons el suposat tram d'origen. En la nefrona s'hi distingeixen els següents segments: 1. Túbul proximal, 2. Nansa de Henle, 3. Tub distal, 4. Tub connector, 5. Tub col·lector, 6. El ducte de Bellini.

Dins dels tumors renals es consideren els següents (Figura 4). Els diferents tipus cel·lulars que es poden observar :

1. Cèl·lules clares
2. Cèl·lules granulars (sembla ésser una variant de les cèl·lules clares)
3. Cèl·lules basòfiles (o cromòfiles)
4. Cèl·lules cromòfobes
5. Cèl·lules oncocítiques
6. Cèl·lules del ductes col·lectors (de Bellini)
7. Cèl·lules fusiformes (aspecte sarcomatoide)

Figura 4. Diferents parts de la nefrona i tipus cel·lulars dels tumors renals.



Patrons de creixement (Figura 5)

Els diferents tipus de patrons de creixement observats són:

- 1. Patró Sòlid: la distribució de les cèl·lules neoplàssiques és uniforme amb estroma finament capil·lar.*
- 2. Patró tubular: formes de petits túbuls .*
- 3. Patró quístic: presència d'estructures tubulars amb dilatació de llum (quistes) .*
- 4. Patró papil·lar: el creixement de cèl·lules neoplàssiques és al llarg d'un eix connectiu i és el que constitueix el patró papil·lar vascular.*

CLASSIFICACIÓ HISTOPATOLÒGICA-CITOGENÈTICA-MOLECULAR

La correlació entre les dades histopatològiques, citogenètiques i moleculars, ha permès arribar a una classificació consensu segons la qual, els tumors renals es classifiquen en els següents tipus) (Fig 4 . Thoenes et al 1986)

a- carcinoma renal de cèl·lules clares

Representa el 60-80% dels carcinomes, es considera originat en el tub proximal , i es caracteritza per la pèrdua del braç curt del cromosoma 3 (Daniel L.N et al 1989)

b- carcinoma de cèl·lules cromofíliques

Representa el 7-14% dels carcinomes, generalment és papil·lar i es considera que s'origina en els túbuls proximals. Es caracteritza per la presència de trisomies dels cromosomes 7, 17 i pèrdua del cromosoma Y en els adenomes i trisomies addicionals dels cromosomes 16,12 i 20 en els carcinomes .

c- carcinoma de cèl·lules cromòfobes

Representa el 5-10% dels carcinomes i es considera originat en les cèl·lules intercalars dels tubs connectors o zona cortical dels col·lectors. Es caracteritza per les pèrdues dels cromosomes 1,2,6,10,13,17, i 21.

d- Oncocitoma

Representa el 5% del contingent de neoplàsies renals d'origen incert; possiblement originat en els tubs distals i en els que s'han descrit traslocacions dels cromosomes 1,11,13,22 (Kovacs G. et al 1987)

e- Carcinoma de túbuls col·lectors (o ducte de Bellini)

Representa el 1-2% dels carcinomes i es caracteritza per la Monosomia dels cromosomes 1,6,14,15,22. A l'igual que els carcinomes urotelials de cèl·lules transicionals, presenta alteracions de braços llargs del cromosoma 1 (Fuzesi L. et al 1992)

f- Carcinoma fus-cel·lular o sarcomatoide

Representa el 1-10% dels tumors renals i es considera com una forma morfològica derivada dels tipus cel·lulars anteriors (Baer S et al 1993)

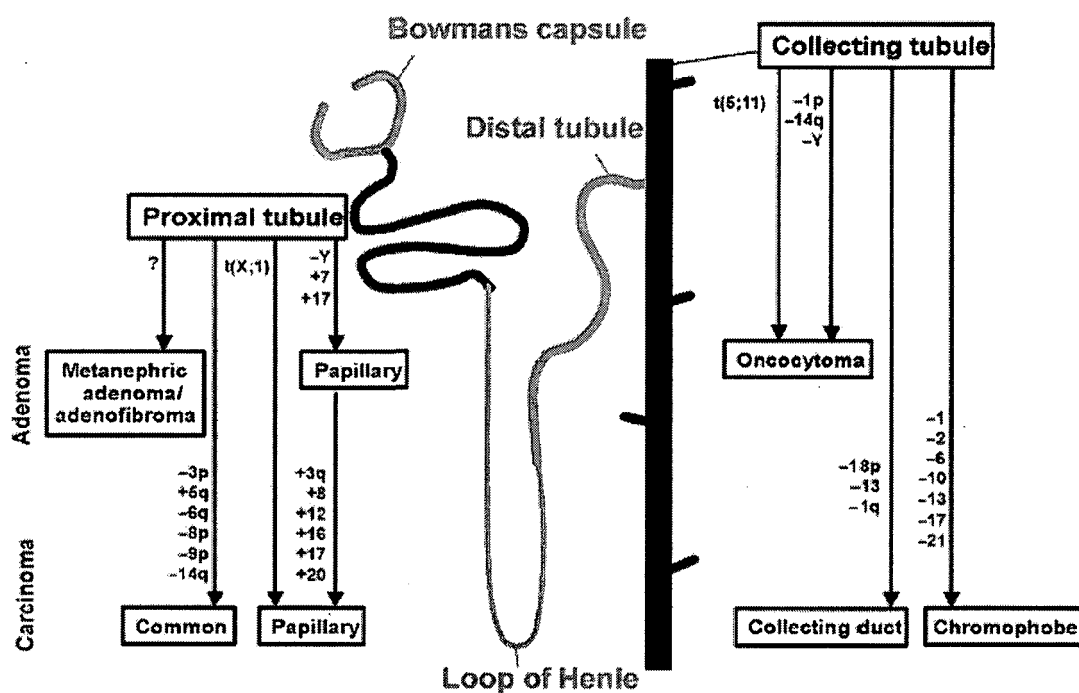
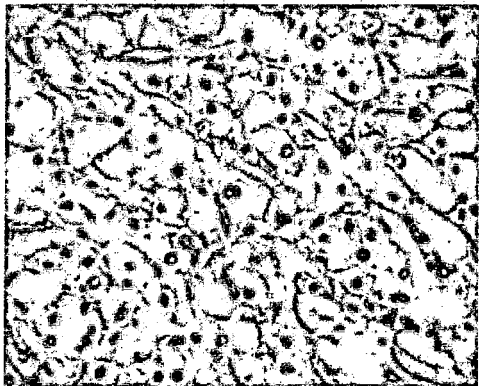
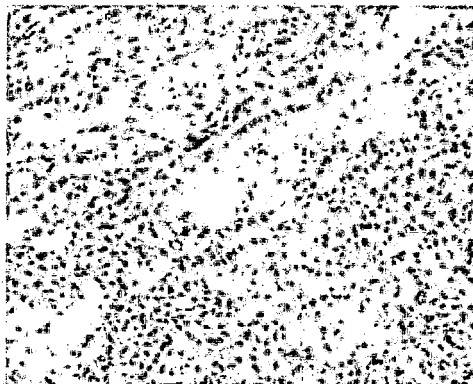


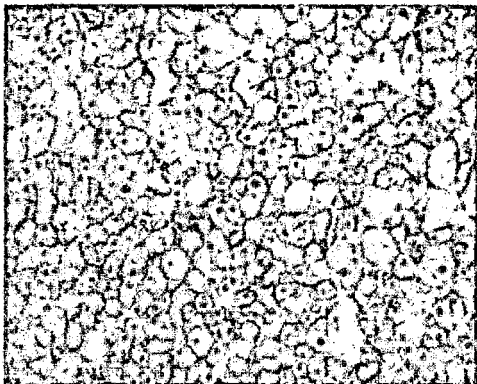
Figura 6. Classificació histopatològica-citogenètica-molecular dels tumors renals.



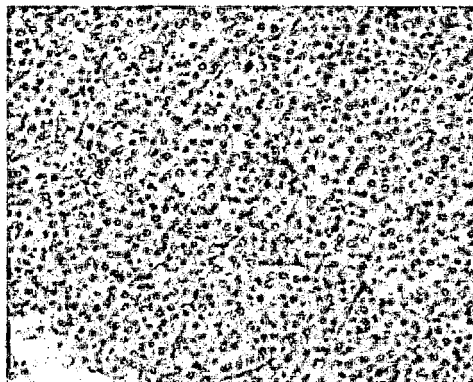
Cèl.lula clara, grau III. Patrò sòlid. HE x400.jpg



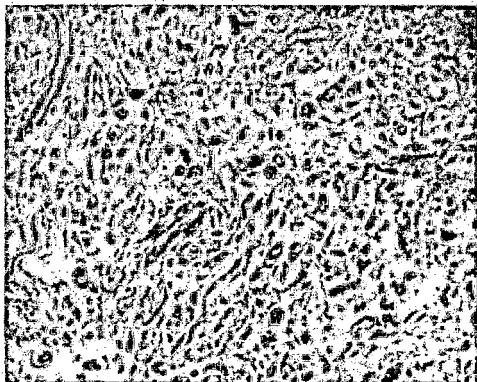
Papil.lar-Cromòfil. Grau II. HE x200.jpg



Cromòfob. Grau II. HE x200.jpg



Oncocitoma. GI. HE x200.jpg



C. sarcomatoida, gIV. HE x200.jpg

Figura 5. Tipus cel·lular, patró de creixement i grau dels diferents tipus de tumors renals.

GRAU I ESTADI

El grau de diferenciació nuclear i l'estadi d'extensió dels tumors s'utilitzen com a factors de pronòstic.

En els RCC s'estableix el grau respecte a la atípia nuclear incloent la mida del nucli, el seu contorn i la presència i visibilitat del nucleol.

Actualment d'acord amb la classificació de Fuhrman, es distingeixen 4 graus (G1, G2, G3, G4). (Fig 5).

L'estadi del tumor en càncer renal, segueix els criteris TNM (Tumor Node Metastasis) designats pel Comitè Americà Conjunt sobre el Càncer (AJCC)1997. Veure Taula 4 i Figura 7.

Taula 4. Classificació TNM de tumors renals	
T	Tx No es pot avaluar el tumor primari
Tumor primari	T0 No existeixen signes de tumor primari
	T1 Tumor limitat al ronyó de diàmetre <7cm
	T2 Tumor limitat al ronyó de diàmetre >7cm
	T3 Tumor que s'extén a les venes principals o envaeix la glàndula suprarenal o teixits perirenals/perinefrics però sense atravesar la fàscia de Gerota
	T3a Invasió de glàndula suprarenal o teixits perirenals però sense atravesar la fàscia de Gerota
	T3b Invasió de la vena renal o cava infradiafragmàtica
	T3c Invasió de vena cava supradiafragmàtica
	T4 Tumor que atravesa la fàscia de Gerota
N	Nx Els ganglis limfàtics regionals no poden ésser avaluats
Ganglis Limfàtics Regionals	N0 No hi ha signes de metàstasi a gangli limfàtic regional
	N1 Metàstasi a un únic gangli limfàtic regional
	N2 Metàstasi a més d'un gangli limfàtic regional
M	Mx La presència de metàstasi distant no pot ésser avaluada
Metàstasi	M0 No hi ha metàstasi distant
	M1 Metàstasi distant

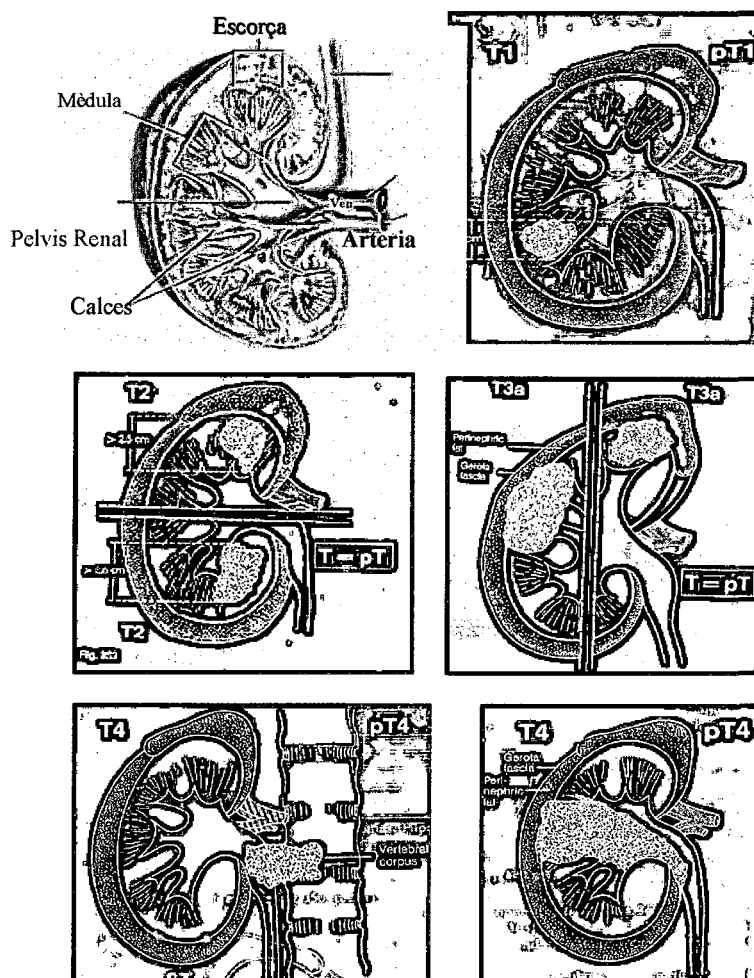


Figura 7. Imatges d'estadis d'invasió dels tumors renals.

ESTUDIS CITOGENÈTICS

Tal i com s'ha indicat anteriorment, la citogenètica permet la classificació dels tumors renals respecte les seves diferències genotípiques. A més, les dades citogenètiques mostren un patró d'evolució en aquests tumors que proporciona informació rellevant sobre el pronòstic de la malaltia.

De forma general podem dir que en aquells casos en que no es produeix una regressió de les cèl·lules embrionàries, aquestes poden desenvolupar un tumor renal papil·lar amb l'aparició de les trisomies 7 i 17 i la pèrdua del cromosoma Y. En el procés de transformació d'adenoma a carcinoma està implicat el guany de determinades regions cromosòmiques tal com les trisomies 8, 12, 16 i 20 i la duplicació de 3q. El guany de 10q estaria relacionat amb la transformació sarcomatoide i la pèrdua de 3p21 s'ha observat en alguns RCC papil·lars que evolucionen cap a la forma més maligna de RCC de cèl·lules clares, reflectint una relació més estreta entre aquestes dues formes de carcinomes renals. Per altre banda, un subtipus de carcinoma renal papil·lar es caracteritza per translocacions equilibrades implicant a la regió Xp11.2.

L'estudi d'aquests tumors mitjançant CGH ha mostrat que a més dels guanys observats amb bandes G, apareixen de forma freqüent guanys a 5q i pèrdues de 1p, 4q, 6q, 9p, 13q i Y.

El carcinoma renal de cèl·lules clares es caracteritza per la pèrdua de 3p (per translocació desequilibrada, deleció o monosomia 3) o alteracions moleculars que afecten a 3p. Un augment de desdiferenciació nuclear ($GI \geq GII$) s'acompanya de guanys del cromosoma 5q, 7 i 10. Pèrdues dels cromosomes 6q, 8p, 14q i 9 apareixen durant la progressió. Els estudis amb CGH coincideixen amb els de citogenètica convencional mostrant la pèrdua de 3p com alteració més freqüent seguida de pèrdues als cromosomes 9p, 13q, 6q i guanys a 5q.

Els oncocitomes són citogenèticament heterogenis. Un grup es caracteritza per la translocació recíproca $t(5;11)(q35;q13)$ que implica gens que codifiquen enzims de la cadena respiratòria del mitocondri. Un altre grup es caracteritza per la pèrdua del cromosoma 1 i per la presència d'associacions telomèriques. La pèrdua de material del cromosoma 1 és l'alteració més freqüent detectada per CGH en oncocitomes. Altres alteracions freqüentment detectades amb aquesta tècnica són pèrdues implicant al cromosoma 14 i als cromosomes sexuals.

El carcinoma de cèl·lules cromòfobes presenta la pèrdua de material cromosòmic més abundant coneguda en un tumor. La forma més típica es caracteritza per múltiples monosomies (-1, -2, -6, -10, -13, -17, -21, i -Y) que s'han confirmat per citogenètica convencional, FISH i CGH.

L'estudi de les proliferacions epitelials atípiques en la malaltia de quists renals adquirits ha mostrat la presència d'aneuploidies afectant als cromosomes 7, 17, 12 i 20 en diferents tipus de lesions. Aquest descobriment indica que aquestes proliferacions poden considerar-se com a lesions neoplàstiques primerenques (Cheuk et al 2002).

A continuació fem un breu resum d'alguns dels estudis citogenètics i moleculars que s'han portat a terme en carcinomes renals i la correlació amb cada un dels tipus i subtipus establerts fins al moment.

CARCINOMA RENAL DE CÈL·LULES CLARES

Pèrdua de 3p

Es l'alteració més característica

_ En algunes formes familiars rares, s'han descrit translocacions constitucionals equilibrades implicant 3p12p-14 (Cohen et al. 1979, Pathak et al. 1982; Kovacs et al. 1989, Dal Cin et al 1996). Observant-se, en els tumors, la pèrdua parcial de 3p per desequilibri de la translocació.

_ La pèrdua de 3p s'observa també en estudis citogenètics de tumors esporàdics (Yoshida et al. 1986, Kovacs et al. 1987).

_ Detecció d'una translocació constitucional $t(1;3)(q32-41;q13-21)$ en una família amb RCC de cèl·lules clares (Kanayama et al. 2001)

_ Translocació constitucional $t(2;3)(q35;q21)$ en una família amb RCC. Caracterització de la regió 3q13-q22 (Bodmer et al. 2002 a).

_ Caracterització del gen *DIRC2* localitzat a 3q21 i afectat pel trencament de la translocació familiar $t(2;3)(q35;q21)$ (Bodmer et al. 2002 b).

_ Gen *DIRC2* afectat per la translocació constitucional $t(2;3)(q35;q21)$ no es troba associat al desenvolupament del tumor (Bodmer et al. 2002)

_ Detecció del gen *TRC8* localitzat al cromosoma 8 i que es interromput per la $t(3;8)$ (Gemmill et al. 2002)

_ Delecions i pèrdues al·lèliques a 3p (Tajara et al. 1988, Kovacs and Frisch 1989, Van den Berg et al.1993; Presti et al. 1993;Iqbal et al. 1996)

_ Introducció d'un 3p en línia cel·lular establerta a partir d'un carcinoma d'aquest tipus modera la tumorigenicitat d'aquestes cèl·lules (Shimizu et al. de polimorfismes en la mida de fragments de restricció RFLP i amplificació de microsatèl·lits per PCR, han mostrat la pèrdua de diferents regions d'aquest braç cromosòmic: 3p12, 3p13-p14.2, 3p21-24, 3p25-26 en més del 97% des casos (Yamakawa et al. 1991;Van der Hout et al. 1993; Lubinski et al. 1994; Foster et al.

1994; Wilhelm et al. 1995; Van der Berg et al. 1996; Chudek et al. 1997). Pèrdues al·lèliques en els loci 3p14.3-3p24.3 s'han detectat en més de 97% dels casos.

_ Pèrdua de 3p detectada per CGH en el 63% dels casos (Reutzel et al. 2001)

_ Detecció de tres regions crítiques per la localització de gens supressors a 3p: regió 3p26.1-p25.3, 3p25-p24.3, 3p21.3 (Braga et al. 2002)

_ El gen VHL (malaltia Von Hippel- Lindau) és, de moment, l'únic gen associat a carcinomes renals de cèl·lules clares. Aquest gen amb locus a 3p25p-26 va ser identificat per estudis de lligament en pacients afectats per la síndrome i ha estat proposat com a gen supressor de tumors. Mutacions del gen VHL s'han trobat en el 50% de carcinomes de cèl·lules renals no papil·lars (Gnarra et al. 1994, Kench et al. 1996)

_ Estudis de tumors renals en pacients amb la síndrome de Von Hippel-Lindau indiquen que els tumors de baix grau amb nombre cromosòmic pròxim a diploide, es caracteritzen per translocacions recíproques, dicèntriques i/o isocromosomes i aneuploïdies. Els tumors d'alt grau i les seves metàstasi ganglionars son altament aneuploïds i presenten translocacions equilibrades que impliquen la pèrdua de 2q, 3p, 4q, 9p, 14q, i 19p (Philips et al. 2001)

_ Les mutacions en VHL gen estan relacionades amb RCC de cèl·lules clares i poden ocórrer com a canvis en l'inici del tumor i com canvis tardans (Kondo et al. 2002)

_ Les deleccions a 3p amb punts de trencament pròxims al locus de VHL es troben en el 90% dels tumors i fa pensar que altres gens localitzats a 3p estan implicats a la tumorigènesi renal.

_ El gen FHIT (Ohta et al. 1996) està localitzat en el punt de trencament de la t(3;8)(p14.2;q24) dels tumors dels individus de la família descrita per Cohen l'any 1979. Bugert et al. (1997) van descartar la implicació genètica de la regió que conté aquest gen en la tumorigènesi renal.

_ Més recentment, s'han observat canvis en l'expressió del gen FHIT durant la progressió del tumor suggerint un paper que el mecanisme de canvis reversibles en la inactivació d'aquest gen pot tenir un paper durant l'inici i progressió del RCC de cèl·lules clares (Ramp et al. 2002)

_ S'han analitzat regions crítiques de pèrdua a 3p21.3, localitzant almenys tres loci candidats a supressors relacionats amb càncer renal, càncer de cèl·lules microcítiques de pulmó i càncer colorectal (Braga et al. 2002)

Guany 5q

És l'alteració més freqüent després de la pèrdua de 3p (Kovacs and Frisch 1989, Van den Berg et al. 1993; Presti et al 1991; Moch et al. 1996)

-Guany de 5 detectada per CGH en el 63% dels casos. Es correlaciona amb baix grau (Reutzel et al. 2001)

-Amplificació de 5q23q-33 detectada per CGH (Yang et al. 2000)

Guany 7

-S'ha detectat de forma freqüent per citogenètica convencional (Kovacs and Frisch 1989, Van den Berg et al. 1993; Presti et al. 1991; Moch et al. 1996)

-S'ha detectat de forma freqüent per citogenètica convencional (Kovacs and Frisch 1989, Van den Berg et al. 1993; Presti et al. 1991; Moch et al. 1996)

-Guany del 7 detectada per CGH en el 35% dels casos (Reutzel et al. 2001)

-Amplificació de 7q22-qter (Yang et al. 2000)

Pèrdua Y

És freqüent i es troba associada a la pèrdua de 3p (Dal Cin et al. 1996)

Pèrdua de Y detectada per CGH en el 7% dels casos (Reutzel et al. 2001)

Pèrdues de 14q

-Reorganitzacions del cromosoma 14. Un 70% d'aquestes són monosomies del cromosoma 14 (Bérout et al. 1996)

-Pèrdua de 14q en un 54% dels casos analitzats per CGH (Yang et al. 2000)

-Pèrdua de 14q detectada per CGH en el 30% dels casos (Reutzel et al. 2001)

-Estudis moleculars relacionen la LOH de 14q amb agressivitat tumoral (Mitsumori et al. 2002)

Pèrdues de 6q,8p

-Pèrdua de 6/6q detectada per CGH en el 17% dels casos cada una d'elles (Reutzel et al. 2001)

-Pèrdua de 8/8p detectada per CGH en el 15% dels casos cada una d'elles (Reutzel et al. 2001)

Pèrdua del cromosoma 9

-L'estudi de pèrdues al·lèliques en el cromosoma 9 ha delimitat dues regions d'aquest cromosoma que contenen gens candidats a supressors de tumors a 9p21p-22 i 9q33-qter (Cairns et al. 1995)

-Estudis de LOH indiquen que la pèrdua més freqüent es a 9q22 on es localitza el gen PTCH (patched) (Fukunaga et al. 2002)

-Gen CDKN2/p16 localitzat a 9p21 es un gen candidat a gen supressor de tumors, la pèrdua dels seus al·lèls s'ha detectat en diverses línies cel·lulars tumorals (Cairns et al. 1995, Nobori et al. 1994, Kamb et al. 1995)

-Pèrdua de 9 detectada per CGH en el 26% dels casos (Reutzel et al. 2001)

-La pèrdua del 9 es més freqüent en tumors metastàsics (Junker et al. 2000)

-La pèrdua del gen Kank (Kidney ankyrin repeat-containing protein) localitzat a 9p24 pot estar relacionada amb la carcinogènesi renal (Sarkar et al. 2002)

Pèrdua 17p

- La freqüència de mutació del gen p53(localitzat a 17p13) en carcinomes de cèl·lules renal és molt baixa. (Uchida et al. 1994) - Les mutacions del gen p53 que donen lloc a una sobreexpressió de la proteïna estan estretament lligades a la transformació sarcomatoide dels carcinomes de cèl·lules renals.

-Pèrdua de 17p detectada per CGH en el 7% dels casos (Reutzel et al. 2001)

-La pèrdua del 17 es mes freqüent en tumors metastàsics (Junker et al. 2000)

Altres Alteracions

-Guany de 1q detectada per CGH en el 33% dels casos (Reutzel et al. 2001)

-Pèrdua de 1 detectada per CGH en el 17% dels casos (Reutzel et al. 2001)

-Pèrdua de 2/2q detectada per CGH en el 17% dels casos en cada una d'elles (Reutzel et al. 2001)

-Guany de 3q detectada per CGH en el 17% dels casos (Reutzel et al. 2001)

-Pèrdua de 4 detectada per CGH en el 17% dels casos, correlaciona amb estadis avançats (Reutzel et al. 2001)

-Pèrdua de 4q en el 62% dels casos estudiats per CGH (Yang et al. 2000)

-Amplificació de 4q12(Yang et al. 2000)

-Guany de 8/8q detectada per CGH en el 20% dels casos (Reutzel et al. 2001)

-Amplificació de 8q23q24 (Yang et al. 2000)

-Guany de 10 detectada per CGH en el 9% dels casos correlaciona amb alt grau (Reutzel et al. 2001)

-Pèrdues de 7q, 10, 16, 18 detectada per CGH en el 7% dels casos cada una d'elles (Reutzel et al. 2001)

La inactivació del gen supressor PTEN/NMAC1 localitzat a 10q23 es detecta en un 37,5% dels tumors i es relaciona amb progressió (Velickovic et al. 2002)

- Pèrdua de heterocigotitat del gen PTEN/NMAC1 s'associa a mal pronòstic (Velickovic et al. 2002)

La pèrdua dels cromosomes 10, 18 es mes freqüent en tumors metastàsics (Junker et al. 2000)

Amplificació de 12 p i 12q13q22 (Yang et al. 2000)

-Guany de 12, 20 detectada per CGH en el 20% dels casos (Reutzel et al. 2001)

-Guany de 17q detectada per CGH en el 11% dels casos correlaciona amb alt grau (Reutzel et al. 2001)

-Pèrdua de 22 detectada per CGH en el 11% dels casos (Reutzel et al. 2001)

CARCINOMA RENAL PAPIL·LAR

Subtipus 1. Adenoma: +7, +17, -Y

Carcinoma: +7, +17, -Y, +12, +16, +20

-Proto-oncogen **MET** localitzat a 7q31.2q-31.3. Estudis de lligament realitzats a famílies afectades de carcinomes renals papil·lars hereditaris ha permès identificar les alteracions del gen **MET** com a responsable d'aquests tipus de tumors (Schmidt et al. 1997)

-S'observa guany del cromosoma 7 portador de la copia mutada del **MET** en els tumors (Zhuang et al. 1998)

-La sobreexpressió del **MET** es relaciona amb comportament agressiu del tumor (Sweney et al. 2002)

-Guany de 7 i 17 detectada per CGH en el 50% dels casos (Reutzel et al. 2001)

-Guany de 16 i 20 detectada per CGH en el 15% dels casos (Reutzel et al. 2001)

-Estudis moleculars de desequilibris al·lèlics indiquen que la LOH a 17q i 9p es mes freqüent en el subtipus 1 que en el 2 (Sanders et al. 2002)

-Amplificació a 2q22q33, 16q, 17q i X detectada per CGH en un tumor (Reutzel et al. 2001)

-Pèrdues de 2, 4, 6 i 13 detectada per CGH en el (2/15% dels casos cada una d'elles (Reutzel et al. 2001)

-La inactivació del gen supressor **PTEN/NMAC1** es detecta en un 29,6% dels tumors (Velickovic et al. 2002)

-Pèrdues de 1, 14, 15 i Y detectada per CGH en el (3-15% dels casos cada una d'elles (Reutzel et al. 2001)

Subtipus 2.

Translocacions del cromosoma Xp11.2

-S'ha detectat la translocació en diversos tumors: $t(X;1)(p11.2;q21.2)$ (Yoshida et al. 1985; DeJong et al. 1986; Tomlinson et al. 1991; Meloni et al. 1992, i 1993; Dijkhuizen et al. 1995)

- es van identificar gens localitzats al punt de trencament de la $t(X;1)(p11.2;q21.2)$ present en 3 carcinomes papil·lars (Sidhar et al. 1996). Aquesta translocació dona lloc a un gen nou que resulta de la fusió de dos gens (Weterman et al. 1996): **PRCC** (papil·lar renal cell carcinoma) ubicat a 1q21.2 i **TFE3** localitzat a Xp11.2 (la proteïna codificada per aquest gen es un factor de transcripció). El gen quimèric resultant té absència dels transcrits normals de **TFE3** i per tant té molta importància en el control transcripcional del desenvolupament de carcinomes renals. El gen de fusió **PRCC-FE3** actua de forma negativa sobre la formació del fus mitòtic (Bodmer et al. 2002).

-S'ha detectat la del (X)(p11) en una metàstasi (Ohimi 1993).

CARCINOMA DE CÈL·LULES CROMOFÒBES

Pèrdues dels cromosomes 1, 2, 6, 10, 13, 17 i 21

S'han trobat múltiples pèrdues en més de 90% dels tumors (Kovacs A, et al. 1992) Es caracteritzen per presentar una població cèl·lula principal que mostra una pèrdua important de cromosomes sencers portant a les cèl·lules a una situació d'hiperhaploïdia (Kovacs et al. 1988, 1992, Van der Berg et al 1993, Shuin et al. 1995; Iqbal et al.1996).

-Descobriments d'un nou gen (BHD) relacionat amb el síndrome de Birt-Hogg-Dube, el oncocitoma i RCC de cèl·lules cromòfobes (Nickerson et al. 2002)

-La inactivació del gen supressor PTEN/NMAC1 es detecta en un 87,5% dels tumors (Velickovic et al. 2002)

Tendència a formar associacions telomèriques (TAS). S'observen associacions telomèriques, que afecten a diferents cromosomes a les metafases d'un mateix tumor. Aquest fet reflecteix que es tracta d'un tipus específic d'inestabilitat cromosòmica i no una alteració clonal. Això significa que les associacions telomèriques són esdeveniments secundaris durant el procés de la tumorigènesi i no primaris. (Kovacs et al.1992, Van den Berg et al.1993)

ONCOCITOMA

Amb més freqüència són benignes però també existeix algun maligne (Psihramis et al.1986; 1988)

Subtipus 1: Caracteritzat per: -1 -Y en homes i -1 -X en dones (Psihramis et al.1988; Miles et al. 1988; Crotty et al. 1992, Dobin et al. 1992, Meloni et al. 1992, Van den Berg et al. 1995; Dal Cin et al .1996; Brown et al. 1996)

Subtipus 2: Caracteritzat per la translocació del cromosoma 11, t(11;11)(q12q13) (Walter et al. 1989; Presti 1991, Van der berg et al. 1995; Dukhuizen et al. 1997)

Altres alteracions

-Pèrdues de:1p, 3p, 14q

-S'ha detectat MONOSOMIA DEL CROMOSOMA 14

- CGH d'aquests tumors corrobora les alteracions detectades amb citogenètica convencional

-Descobriments d'un nou gen (BHD) relacionat amb el síndrome de Birt-Hogg-Dube, el oncocitoma i RCC de cèl·lules cromòfobes (Nickerson et al. 2002)

Tendència a formar TAS(Associacions telomèriques).

CARCINOMES DEL DUCTE DE BELLINI

- *Són tumors rars. Hi ha 7 casos analitzats (Davis et al. 1995, Rumpelt HJ 1991, Fleming et al 1986, Fuzesi l 1992)-Les alteracions citogenètiques no estan del tot clares. S'han observat pèrdues a 1, 6, 8p, 14, 15, 22 i guanys a 7, 12, 16, 17, 20.*

3.3 TUMORS DE LES VIES URINÀRIES

Tota la via urinària (calces, pelvis, urèters, bufeta i uretra) constitueix una unitat morfofuncional, amb un comportament oncològic similar, pel que de forma conceptual pot considerar-se com a únic òrgan. Les neoplàsies de les diferents zones difereixen en la seva incidència (90% bufeta, 5.7% uretra, 2.4% a pelvis renal, 2.1% urèter) i per tant a la repercussió clínica. Tot i que en la major part d'aquest apartat ens referirem al tumor de bufeta, les dades poden extrapolar-se als altres tipus de tumors urotelials.

CÀNCER DE BUFETA

La majoria (90-95%) s'originen en l'epiteli transicional. Es tracta d'una malaltia crònica amb un curs clínic variable, la seva tendència a la recidiva i progressió obliguen a un seguiment diagnòstic i terapèutic permanent.

EPIDEMIOLOGIA

El càncer de bufeta representa el 8,8% de tots els tumors malignes, essent el cinquè tumor maligne més comú en barons i el segon tumor en freqüència dins del sistema urinari després del càncer de pròstata. A Espanya es diagnostiquen prop de 8.000 nous casos de càncer de bufeta a l'any i 3000 pacients moren d'aquesta malaltia.

La incidència màxima es troba al final de la sexta dècada (67-70 anys.), essent més freqüent en barons que en dones (2.7/1). Encara que s'està constatant un augment gradual de la incidència en països industrialitzats, la mortalitat es manté estable degut a que el augment es fa a expenses de les formes superficials del tumor (amb millor pronòstic), diagnòstic precoç i optimització dels tractaments.

Distribució geogràfica

Incidència alta: Dinamarca, Israel

Incidència intermitja : Escòcia, Noruega, Suècia, Nova Zelanda, Espanya

Incidència baixa: Finlàndia i Singapur

Factors etiològics

El càncer de bufeta representa un dels primers tumors que es va relacionar amb el món laboral, l'any 1895, Rehn va publicar casos de treballadors amb contacte amb tints d'anilina. S'estima que a les poblacions occidentals, el consum de tabac causa almenys el 50% dels tumors de bufeta i les exposicions ocupacionals entre el 10 i el 20% (Silverman 1996, Kogevinas 1998, Mannetje 1999, Serra 2000).

Els únics agents específics que, de forma inequívoca, han estat associats amb un excés de risc de càncer de bufeta són les amines aromàtiques (bencidines, 4-aminobifenil, b-naftilamina) i els hidrocarburs poliaromàtics. Les dues principals fonts d'exposició a amines aromàtiques són les laborals (indústria de la surera, producció de colorants, indústria tèxtil, tints i d'altres) i el consum de tabac, trobant-se els nivells més alts en el tabac negre.

Altres factors de risc potencials (revisat per Silverman 1996) són:

- l'exposició a determinants contaminants de l'aigua potable (incloent principalment el conjunt de compostos organo-clorats que es formen durant la cloració de l'aigua com els trihalometans i l'arsènic), la dieta, el consum total de líquids, el fum ambiental del tabac i la contaminació atmosfèrica.

*-Les infeccions, especialment l'infecció crònica per *Schistosoma Haematobium*, (esquistosomiasi) en relació a carcinomes escamosos; el virus del papiloma humà com a factor predisposant esta en fase d'estudi.*

-Alguns medicaments com la ciclofosfamida (el seu metabolit anomenat acroleina produeix ulceració, hemorràgia i neovascularització de l'uroteli, que augmenta nou vegades el risc de desenvolupar un càncer vesical quasi sempre infiltrant). El consum elevat de fenacetina o d'altres com l'acetaminofen.

-La irradiació pèlvica, sobretot en dones tractades amb radioteràpia per carcinoma de cèrvix.

-Altres patologies mèdiques associades així com els antecedents familiars de càncer (Silverman 1996).

Com a factors de predisposició endògena s'ha observat una certa associació amb la capacitat d'acetilació.

TIPUS CEL·LULARS i CLASSIFICACIÓ

D'acord amb el tipus cel·lular, els carcinomes de bufeta es classifiquen en:

Carcinoma d'uroteli de cèl·lules transicionals (TCC)

Es el tipus mes freqüent (90-95%). La majoria son intraepitelials (superficials), papil·lars o mixtes, encara que poden infiltrar la capa muscular de la bufeta en el 30% dels casos. Existeixen variants del carcinoma urotelial pur, amb focus d'elements escamosos (epidermoides) o glandulars o d'ambdós.

Carcinoma de cèl·lules escamoses:

Representa el 3-4%. Ha de presentar un aspecte uniforme en tota la seva extensió, amb illots irregulars de cèl·lules escamoses amb diferents graus de queratinització i ponts intercel·lulars en un estroma amb força teixit fibrós.

Carcinoma de cèl·lules glandulars o adenocarcinoma:

El patró mixta es el més freqüent, així com el glandular. Tots ells s'agrupen dins del terme d'adenocarcinoma urotelial primari. S'acostuma a localitzar en el trígon i representa el 0,5-2% dels tumors vesicals. Una varietat és l'adenocarcinoma d'origen uracal.

Carcinoma indiferenciat:

Les cèl·lules són tan indiferenciades que no pot dir-se que siguin transicionals, escamoses o glandulars. Les cèl·lules poden ser fusiformes o gegants rebent la denominació de carcinoma fus cel·lular o sarcomatoide i de cèl·lules gegants.

PATRO DE CREIXEMENT

- **Papil·lar:** És la forma mes freqüent de presentació (70%) i te bon pronòstic. Les cèl·lules epitelials es disposen al voltant d'un eix fibroconnectiu (papil·les).
- **Sèssil, sòlid o nodular infiltrant:** Mal pronòstic (10%).
- **Mixte (carcinoma infiltrant):** Amb característiques papil·lars i sòlides (20%).
- **Intraepitelial (Pla):** No es papil·lar ni infiltrant i és pla, està limitat a la mucosa. Se'l denomina carcinoma intraepitelial o carcinoma in situ (CIS).

GRAU i ESTADI

Els principals factors pronòstics del carcinoma de bufeta, són la profunditat de l'invasió a la paret de la bufeta i el grau de diferenciació tumoral

Respecte al grau, La OMS y la UICC prefereixen una classificació basada en l'anaplasia segons la qual es distingeixen tres graus:

Grau I (baix o diferenciat), amb cèl·lules de lleugera anaplàsia, el 4,4% progressaran en grau o estadi en posteriors recidives.

Grau II (mitjà o moderadament diferenciat), cèl·lules amb moderada anaplàsia, progressen el 12%.

Grau III (alt o pobrament diferenciat), amb marcada anaplàsia (atípic cel·lular), progressen el 62%.

L'Estadi T, indica la profunditat d'invasió del tumor a la paret vesical. La descripció del diferents estadis i de la classificació TNM dels tumors de bufeta s'indica a la taula 6 i figura 8 i 9.

Taula 6. Classificació TNM de càncer de bufeta	
T Tumor primari	<p>Tx No es pot avaluar el tumor primari</p> <p>T0 No existeixen signes de tumor primari</p> <p>Ta Carcinoma papil·lar no invasiu</p> <p>Tis Carcinoma in situ : tumor pla</p> <p>T1 Tumor que envaeix teixit connectiu subepitelial</p> <p>T2 Tumor que envaeix el múscul:</p> <p>T2a Tumor que envaeix el múscul superficial (meitat interior)</p> <p>T2b Tumor que envaeix el múscul profund (meitat exterior)</p> <p>T3 Tumor que envaeix el teixit perivèsical</p> <p>T3a Microscòpicament</p> <p>T3b Microscòpicament (massa extravèsical)</p> <p>T4 Tumor que envaeix qualsevol dels òrgans adjacents : pròstata, úter, vagina, paret pelviana o paret abdominal</p> <p>T4a Tumor que envaeix la pròstata, úter, vagina</p> <p>T4b Tumor que envaeix la pared pelviana o pared abdominal.</p>
N Ganglis Limfàtics Regionals	<p>Nx Els ganglis limfàtics regionals no poden ésser avaluats</p> <p>N0 No hi ha signes de metàstasi a gangli limfàtic regional</p> <p>N1 Metàstasi a un únic gangli limfàtic ≤ 2cm</p> <p>N2 Metàstasi a un únic gangli limfàtic $\geq 2 \leq 5$</p> <p>N3 Metàstasi a un gangli limfàtic ≥ 5cm</p>
M Metàstasi	<p>Mx La presència de metàstasi distant no pot ésser avaluada</p> <p>M0 No hi ha metàstasi distant</p> <p>M1 Metàstasi distant</p>

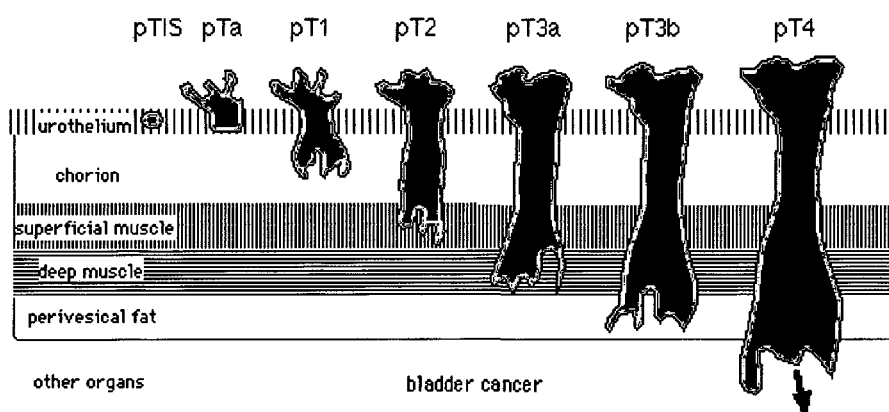


Figura 8. Estadis d'invasió dels tumors de cèl·lules transicionals de bufeta

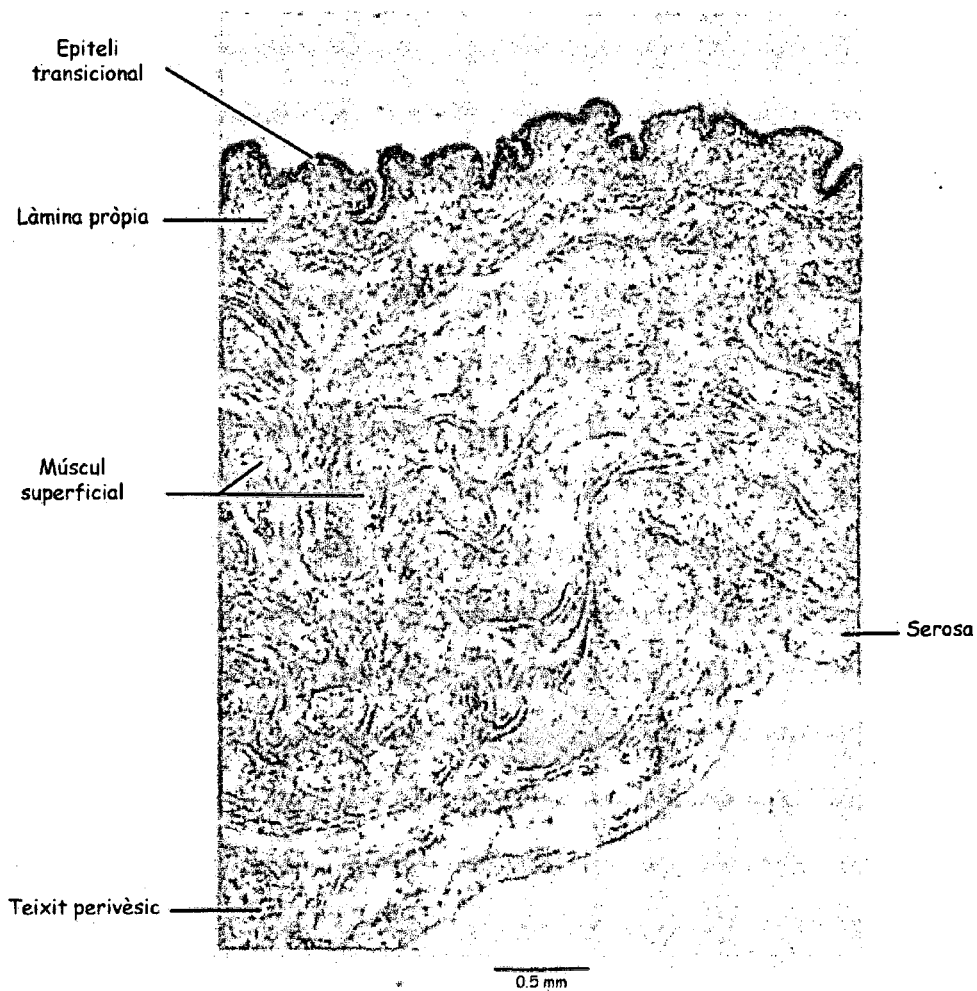


Figura 9. Secció transversal. Morfologia bufeta (Adap. Junfís 1999)

HISTORIA NATURAL

Tumor Vesical Superficial.

El 75-80% dels tumors de bufeta es presenten inicialment com un tumor superficial. La seva evolució es difícil de predir i amb el temps, entre el 50-88% presenten recidives. Encara que la gran majoria mantenen el mateix grau i el mateix estadi que el tumor inicial, al voltant del 10-30% dels pacients amb recidiva presenten infiltració muscular.

La probabilitat de progressió (invasió muscular) d'un tumor superficial papil·lar es per terme mig d' un 12% als 5 anys, oscil·lant entre un 4-6% per els tumors d'estadi Ta, del 29% per els T1, un 40% per els T1 G3 i un 60-80% per aquells que tenen associat un CIS multifocal.

Tumor vesical infiltrant

Podem trobar dos tipus:

- 1) Els que són infiltrants des de l'inici . Solen ser d'alt grau, patró de creixement sòlid i presenten un comportament agressiu. Tot i que s'utilitzi el tractament radical, la supervivència als dos anys es troba al voltant del 50%.*
- 2) Els que tenen una historia prèvia de tumor superficial (15-20%) que a partir de successives recidives ha evolucionat en grau i estadi. La impossibilitat de preveure l'evolució d'aquests tumors en pacients concrets obliga a la cerca de marcadors de pronòstic fins ara poc definits.*

Multifocalitat

Una de les característiques dels tumors urotelials es la multifocalitat o multiplicitat de lesions sincròniques o metacròniques, que pot aparèixer en totes les variants cel·lulars però amb molta més freqüència en els carcinomes de cèl·lules transicionals. La multifocalitat sincrònica es dona en el 34,7% dels casos i la metacrònica en un 61%.

La causa d'aquesta multifocalitat no està clara. Alguns investigadors es decanten per una implantació cel·lular mentre que altres consideren que és el resultat d'una inestabilitat genòmica present a l'uroteli.

CÀNCER D'URÈTER I DE PELVIS RENAL

Els carcinomes de pelvis renal són relativament rars, constituint un 5% de tots els tumors renals.

El 90% dels tumors de pelvis renal són de cèl·lules transicionals i poden ésser papil·lars, sòlids o CIS (carcinomes in situ d' alt grau).

Els carcinomes de pelvis de cèl·lules escamoses representen un 7% de la totalitat dels tumors de pelvis renal i són freqüentment molt invasius . Els adenocarcinomes de pelvis són poc freqüents i van associats a infeccions, inflamacions o càlculs renals.

Les escasses dades de tumors o carcinomes de cèl·lules transicionals (CCT) que afecten a pelvis renal i urèter indiquen que aquests tumors presenten les mateixes característiques citogenètiques i moleculars que els que afecten a la bufeta. El sistema de classificació TNM per aquests tumors es similar al de tumors de bufeta amb certs canvis tenint en compte aspectes estructurals de la pelvis renal i l'urèter (taula .7).

Taula 7. Classificació TNM de cèl·lules de transició de la pelvis renal i urèter

T	Tx No es pot avaluar el tumor primari
Tumor primari	T0 No existeixen signes de tumor primari
	Ta Carcinoma papil·lar no invasor
	Tis Carcinoma in situ
	T1 Tumor que envaeix teixit connectiu subepitelial
	T2 Tumor que envaeix túnica muscular
	T3 (Per pelvis renal) Tumor que envaeix més enllà de la túnica muscular en el teixit adipós peripèlvic o parènquima renal
	T3 (Per urèter) Tumor que envaeix més enllà de la túnica muscular en el teixit adipós periutèric
	T4 Tumor que envaeix òrgans adjacents o a través del ronyó al teixit adipós perinèfric.

N	Nx Els ganglis limfàtics regionals no poden ésser avaluats
Ganglis	N0 No hi ha signes de metàstasi a gangli limfàtic regional
Limfàtics	N1 Metàstasi a un únic gangli limfàtic 2cm
Regionals	N2 Metàstasi a un únic gangli limfàtic 2-5
	N3 Metàstasi a un gangli limfàtic 5cm
M	Mx La presència de metàstasi distant no pot ésser avaluada
Metàstasi	M0 No hi ha metàstasi distant
	M1 Metàstasi distant

CITOGENÈTICA

La citogenètica del tumors urotelials és molt complexa. Els cariotips diploides amb una o varies anomalies pertanyen a estadis inicials , i poden evolucionar cap a cariotips complexes pseudo-tetraploids amb força n ° de marcadors en estadis avançats.



Les anomalies més freqüents són +7,-9,-11 o del(11p), del(13q), del(17p) i reorganitzacions dels cromosomes 1,5, i 10. Revisions de Sandberg and Berger 1994) Gibas and Gibas 1997,Fadl-Elmula et al. 2000.

Una revisió recent de les dades citogenètiques de més de 200 tumors de bufeta (Hoglund et al. 2001) indica la presència d'almenys dues vies de progressió diferents que convergeixen en etapes més avançades Una via es caracteritzaria per la pèrdua del cromosoma 9 seguida de -11 i +1q. L'altre, amb pitjor pronòstic s'iniciaria amb el guany del cromosoma 7 seguida de 8p- i 8q+.

La tècnica d'hibridació genòmica comparada ha incrementat de forma considerable la informació sobre alteracions genòmiques desequilibrades en els carcinomes de bufeta. Les alteracions més freqüents corresponen a guanys a 1q, 8q, 20q i 11q així com pèrdues a 9q, 9p, 8p i 11p (Kallioniemi et al. 1995, Voorter et al. 1995, Richter et al. 1998, Koo et al. 1999, Richter et al. 1999, Zhao et al. 1999, Simon et al. 2000)

Hi ha per tant, nombrosos estudis citogenètic i moleculars que han aportat dades interessants sobre les alteracions genètiques que contribueixen al desenvolupament dels carcinomes d'uroteli (veure Taula 8). Es coneix que alguns oncogens i gens supressors estan alterats (HRAS, FGFR3, ERBB2, CCND1, MDM2, INK4A-ARF, RB1, TP53, PTEN, PTC entre altres). Les pèrdues repetides d'heterocigositat indica la possible presència de gens candidats a supressors tumorals en: 3p, 4p, 4q, 8p, 9q, 11p, 11q i 14q (revisat per Knowles 2001). El gen DBCCR1 (deleted in bladder cancer chromosome region candidate 1) localitzat a 9q32-33 ha estat proposat com a possible gen supressor relacionat amb els tumors de cèl·lules transicionals d'uroteli (Nishiyama et al. 1999).

A la taula 8. s'indiquen, per cromosomes, les dades mes rellevants sobre l'estudi citogenètic i molecular d'aquests tumors.

Cromosoma	Alteracions-Bibliografia
<p>CROMOSOMA</p> <p>1</p> 	<p><i>Aquest cromosoma es troba implicat en 35% de casos de bufeta</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <i>En major part pèrdua 1p (1p22, 1p32)</i> <i>Guany 1q31,1p22,1p32 per CGH (Kallioniemi et al.1995),Guany 1q22-24 en el 33% dels tumors (Koo et al 1999, Richter et al. 1998, 1999)</i> <i>Sobrexpressió del gen p73(1p36.3) en càncer de bufeta (Chi et al. 1999, Yokomizo et al. 1999)</i> <i>Possible gen supressor TERE1 (transitional epithelia response protein) localitzat a 1p36 (McGarvey et al.2001, Baithun et al. 2001)</i>
<p>CROMOSOMA</p> <p>2</p> 	<ol style="list-style-type: none"> <i>Pèrdues 2q21qter (Koo et al. 1999) Pèrdues de2q22q-33, 2q35q-ter (Richter et al. 1998, 1999)</i> <i>La pèrdua de 2q és més freqüent en tumors ptaG3 que en ptaG2 (Zhao et al. 1999)</i>

CROMOSOMA

3





1. La pèrdua del 3p es troba implicada en el 30% dels casos, majoritàriament amb cariotip complex; la regió 3p21- p23 correspon a la més freqüent (Kallioniemi et al. 1995)
2. La del (3p) està associat amb alt grau i estadi (Presti et al. 1991, Dalbagni et al. 1993)
3. S'observa una elevada freqüència de LOH en el locus FHIT (3p14.2) en tots els estadis. A 3p11p-12 es pot localitzar un possible supressor que podria estar relacionat amb la capacitat invasiva (Wada et al. 2001)
4. Duplicació de 3p14pter (Babu et al.1987)
5. Amplificació de 3p24 (Richter et al. 1998)
6. Guany de 3p22p-24 relacionada amb progressió (Richter et al.1999)
7. Guany i Amplificació de les regions 3q24-q26 (Kallioniemi et al. 1995), 3p22p-24 (Voorter et al.1995)3p21, 3q24(Koo et al. 1999)
8. Guany de 3q és més freqüent en tumors pT2-T4 que en pT1 (Simon et al. 2000)

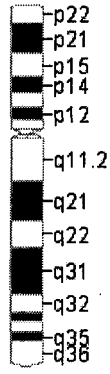
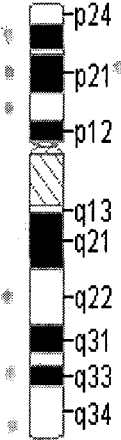
CROMOSOMA


4

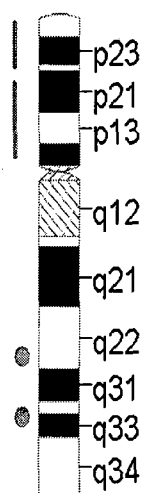


1. Delecions en un 20% dels casos, afectant en particular a 4p16 i 4q13q-23.(Elder et al. 1994, Koo et al. 1999)
2. Pèrdua de 4q25q-31 (Richter et al. 1998)
3. Pèrdua de 4p11q-15 relacionada amb pronòstic (Richter et al. 1999)
4. La regió crítica de LOH es redefineix a 4p16.3 (Sibley et al. 2000)
5. Amplificació a 4q26(Koo et al. 1999)

<p>CROMOSOMA</p> <p>5</p> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>i(5p)</i> es troba en 35% en casos (Gibas et al. 1984) 2. Guany de 5p per translocació (Babu et al. 1987) 3. Guany de 5p com un dels guanys més freqüents (Koo et al. 1999) 4. Guany de 5p relacionat amb pronòstic (Richter et al. 1999) 5. Amplificació a 5p11p13 (Simon et al. 2000) 6. Deleció de 5q relacionada amb estadis invasius (Dalbagni et al 1993, Koo et al. 1999, Richter et al. 1999) 7. Guany de 5p i pèrdua de 5q més freqüent en ptaG3 que en ptaG2 (Zhao et al. 1999) 8. Pèrdua de 5q12q-13 i 5q22q-23 com a regions consensus de pèrdua (Richter et al. 1998) 9. LOH en dues regions crítiques de 5q (q22q23 i q33q-34) relacionades amb el grau (Von Knobloch et al. 2000) 10. Defineixen una regió crítica de pèrdua a 5p12p13 (Bohm et al. 2001)
<p>CROMOSOMA</p> <p>6</p> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. del (6q) en 25% dels casos i es pot correlacionar amb invasió tumoral (Babu et al. 1987) 2. LOH a 6q21 relacionada amb patró de creixement sòlid (Bernués et al. 1999) 3. Guany de 6p/q (Koo et al. 1999) 4. Guany i amplificació de 6p22 (Richter et al. 1998, 1999) 5. Pèrdua de 6q21q-24 (Richter et al. 1998) 6. Pèrdua de 6q22q-23 relacionada amb pronòstic (Richter et al 1999) 7. Pèrdua de 6q més freqüent en ptaG3 que en ptaG2 (Zhao et al 1999)



<p>CROMOSOMA</p> <p>7</p> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. La trisomia 7 és molt freqüent. Podria estar relacionada amb mal pronòstic. S'ha trobat com a única anomalia (Babu et al 1987, Berrozpe et al. 1990) 2. Tetrasomia 7 relacionada amb graus i estadis avançats (Waldman et al. 1991, Nemoto et al. 1995) 3. Guany de 7p detectat per CGH (Koo et al. 1999) 4. Guany de 7p és més freqüent en tumors pT2-T4 que en pT1 (Simon et al. 2000) 5. Amplificació a 7q21q-31 (Simon et al. 2000)
<p>CROMOSOMA</p> <p>8</p> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. La del(8p) s'ha trobat en el 25% dels casos i sol estar associada a tumors d'alt grau i estadi. Les delecions més freqüents impliquen les regions: 8p12-pter, 8p21.3 i 8p22, (Knowles et al 1993, Kallioniemi et al 1995, Koo et al. 1999). 2. Estudis de LOH indiquen que la diana podria estar a 8p11.2p-12 (Tackle and Knowles 1996) 3. Pèrdua 8p relacionat amb tumors invasius (Wagner et al. 1997) 4. Pèrdues de 8p en un 24% dels tumors pT1 (Richter et al. 1998, 1999) 5. Pèrdua de 8p més freqüent en pTaG3 que en pTaG2 (Zhao et al 1999) 6. Possible gen supressor a 8p23.3 (Muscheck et al. 2000) 7. Pèrdues de 8p22 relacionades amb els loci NAT1, NAT2(Arilamina N-acetiltransferas) (Stacey et al.1999, Thygesen et al. 1999) 8. LOH a 8p22 i 8p11.2p-21 (Choi et al. 2000) 9. El possible gen supressor FEZ1/LZTS1, localitzat a 8p22, pot jugar un paper important en el desenvolupament del càncer de bufeta (Vecchione et al. 2002) 10. Amplificació de 8q21q-22(Richter et al. 1998)

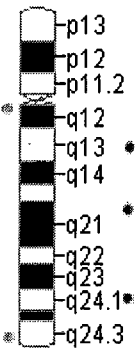

	<p>11. Guanys de 8q en un 28% de tumors pT1 (Richter et al. 1999)</p> <p>12. Guanys de 8q concretament 8q23-qter poden estar associats amb la progressió tumoral (Sauter et al. 1995), el c-myc (8q24) rarament es troba amplificat (Kallioniemi et al. 1995). Guanys de 8q21qter (Koo et al. 1999)</p> <p>13. amplificació del c-MYC pot estar lligada a progressió (Mahdy et al.2001)</p>
<p>CROMOSOMA</p> <p>9</p> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Monosomia 9 o delecions del cromosoma 9 es troben en un 50% dels casos, a vegades s'ha trobat com a única anomalia. Present en estadis primerencs, pTa (Gibas et al.1984, Hopman et al.1991,Waldman et al. 1991, Dalbagni et al. 1993, Kallioniemi et al. 1995, Baud et al. 1998) i estadis molt tardans però no correlacionat amb l'expressió de la p53 (Spruck et al. 1994). S'ha hipotetitzat que la monosomia 9 pot indicar risc de recurrència (Bartlett et al. 1998). 2. la monosomia 9 s'ha detectat també per FISH (Hopman et al. 1991, Sauter et al. 1995, i per CGH (Koo et al. 1999, Richter et al. 1999) 3. Pèrdua de 9p present a tots els estadis (Erbersdobler et al. 1998) 4. S'ha trobat LOH a 9p21, 9q22, 9q31q-32, 9q33, 9q34 i delecions en homozigosi a CDKN2B/INK4B/P16 (9p21). (Olumi et al. 1990,Orlow et al. 1995, Stadler et al. 1996, Baud et al.1999, Czerniak et al. 1999) 5. Les delecions a CDKN2B/INK4B/P16 (9p21) s'han correlacionat amb inactivació de Rb (Benedict et al.1999) 6. La pèrdua d'expressió de p16 és inversament proporcional a la sobreexpressió de ciclina D1 (localitzada a 11q13) (Yang et al. 2002) 7. LOH + mutació del segon al·lel de CDKN2A és rar però significatiu. CDKN2A esta implicat en estadis pTa 8. Amplificació a 9p24 (Simon et al. 2000) 9. PAX5 (9p13) pot estar sobreexpressat en tumors urotelials

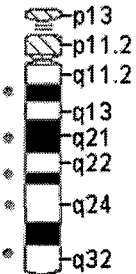





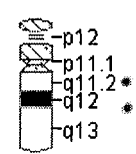
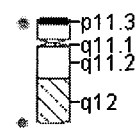
(Adshead et al.1999)

10. *CDKN2B/INK4B/P15 (9p21) està implicat en pocs casos.*
11. *Pèrdues a 9p i 9q22q-33 detectades per CGH (Richter et al. 1998, Richter et al. 1999)*
12. *LOH a 9p21p-22, 9q21q.31, 9q32q34 en tots els estadis (Louhelainen et al. 2000)*
13. *Segons Cairns et al. (1993), un possible locus supressor estaria a 9q22 i l'altre entre 9p12-p13*
14. *GSN (9q34) està molt poc expressat en tumors en comparació amb la seva expressió en bufeta normal.*
15. *LOH+mutació en el segon al·lel de TSC1 (9q33q-34). També s'ha descrit LOH d'un possible supressor a 9q32q-33(Habuchi et al. 1997, Hornigold et al. 1999)*
16. *Pèrdua al·lèlica en homocigosi a 9q32q-33. El gen DBCCR1(deleted in bladder cancer chromosome region candidate 1) localitzat a 9q32q-33 com a possible supressor (Nishiyama et al. 1999)*
17. *Hipermetilació de la regió DBCCR1 com un dels pasos inicials en el desenvolupament dels TCC de bufeta (Habuchi et al. 2001)*
18. *S'observa la pèrdua de heterocigositat de tres loci (INK4A, TSC1 i DBC1) en un 25% dels tumors amb recurrència i en un 0% dels que no en presentaven (Edwards et al. 2002)*
19. *Identifiquen 4 dianes per gens supressors: 9q22.3 (gen Patched) 9q31q-32 (gens disautonia i distròfia muscular tipus Fukuyama), 9q33 (locus GSN), 9q34(gen telangiectasia hemorràgica)(Simoneau et al. 1999)*
20. *S'han detectat LOH a 9q en lesions hiperplàstiques de bufeta confirmant que la pèrdua de 9q és una de les alteracions primerenques en aquests tumors (Chow et al.2000)*

<p>CROMOSOMA</p> <p>10</p> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pèrdua de 10q24q 2. Pèrdua de 10q24q-26 relacionada amb pronòstic(Richter et al 1999) 3. Gen <i>PTEN/NMAC1</i> (10q23) regió implicada(LOH) en alguns casos (Cairns et al 1998, Aveyard et al.1999) S´han detectat mutacions i pèrdues en homocigosi. 4. Pèrdua de 10q més freqüent en ptaG3 que en ptaG2(Zhao et al 1999) 5. Gen <i>Fas/APOI/CD95</i>(10q24) s´ha trobat pèrdua d'un al·lel i mutació de l'altre (Hot-Spot) 6. S'ha trobat l'amplificació 10p13p-14 (Voorter et al 1995, Richter et al. 1998)
<p>CROMOSOMA</p> <p>11</p> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. La monosomia 11 o del (11p) es troba en 20-50% dels casos, sovint en els d'alt grau i en tumors invasius; associat a la progressió de tumors, sovint trobat en el moment de la tetraploidització (Babu et al. 1987, Voorter et al. 1996) 2. LOH a 11p15.1-p15.5 (Olumi et al. 1990, Presti et al. 1991) 3. <i>HRAS 1</i>(11p15.5) esta mutat en el 15% dels casos 4. Pèrdues a 11p i 11q (Kallioniemi et al. 1995, Voorter et al. 1996, Richter et al. 1999) 5. Pèrdues de 11p13p15 (Koo et al. 1999) Tetrasomia 11(Waldman et al. 1991, Nemoto et al. 1995) 6. Amplificacions de 11q13q-22 s'han trobat en alguns casos,(Richter et al. 1998, Koo et al. 1999, Proctor et al. 1991) però no es pot tenir en compte com a factor pronòstic (Proctor et al 1991). 7. La ciclina D. L´amplificació a 11q13 correlaciona amb l´amplificació del gen ciclina D1 (locus a 11q13)

<p>CROMOSOMA</p> <p>12</p> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. S'ha detectat delecions a 12q en un 20% dels tumors (Gibas et al. 1984) 2. S'han detectat amplificacions a les bandes 12q13q-15 i/o 12q15q-24 (Voorter et al. 1995, Richter et al. 1998, Koo et al. 1999)
<p>CROMOSOMA</p> <p>13</p> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. La del(13q) s'ha trobat en un 25% dels casos i s'ha relacionat amb alt grau i estadi (Kallioniemi et al. 1995, Erbersdobler et al. 1998) 2. Alteracions del gen <u>Rb</u> (13q14) s'han trobat en un 30-40% dels tumors invasius poden ser indicatiu de curta supervivència. El 90% dels tumors que no expressen el Rb són invasius (Cairns 1991, Presti et al. 1991, Cordon-Cardo et al. 1992, Xu et al. 1993). 3. Hi ha una desregulació entre la interacció normal de p16-Rb. 4. Pèrdues 13q31 detectades per CGH (Richter et al. 1999) 5. Amplificació a 13q21q-31(Koo et al. 1999)

<p>CROMOSOMA</p> <p>14</p> 	<p>1. La del(14q) detectada en el 25% dels casos i afectant especialment les bandes 14q12 i 14q32, pot estar associada a la progressió dels tumors(Chang et al. 1995)</p>
<p>CROMOSOMA</p> <p>17</p> 	<p>1. La del(17p) s'ha detectat en un 40% dels casos; es troba principalment en tumors pT2 i-pT4. La seva detecció en casos de pTIS, pot ser un indicador de mal pronòstic en aquests tumors.(Dalbagni et al. 1993, Kallioniemi et al. 1995, Erbersdobler et al. 1998)</p> <p>2. La LOH afecta majoritàriament a 17p12p-13, 17q11q-22, i 17q24q-25(Olumi et al. 1990, Presti et al. 1991)</p> <p>3. La inactivació del gen <u>P53</u> (17p13) es correlaciona amb grau, estadi i progressió del tumor essent freqüent en tumors pT3 (Sarkis et al.1995, Chaturvedi et al. 1997)</p> <p>4. tetrasomia 17 per FISH (Nemoto et al. 1995)</p> <p>5. Guany de 17q21 en un 28% dels tumors per CGH (Richter et al. 1998, 1999)</p> <p>6. Amplificacions a 17q22q-23 (Voorter et al. 1995, Koo et al. 1999)</p> <p>7. Amplificació a 17q24q-25 (Simon et al. 2000)</p> <p>8. ERBB2/P185 (17q21) s'expressa en tumors d'alt grau i estadi (Coombs et al. 1991, Moriyama et al. 1991)</p> <p>9. <u>NF1</u> (17q11) s'expressa poc en tumors (Aaltonen et al.1999)</p>

<p>CROMOSOMA</p> <p>18</p> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. del(18q) en el 25% dels casos i està associat a alt grau i estadi. LOH a 18q21(Presti et al. 1991) 2. Pèrdua de 18q12q-23 relacionada amb pronòstic(Richter et al. 1999) 3. Pèrdua de 18q més freqüent en ptaG3 que en ptaG2 (Zhao et al 1999) 4. Guany de 18p és més freqüent en tumors pT2-T4 que en pT1 (Simon et al. 2000) 5. Amplificacions a 18p11 (Voorter et al. 1995) 18q11 i 18q22(Koo et al. 1999)
<p>CROMOSOMA</p> <p>20</p> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Guany de 20p/q per CGH (Koo et al. 1999) 2. Guany de 20q11.2q-ter en un 33% de tumors pt1(Richter et al. 1999) 3. Amplificació de 20q13 (Richter et al. 1998) 4. Guany de 20q més freqüent en ptaG3 que en ptaG2(Zhao et al. 1999)
<p>CROMOSOMA</p> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Amplificacions a 22q11q-12 (Voorter et al. 1995)
<p>CROMOSOMA</p> <p>Y</p> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pèrdua en el 30% dels casos , probablement no associat ni amb el grau ni l'estadi (Sauter et al. 1995b)

Altres :

1-Diminuts dobles es troben en casos i està relacionat amb estadis i grau elevats (Milasin and Micic 1992).

2. OBJECTIUS

OBJECTIUS

L'objectiu general consisteix en la detecció i identificació d'alteracions cromosòmiques desequilibrades constitucionals i adquirides mitjançant l'aplicació de la tècnica de Hibridació Genòmica Comparada (CGH)

Aquest objectiu general compren els següents Objectius concrets:

- 1. Posta a punt i optimització de la tècnica de CGH a partir de diferents teixits, i determinació dels possibles factors que poden influir en la obtenció de resultats.*
- 2. Caracterització de anomalies cromosòmiques constitucionals prèviament detectades, encara que no identificades, per bandes G en pacients amb malformacions congènites a fi de correlacionar les amb les anomalies fenotípiques.*
 - Caracterització d'anomalies cromosòmiques constitucionals en amniòcits.*
 - Caracterització d'anomalies cromosòmiques constitucionals en limfòcits.*
 - Valoració de l'aplicació de la CGH al diagnòstic pre i postnatal.*
- 3. Caracterització i identificació de desequilibris cromosòmics adquirits en tumors urotelials i renals*
 - Valoració de la tècnica de CGH en la detecció de desequilibris cromosòmics presents en clons minoritaris mitjançant comparació amb citogenètica convencional*
 - Identificació de regions cromosòmiques que la seva pèrdua o guany origina la aparició i/o progressió de tumors urotelials i renals.*

3. MATERIAL I MÈTODES

1. MATERIAL BIOLÒGIC

L'estudi s'ha portat a terme a partir de 60 individus. En aquest treball podem diferenciar dos grups:

- A. Pacients amb anomalies cromosòmiques constitucionals.
- B. Pacients afectats de tumors urotelials o renals.

A. PACIENTS AMB ANOMALIES CROMOSÒMIQUES CONSTITUCIONALS.

El material biològic processat per la caracterització de les anomalies cromosòmiques constitucionals, detectades prèviament per bandes G, es va obtenir a partir de sang perifèrica o de líquid amniòtic. Tots els pacients que es detallen a continuació, procedien del Centre de Patologia Cel·lular i Diagnòstic Prenatal (CPC) exceptuant la família del cas 3 que prové del Servei de Genètica de l' Hospital Materno-Infantil de la Vall d' Hebron (SGVH).

CAS 1

Pacient de 3 anys, sexe masculí, que presentava hipotonia al moment de néixer, observant el pediatre, una fàcies rara i un ronyó en ferradura. L'estudi cromosòmic en sang perifèrica va demostrar la presència d'un cromosoma Y derivatiu: 46,X,der(Y). Per identificar-ho es van aplicar les tècniques de FISH Multipainting (Kit Chromoprobe-M Multiprobe, Cytocell) i CGH.

CAS 2

Pacient de 35 anys, sexe femení, que presentava menopausa precoç. L' estudi cromosòmic en sang perifèrica va demostrar la presència d'un cromosoma X derivatiu: 46,X,der(X). Per identificar-lo, es van aplicar les tècniques de FISH Multipainting (Kit Chromoprobe-M Multiprobe, Cytocell) i CGH.

CAS 3

Dona gestant de 26 anys, amb indicació de diagnòstic prenatal per fill previ afectat de retard mental. El cariotip del fetus realitzat a les 16 setmanes de gestació va mostrar la presència d'un cromosoma X derivatiu der(X), t(X;Y) i d'una deleció en el 18p. Posterior anàlisi citogenètica practicada als pares i germà, evidencia la presència de la mateixa deleció 18p a la mare, essent els cariotips del pare i germà normals. Per identificar aquesta alteració es van aplicar les tècniques de painting del cromosoma 18 i la tècnica CGH.

CAS 4

Baró de 33 anys, sexe masculí que presentava esterilitat primària per azoospermia, valors de la FSH (hormona folicle estimulant) elevats. L'anàlisi citogenètica amb bandes G va mostrar un cariotip 46,XX. Per detectar la presència del material del cromosoma Y, es van aplicar les tècniques de QF-PCR, FISH Multipainting dels cromosomes X, Y i la tècnica de CGH.

CAS 5

Nena de 3 anys amb retard psicomotor de sis mesos; ptosis dreta lleu, mamil·les separades, dits petits, taques hipomelanòtiques, genitals femenins anòmals i C.I.A. tipo ostium secundum. Prenatalment es va observar C.I.R. i un oligoamnios. Va néixer a les 38 setmanes de gestació i el seu pes va ésser de 1.495g. L'estudi citogenètic realitzat a partir de sang perifèrica va mostrar un cariotip 46,XX,15p+. El posterior estudi cromosòmic en els pares va resultar normal. Per identificar el fragment cromosòmic addicionat al cromosoma 15 es varen aplicar les tècniques de FISH multipainting (Kit Chromoprobe-M Multiprobe, Cytocell) i CGH.

B. TUMORS UROTELIALS I RENALS

Les mostres de tumors urotelials (bufeta, pelvis renal) i tumors renals, procedien de pacients del Servei d'Urologia de l'Hospital del Mar (SUHM) i de la Fundació Puigvert (FP) de Barcelona, com mostra la Taula 1. Per establir el grau i estadi de cada tumor s'ha utilitzat la classificació WHO(1973) i el sistema TNM(1978). Les dades clíniques i histopatològiques s'indiquen de les Taules 2 a 4.

Taula 1. Pacients estudiats

Nº pacients	Sexe F/M	TIPUS DE TUMOR	Procedència
16	2/14	TCC DE BUFETA (SÒLID)	SUHM-FP
8	2/6	TCC DE BUFETA(SÒLID + PAPIL·LAR)	SUHM-FP
10	2/8	TCC de PELVIS RENAL	SUHM
8	2/6	RENAL	SUHM

Taula 2. PACIENTS AMB TUMORS DE CÈL·LULES TRANSICIONALS DE BUFETA

CASE	SEXE/ EDAT	STADI/GRAU	TRACTAMENT	RECURRÈNCIA (mesos)	METASTASIS (mesos)
1	M/61	pTa/GII	RTU, BCG, Mit.	- (84)	- (84)
2	M/54	pT1/GII	RTU, BCG, Mit.	+ (8)	- ?
3	M/58	pT1/GII	RTU, BCG, Mit.	- (48)	-
4	F/95	pT1/GIII	RTU	?	?
5	M/76	pT1/GIII	RTU, BCG, Mit.	+ (19)	+Pulmonar, Hepàtica
6**	M/82	pT2/GIII	-	-	+ diagnòstic(15dies)
7	F/63	pT2/GIII	Cistectomia Radical	-	-
8	M/64	pT2/GIII	Cistectomia Radical	-	+Pulmonar, Renal, Ossia(?)
9	M/60	pT3a/GIII	Cistectomia Radical	- (30)	- (30)
10*	M/71	pT3/GIII	?	+ CIS	+ Gangli Peritoneal (72)
11	M/81	pT3/GIII	?	-	+ ? (5)
12**	M/66	pT3b/GIII	Cistectomia Radical	-	- (2)
13	M/79	pT3/GIII	Cistectomia Radical	-	?
14**	M/68	pT4/GIII	Cistectomia Radical	-	- (25)
15**	M/75	pT2/GIII	Cistectomia Radical	- (24)	- (24)
16	M/82	pT3b/GIII	Cistectomia Radical	- (48)	- (48)
17	M/73	pT1/GIII	RTU, BCG, Mit.	- (4)	- (4)
18	F/57	pT2/GII	Cistectomia Radical	?	?
19**	M/66	pT2/GIII	RTU	-	-
20	M/60	pT3a/GIII	Cistectomia Radical	-	+Ossia, Hepàtica, Pulmonar ?(11)
21	M/74	pT3a/GIII	Cistectomia Radical	-	?
22**	M/66	pT3/GIII	Cistectomia Radical	-	+ (42)
23*	M/85	pT3/GIII	Cistectomia Parcial	?	- (30)
24	F/68	pT3/GIII	?	?	?

Abreviacions: RTU, resecció transuretral del tumor; BCG, immunoteràpia; Mit, Quimioteràpia *recurrència
 ** MRC mort relacionada amb la malaltia (càncer)

Taula 3. PACIENTS AMB TUMORS DE CÈL·LULES TRANSICIONALS DE PELVIS RENAL

PACIENTS	EDAT/ SEXE	ESTADI/ GRAU	PATRO DE CREIXEMENT	SUPERVIVÈNCIA (MESOS)
1	68/M	pT3/GIII	?	<3, MRC
2	66/F	pT3/GIII	SÒLID I PÀPIL·LAR	<7, MRC
3	63/M	pT3/GII	PÀPIL·LAR I DIFERENCIACIÓ ESCAMOSA FOCAL	>30
4	64/F	pTa/GIII	PÀPIL·LAR	>24
5	80/M	pTa/GII	PÀPIL·LAR	>45
6	74/M	pTa/GI	PÀPIL·LAR	>26
7	74/M	PT1/GII	PÀPIL·LAR	<9, MRC
8	76/M	pT3/GIII	PÀPIL·LAR	>34
9	89/M	pTa/GIII	PÀPIL·LAR	>35
10	75/M	PT1/GII	PÀPIL·LAR	>15

Abreviacions: MRC mort relacionada amb la malaltia (càncer)

Taula 4. PACIENTS AMB TUMORS RENALS

CAS	EDAT/ SEXE	TIPUS DE TUMOR	TAMANY TUMOR (cm)	TNM	GRAU HISTOLÒGIC	SUPERVIVÈNCIA (MESOS)
1	66/F	Cèl·lules clares RCC ^a	? 4	T2 NoMo T ₁ NoMo	G1 G1	>60
2	63/F	Cèl·lules clares RCC	7	T ₁ NoMo	G3	>60
3	63/M	Cèl·lules clares RCC	9	T ₄ N ₁ M ₁	G3	7
4	71/M	Cèl·lules clares RCC	4	T ₁ NoMo	G1	>60
5	53/M	Pàpil·lar RCC	4	T ₁ NoMo	G2	>36
6	44/M	Pàpil·lar RCC ^a adenoma Pàpil·larRCC ^a carcinoma	? ?	T ₁ NoMo T ₂ NoMo	G1 G1	?
7	48/M	Pàpil·lar RCC	8	T ₂ NoMo	G2	>60
8	39/M	Oncocitoma	5	T ₁ NoMo	G1	>60

Abreviacions: ^a multiple RCCs; RCC, carcinoma de cèl·lules renals; TNM, tumor, nòdul, metàstasi

2. TÈCNIQUES DE CULTIU I CITOGENÈTICA CONVENCIONAL

2.1. CULTIU DE SANG PERIFÈRICA

Cada mostra de sang perifèrica s'extreu en condicions d'esterilitat amb l'anticoagulant heparina sòdica a l'1%.

2.1.1. Protocol de la tècnica

2.1.1.1. Cultiu normal

Es cultiven 0.5 ml (0.3 ml si és nou nat) de sang en tub cònic, amb 5 ml de RPMI-1640, medi idoni pel cultiu de limfòcits.

Cada 100 ml de medi base es suplementen amb:

20 % Sèrum fetal boví (FCS-Foetal calf sèrum), sèrum de vedella fetal que té factors essencials pel creixement cel·lular.

2% L-glutamina (Gibson), és un aminoàcid essencial per la viabilitat cel·lular.

2% Penicil·lina i estreptomina (100U/ml), antibiòtics per evitar contaminacions.

4% Fitohepatoglutininina (PHA) (10µg/ml), mitògen que estimula la proliferació dels limfòcits T.

S'incuba a 37 °C en una estufa al 5% de CO₂ durant 72 hores, temps en el que s'arriba al pic màxim exponencial de creixement cel·lular. Passat aquest temps, s'afegeix al cultiu 0.1-0.5 ml de l'antimitòtic Colcemid (KaryoMAXmax), s'incuba a una concentració final de 0.04 µg/ml. El colcemid atura les cèl·lules en metafase perquè impedeix la despolimerització del fus acromàtic. S'incuba a 37 °C durant 15-20 min, essent convenient no sobrepassar aquest temps ja que afecta a la morfologia dels cromosomes. Es centrifuga a 650 g durant 8 min, i es decanta el sobrenadant. La suspensió cel·lular es sotmet a un xoc hipotònic amb una solució de Clorur Potàsic (KCl 0.075M), afegint de 7-10 ml durant 30 min a 37 °C. L'acció de l'hipotònic permet que s'inflin les cèl·lules per osmosi, dilueix el citoplasma; i facilita la posterior fixació de cromatina. La llargada en el temps d'exposició a la solució amb hipotònic en el cultiu se sap que afecta a la morfologia dels cromosomes. Es centrifuga a 1800 rpm o 400 g durant 8 min i es decanta. Posteriorment, es fixa el material cromatínic, rentant 3 vegades amb 7-10 ml de Carnoy que resulta de la barreja de metanol i àcid acètic, en proporció 3:1. El metanol precipita la cromatina i l'àcid acètic trenca les membranes i estructures cel·lulars que, en no precipitar-les, seran eliminades per les successives rentades. El procés de fixació es repeteix 3-4 vegades disminuint la velocitat i el temps de centrifugació 300 g, 6 min, per intentar no perdre gaire material en cada rentat. Quan el material està ben net, es procedeix a fer les extensions de la suspensió de material nuclear, en divisió i en interfase, sobre el portaobjectes. Aquest han estat prèviament desengreixats amb metanol al 70% a 4 °C durant 20 min, per evitar que s'hi enganxin residus i aconseguir unes bones

extensions. Es deixen assecar i es procedeix a realitzar la tècnica de bandeig cromosòmic de bandes G. La resta de material fixat, es pot guardar en el tub segellat amb plàstic parafilm per evitar l'evaporació a -20°C fins a la seva utilització, poden restar així durant 5-6 anys.

2.1.1.2. Cultiu d'alta resolució

Per obtenir cromosomes d'alta resolució o prometafàsics, el protocol que es fa servir va ser el mateix que l'explicat anteriorment, però amb alguns canvis.

L'incubació és més llarga, de 96 h. A les 72 h d'iniciar el cultiu amb medi suplementat, s'hi afegeix Metotrexat (MTX), a una concentració final de 10^{-6} M. El MTX és un antimetabolit antagonista de l'àcid fòlic que produeix un bloqueig del cicle cel·lular per inhibició de la síntesi del DNA durant la fase S. Després de 17-19 hores d'incubació, les cèl·lules són alliberades del bloqueig, rentant amb medi RPMI-1640. S'afegeix Timidina, que indueix la síntesi de DNA, a una concentració final de 10^5 M, per desbloquejar i reactivar la divisió. Aquest procés permet induir la sincronització de la divisió cel·lular. Es deixa incubar a 37°C perquè les cèl·lules es divideixin de forma sincronitzada. En el cultiu s'hi afegeix l'antimitòtic, colcemid, 5 hores després d'haver afegit la Timidina. A les 94 h de l'inici del cultiu s'afegeix $50\ \mu\text{l}$ ($5\ \mu\text{g/ml}$) de bromur d'etidi (EtBr), per descondensar la cromatina. Aquest compost químic és un tipus de fluorocrom que s'uneix a l'àcid nucleic, i s'ha de manipular amb molta cura ja que està catalogat com a producte carcinogènic i teratogènic. Seguint, es posa el colcemid a una concentració de $0.04\ \mu\text{g/ml}$ durant 2 h, i es realitza la fixació igual que en el procés anterior.

Heparina sòdica 1%	(Rovi)
RPMI-1640	(Gibco)
Sèrum fetal boví (FCS-Foetal calf sèrum)	(Gibco)
L-glutamina	(Gibco)
Penicilina i estreptomicina (100U/ml)	(Gibco)
Fitohematoglutinina (PHA)	(Difco)
Colcemid (KaryoMAXmax)	(Gibco)
KCl 0.075M	(Merck)
Carnoy:metanol:àcid acètic-(3:1)	(Merck)
Metotrexat (MTX)	(Sigma)
Timidina	(Sigma)
Bromur d'Etidi (EtBr)	(Sigma)

2.2. CULTIU DE LÍQUID AMNIÒTIC

En l'amniocentesi, la quantitat de líquid amniòtic (LA) que s'extreu ha d'ésser superior o igual a 20 ml ja que sinó s'obté molt poc material. El volum de LA va augmentant al llarg de la gestació, a les 16 setmanes és de uns 200 ml i al final arriba a 500-1000 ml. Es considera que en la amniocentesi es pot extreure 1 ml de líquid per cada setmana de gestació. Aquesta tècnica es realitza durant les 16-20 setmanes i per tant la quantitat de LA que es pot extreure és de 16-20 ml. La majoria de cèl·lules presents en el LA són amniòcits i per tant són les més utilitzades per realitzar estudis citogenètics.

2.2.1. Protocol de la tècnica

S'extreuen els 16-20 ml de LA, el material es reparteix en dos tubs cònics i es centrifuga a 1800 rpm (650 g) durant 8-10 min. El sobrenadant s'utilitzarà per l'anàlisi bioquímica amb el triple screening. La suspensió cel·lular se sembra en flascons (12,5 cm² de 25 ml) que contenen 4-5 ml de medi AmnioMAXTM-C100; (Solució amb sals, Glucosa amb pH i pressió osmòtica controlats, hormones i vitamines). Aquest medi és suplementat amb 20% de sèrum de vedella fetal (FCS), 2% Penicilina-Estreptomicina, 2% L-glutamina, i de forma opcional 1% Hepes que actua com a fungicid. En el cultiu en flascó al incubador de 37° C i amb una atmosfera del 5% de CO₂, les cèl·lules creixen en monocapa sobre el fons i quan són confluents es tracten amb tripsina (0.25%) durant 10 min i després es renten amb medi, la tripsina és una proteassa que produeix la pèrdua d'adhesió en cultius cel·lulars. Es deixen 5 o 6 dies a 37 °C, llavors es fa canvi de medi i als 8 dies es mira el cultiu al microscopi invertit i quan hi ha prou material es processa. Es posa 0.2 ml de Colcemid a una concentració final de 0.04 µg/ml per aturar les divisions cel·lulars en metafase, però només si les colònies estan ben repartides, o bé es tripsinitza si hi ha molt creixement. Es posa 1ml de tripsina deixant-la actuar a 37 °C durant 2.5 min. Es neutralitza l'efecte enzimàtic amb 3ml de medi AmnioMAXTM-C100 a 37 °C. A continuació, tota la suspensió es traspassa a un tub cònic, on es centrifuga 5 min a 600 g. Al pel·let s'hi afegeix 5ml de la solució hipotònica (KCl 0.075M) atemperada a 37 °C. Es centrifuga 7 min a 600 g. Seguidament, es procedeix a fer tres fixacions amb 5 ml de Carnoy, 5 min a 600 g. Finalment, es fan les extensions i es procedeix al bandeix i anàlisi cromosòmica.

Amniomax	(Gibco)
Hepes	(Gibco)
Tripsina	(Difco)
2xSSC citrat sòdic salí	(Merck)

2.3. CULTIU DE CÈL·LULES TUMORALS

La mostra tumoral s'obté immediatament a l'extirpació del tumor. Quan arriba la mostra, es separa una part per fer citogenètica i l'altra es congela immediatament en nitrogen líquid per realitzar posteriorment l'extracció del DNA.

2.3.1. Protocol de la tècnica

Les mostres de tumor es processen, descartant el greix, el teixit sa adjacent i les àrees necròtiques, llavors es sotmeten a disgregació mecànica, amb bisturí o tisores, i enzimàtica amb 2000U/ml col·lagenasa II a 37 °C durant 1-2 h.

La suspensió cel·lular obtinguda es sembra en medi DMEM, és MEM (medi mínim essencial de Eagle modificat per Dulbecco) que conté els aminoàcids essencials, suplementat amb 10% de FCS (sèrum boví fetal), antibiòtics penicilina-estreptomicina-fungizona al 1% (100U/ml), gentamicina (0.02 mg/ml), insulina bovina (0,02 µg/ml), transferrina (0,02 µg/ml), glutatió (0,1 µg/ml), i selenit sòdic (5ng/ml). Un cop les cèl·lules epitelials s'han adherit al substrat, es renova el medi per descartar les cèl·lules inviables i els detritus que queden en suspensió. Quan el nombre de cèl·lules en divisió és elevat, de 4 a 5 dies des del cultiu primari, es sotmeten a tractament antimitòtic amb colcemid (0.01-0.03 µg/ml) durant 1-4 h, per acumular el màxim nombre possible de cèl·lules en metafase. Després de l'incubació a 37 °C es tripsinitza i posteriorment les cèl·lules es sotmeten a un xoc hipotònic (KCl 0.075 M) durant 25-30 min, per facilitar la separació dels cromosomes. Posteriorment es procedeix a fixar i rentar amb Carnoy, per tal d'eliminar les membranes i estructures citoplasmàtiques. Finalment, es realitzen les extensions cromosòmiques segons el mètode habitual en el nostre laboratori.

Col.lagenasa II	(Gibco)
Medi DMEM	(Gibco)
Penicilina-estreptomicina-fungizona	(Gibco)
Gentamicina	(Gibco)
Insulina bovina	(Gibco)
Transferrina	(Gibco)
Glutatió	(Gibco)
Selenit sòdic	(Gibco)

3. TECNICA DE BANDEIG CROMOSÒMIC

3.1. BANDES C

La tècnica de bandes C permet la tinció selectiva de la heterocromatina constitutiva, material que es troba sobretot en regions centromèriques i pericentromèriques. Tant es pot utilitzar hidròxid de sodi o de bari per desnaturalitzar el DNA cromosòmic, observant-se el mateix patró de bandes C. Aquesta tècnica té com a conseqüència una extracció de fins el 50% del DNA cromosòmic, preferentment s'extreu el DNA localitzat en els braços cromosòmics, per tant cal suposar que la heterocromatina localitzada a les regions centromèriques manté una estructura més compacta i resistent als tractaments, posant-se de manifest amb bandes C. La metodologia és la següent: es submergeixen les preparacions en una cubeta amb HCl 0.02N (2ml HCl+100ml H₂O destil·lada) a temperatura ambient durant 30 min, es renten amb aigua i s'assequen. Seguidament, s'introdueixen en una cubeta de Ba(OH)₂ saturat a 60 °C (100ml H₂O+304gr de Ba(OH)₂), al bany maria durant 2-3 min. Es renten les preparacions amb H₂O destil·lada i metanol, dues vegades per eliminar els restes de bari, es deixa assecar i s'incuba en solució salina 2xSSC a 65 °C 30 min, es renten amb aigua i s'assequen. Finalment es tenyeixen les preparacions amb Leishman al 20% de 5-10 minuts. Es decanta el colorant, es renten i es deixen assecar.

3.2. BANDES G

La tècnica habitual de bandeig cromosòmic és la de bandes G, que posa de manifest un patró de bandes clares i fosques al llarg de cada cromosoma. La metodologia és la següent: les preparacions s'envelleixen durant 24-48 h a temperatura ambient o 8-10 h a una estufa a 37 °C. Posteriorment, es submergeixen en una solució salina de 2xSSC a 65 °C, per tal d'obrir les cadenes de DNA i a continuació es procedeix a afegir la solució de Wright durant 2-5 min, finalment es renta amb aigua i es deixa assecar. L'estudi dels cromosomes amb bandes G es pot fer a diferents resolucions, com mes alta millor (Figura 1).

Solució de 2xSSC (citrat sòdic salí)(Merck): Citrat trissòdic es dissòl amb NaCl (0.3M).

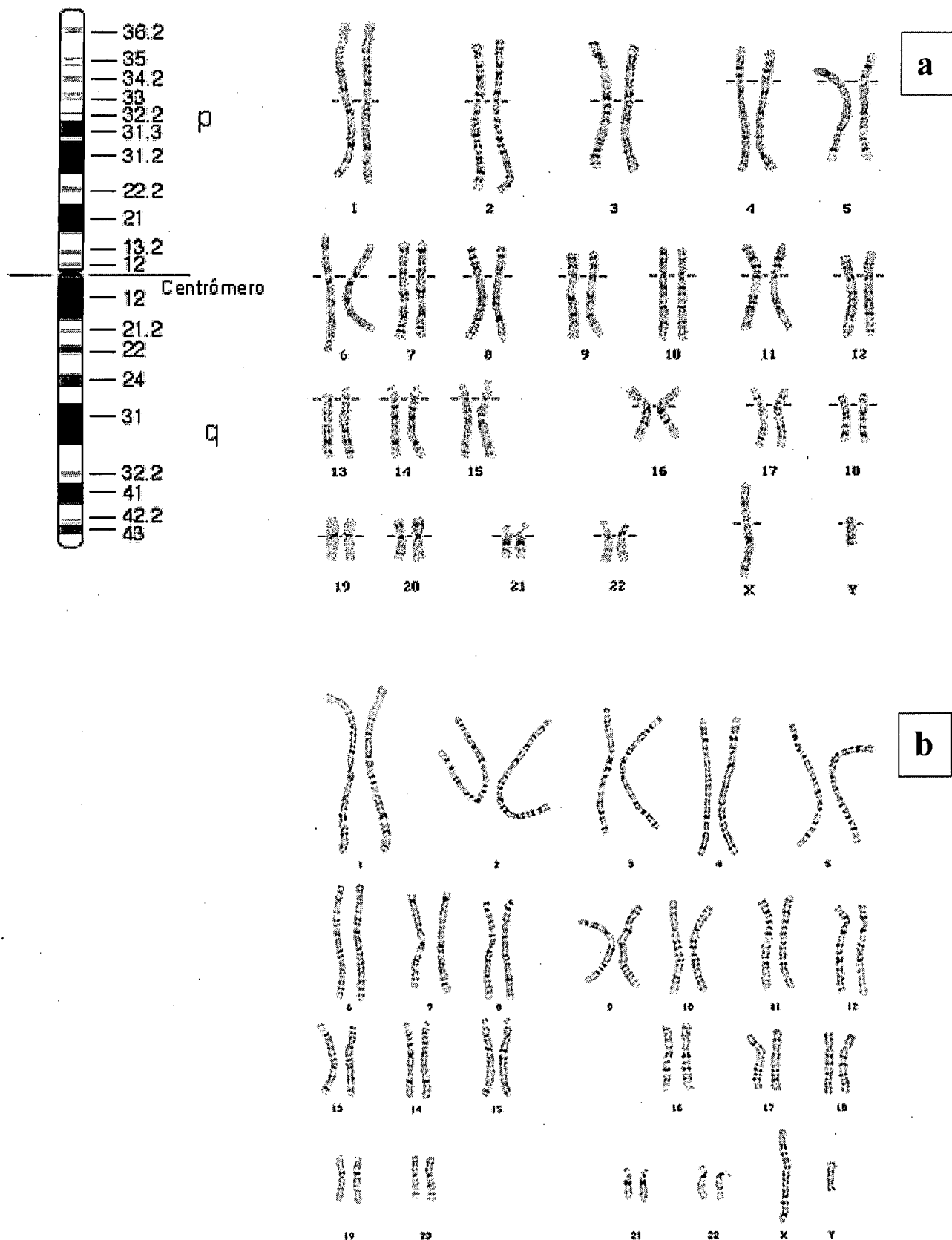
Solució Wright: Colorant Wright (Sigma): tampó Sörensen (Merck) (1:3)

Colorant Wright : 0,25% del colorant es dissòl en metanol i s'agita durant uns 45 min, es filtre i s'envelleix a temperatura ambient una setmana o 3 dies a 37 °C.

Tampó Sörensen: solució A (KH₂PO₄, 9.08g/l)/ solució B(Na₂HPO₄, 12,88 g/l) volum(1:1) a pH 6.8.

Figura 1. Idiograma del cromosoma 1.

a) Cariotip amb nivell de resolució de bandes 550 G (b) i de 650 G



4. EXTRACCIÓ DE DNA

4.1. EXTRACCIÓ DE DNA EN SANG

La mostra de sang s'ha de recollir amb l' anticoagulant EDTA (1mM) i el volum ha d'ésser de 10-20 ml, ja que si és inferior s'obté poc material.

4.1.1. Protocol de la tècnica

La mostra es renta amb sèrum fisiològic (NaCl 0.9%) a 3000 rpm durant 10 min i es treu el sobrenadant. A continuació, s'afegeix 30 ml de buffer de lisi (ELB-Eritròcits lisi Buffer); es deixa 15-30 min en gel, per trencar els globuls vermells quedant la resta de tipus cel·lulars.

Es centrifuga 20 min a 3000 g a 4 °C. Es decanta el sobrenadant.

Per la lisi dels leucòcits s'afegeix al pel·let 25µl de Nonidet P-40 (detergent) al 1%, es barreja i es centrifuga 15 min a 3.500 rpm. El precipitat es resuspèn en 5ml de tampó d'homogeneització, durant 2 h. Es realitza una digestió enzimàtica de les proteïnes tissulars mitjançant la incubació d'aquesta solució amb proteïnassa K (0.2mg/ml) durant un període de 12 a 18 hores a 56°C, o tota la nit (overnight). Seguidament, s'aconsegueix la purificació del DNA o desproteïnitació realitzant una sèrie d'extraccions amb fenol i fenol:cloroform:alcohol-isoamílic (25:24:1). L'ús de fenol a un pH > 7 i la utilització de cloroform desnatura les proteïnes i facilita la formació de complexos RNA-proteïnes. Aquest procés fa possible que aquests complexos RNA-proteïnes siguin solubles a la fase orgànica i a la interfase mentre que el DNA es manté a la fase aquosa. Es recull la fase aquosa i es centrifuga a 8 °C 10 min a 1700 g. Es recupera de nou la fase aquosa, es realitza l'última extracció amb fenol:cloroform:alcohol-isoamílic. A continuació, se l'hi afegeix 0.5 volums d'acetat amònic o NaCl. Seguidament, s'afegeixen 2.5 volums d'etanol absolut que altera l'estructura dels àcids nucleics i els fa precipitar. S'agita el tub per inversió fins que apareix la medusa de DNA, aquesta es pesca amb una pipeta Pasteur i la resta s'elimina. Finalment, el DNA es precipita amb etanol al 70% i amb 0.4 M NaCl, s'elimina el sobrenadant i es deixa assecar. Es resuspèn el DNA amb 1 ml d'aigua miliQ o TE (TRIS- EDTA) i es conserva a 4 °C fins la seva utilització.

Nonidet P-40	(Fluka)
Proteinassa K	(Vysis.Inc).
Fenol- Cloroform	(Merck)
Acetat Amònic	(Merck)
TE	(10mM TRIS.Cl pH 7.4, 1mM EDTA pH 8)
Buffer de lisis (ELB-Eritròcits lisi Bufer)	(10mM Tris-HCl pH 7.5, 0.32M sacarosa, 5mM MgCl ₂)
Tampó d'homogeneització	(100mM NaCl, 10mM TRIS.ClH, 25mM EDTA, 0.5% SDS, pH 8)

4.2. EXTRACCIÓ DE DNA EN TUMORS

La mostra tumoral ha de pesar entre 50-200 mg per obtenir 100-500 µg de DNA.

4.2.1. Protocol de la tècnica

Les mostres congelades es disgreguen en un morter fins a la seva pulverització.

El material es resuspèn amb 20 ml de tampó d'homogeneització i es manté a 37 °C 2-3 hores. Es realitza una digestió enzimàtica de les proteïnes tissulars mitjançant la incubació d'aquesta solució amb proteïnassa K (0.2mg/ml) a 56 °C durant un període de 12 a 18 h o overnight. Seguidament s'aconsegueix la purificació del DNA afegint a la mostra igual volum de fenol i deixant-ho durant 15 min per precipitar les proteïnes i desnaturalitzar l'excés de proteïnassa K. Es centrifuga a 3000 rpm durant 15 min. Es recull la fase aquosa i s'aspira la fase orgànica. A la fase aquosa es realitza una sèrie d'extraccions amb fenol i fenol:cloroform (50:50). Es procedeix a fer l'extracció del cloroform dues vegades, i es centrifuga. L'última extracció es realitza amb fenol:cloroform:alcohol-isoamílic. A continuació, s'afegeix a la fase aquosa 0.5 volums d'acetat amònic o NaCl. Seguidament, s'afegeixen 2.5 volums d'etanol absolut que altera l'estructura dels àcids nucleics i els fa precipitar. S'agita el tub per inversió fins que apareix la medusa de DNA. Aquesta es pesca amb una pipeta Pasteur i la resta s'elimina. Finalment, el DNA es precipita amb etanol al 70% i amb 0.4 M NaCl. S'elimina el sobrenadant i es deixa assecar. Es resuspèn el DNA amb 1 ml d'aigua miliQ o TE i es conserva a 4 °C fins la seva utilització.

Acetat Amònic	(Merck)
NaCl	(Merck)
Tampó d'homogeneització	150mM NaCl (Sèrum fisiològic), 20mM TRIS-CIH, 50 mM EDTA, 4% Na lauroyl sarcosine, pH 8

5. QUANTIFICACIO DEL DNA

Les mostres de DNA s'han de quantificar amb molta exactitud, per procedir a realitzar tant la QF-PCR (PCR quantitativa fluorescent) com la CGH.

La concentració de DNA s'ha llegit amb un fluorímetre. El fluorímetre (TKO-102Hoefer), instrument consistent amb una làmpara de xenó que provoca fluorescència, selector de longituds d'ona i un detector. La mesura es fa en una cubeta de quars de 2ml.

Per mesurar el DNA es dissòl en una solució A (DNA de 10 -500 ng/ml): 10xTNE Buffer (100mM Tris, 10mM EDTA, 1.0M NaCl, pH 7.4), aigua destil·lada i 0.1 µg/ml Hoechst. Per la determinació del grau de puresa s'ha utilitzat l'espectrofotòmetre. L'espectrofotòmetre (Perkin Elmer 320 de doblefeix), determina l'espectre d'absorció de les mostres especialment a les regions de l'ultraviolat, del visible i de l'infraroig (fig. 2). Les mostres es preparen amb aigua destil·lada i a temperatura ambient controlant el pH. Per la lectura de Densitat Òptica (DO) s'utilitzen cubetes de quars i es mesura la DO a 260 nm, una que correspon a la concentració de DNA i la lectura de DO a 280 nm que correspon a la concentració de proteïnes. La relació DO a 260 nm / DO a 280 nm ens indica la PURESA de la mostra respecte el DNA. Per a dur a terme les tècniques de QF-PCR i CGH es requereix una puresa superior a 1.6.

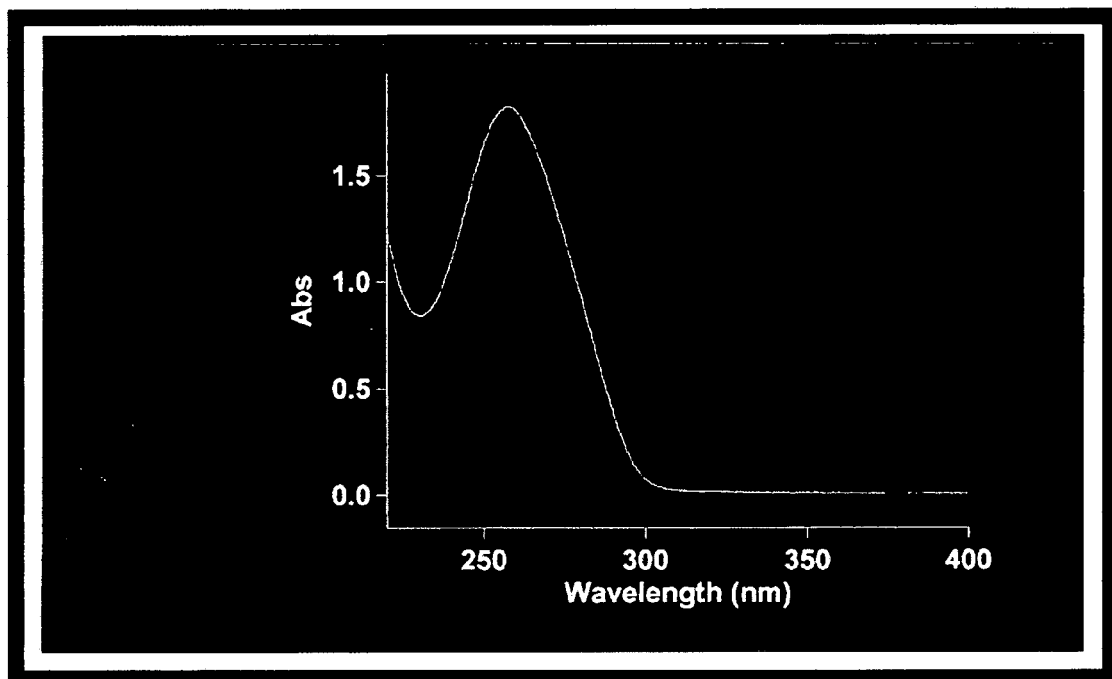


Figura 2. Espectre d'absorció resultant de la lectura de l'absorbància en funció de la longitud d'ona corresponent al DNA de cèl·lules tumorals del cas del pacient 17 de la taula 2.

6. PCR quantitativa fluorescent (QF-PCR)

Aquesta tècnica molecular només l'hem utilitzada per la identificació d'una alteració cromosòmica constitucional en un pacient baró amb cariotip XX (cas 4). Consisteix en l'amplificació de diversos marcadors polimòrfics específics, amb encebadors fluorescents i la posterior anàlisi quantitativa dels productes d'amplificació fluorescents en un seqüenciador de DNA.

6.1. Protocol de la QF-PCR

El DNA genòmic total va ésser obtingut segons el mètode anteriorment descrit. Es va procedir a realitzar múltiples amplificacions QF-PCR utilitzant marcadors altament polimòrfics STR (Short Tandem Repeats), pel gen SRY i el gen de l'amelogenina (AMG) ubicat aprop de la regió pseudoautosòmica del Xp (AMGX) i del Yp (AMGY).

Aquest seqüències es van marcar amb diferents molècules fluorescents o fluorocroms per permetre la determinació del tamany i la quantitat de producte de PCR corresponent, d'acord amb la metodologia descrita prèviament per Cirigliano et al. 1999 i 2001.

Les amplificacions de la PCR, van ésser estandaritzats amb un volum final de 25µl, composades per: 4µl de DNA, 200µmol/l dNTP, 4-35 pmol de cada primer, 2mmol/l MgCl₂, 1xTaq buffer, 1U de Taq polimerasa (Promega. Madison WI, USA). Després de la desnaturalització a 95° C durant 2 min, es realitza la PCR, 28 cicles repetits a 94° C durant 35 segons, 58° C durant 35 segons, 72° C durant 40 segons amb una extensió final a 15 minuts a 72° C en un GeneAmp 9700 (Applied PE Biosystems. Foster City. CA. USA).

Els productes QF-PCR (1µl) són recollits amb 12µl de formamida, per col·locar-los en un seqüenciador automàtic de ADN, ABI PRISM 310 (ABI310). Les anàlisis dels resultats van ésser realitzades amb un GeneScan software 3.1 (PE Biosystems) com prèviament descrit (Applied Biosystems. Foster City. CA. USA). El electroforetograma obtingut es mostra a la figura 3.

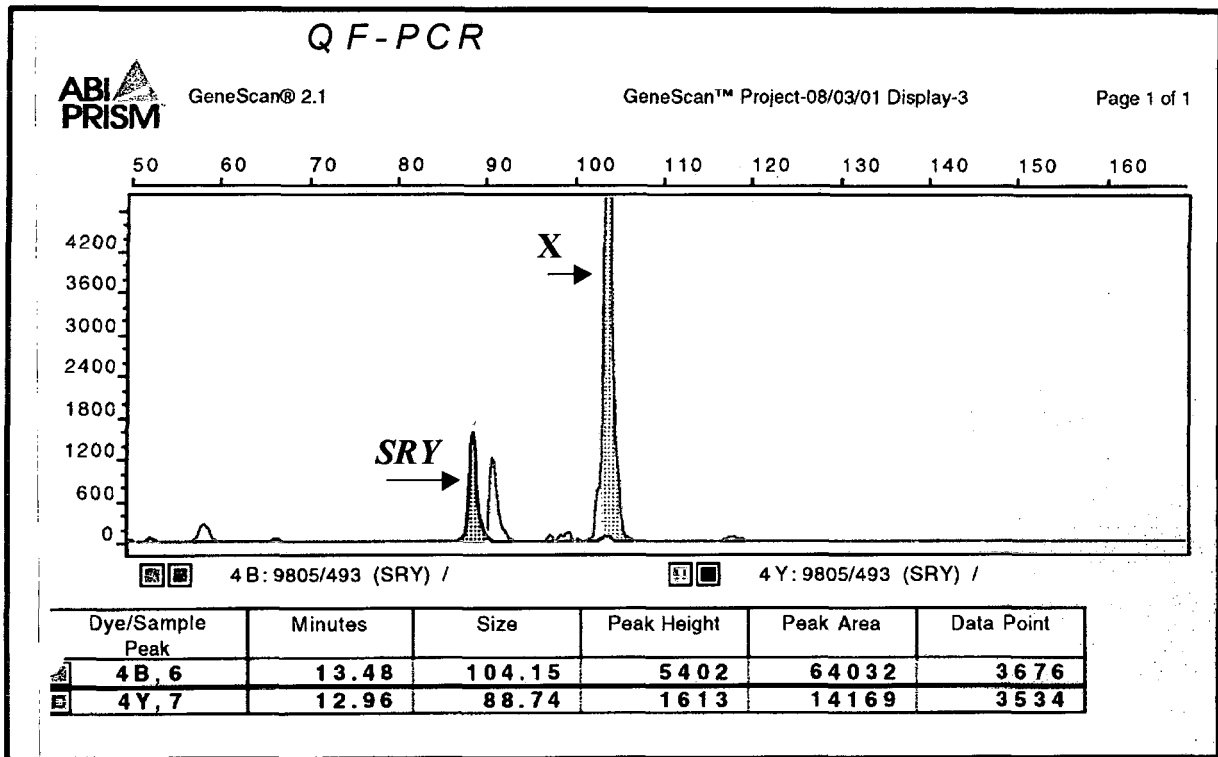


Figura 3. Resultat de l'electroforetograma QF-PCR del cas del baró XX. La detecció del gen SRY va donar positiu. El producte d'amplificació de color negre és el del gen SRY; el de color blau és el del gen de la amelogenina del cromosoma X, que serveix com a control intern del procediment, no s'observa producte d'amplificació del gen de la amelogenina del cromosoma Y.

7. Hibridació in situ Fluorescent (FISH).

Aquesta tècnica d'hibridació s'ha utilitzat per confirmar el cromosoma implicat en determinades alteracions cromosòmiques constitucionals emprant sondes específiques comercials (Vysis- Cytocell).

7.1. Painting

7.1.1. Protocol de la tècnica.

Les extensions amb les metafases obtingudes del cultiu de limfòcits o d'amniòcits han d'ésser envellides abans de procedir a la hibridació. Si no s'ha de realitzar aquesta tècnica d'immediat, es guarden a -20°C fins la seva utilització. La tècnica requereix una preparació dels portes i de les sondes prèvia a la hibridació i de un rentat post- hibridació. Per la post-fixació de les preparacions, les introduïm durant 10 min en una solució del 1% de Formaldehid en 2xSSC, es renten dues vegades amb 2xSSC durant 5 min, es renten amb aigua bidestil·lada i es deixen assecar. En aquest pas podem guardar les extensions congelades a -20°C , fins la seva utilització.

7.1.2. Preparació dels portes

Abans de realitzar la FISH es passen els portes per una solució 2xSSC , pH 5.3, 0.2% twen-20 a temperatura ambient. Els portes es submergeixen en la solució de desnaturalització; 49 ml formamida 100% (Boehringer Mannheim): 7ml de 20xSSC, pH 5.3: 14 ml d'aigua tridestil·lada. durant 5 min a temperatura adequada; 73°C - 74°C . Es realitza un pre-tractament de les preparacions en 2xSSC, pH 5.3, a 37°C durant 30 min i després es desnaturalitzen en una solució de 70% de formamida/2xSSC, durant 2 min a 72°C . Posteriorment, es procedeix a la deshidratació de la preparació utilitzant concentracions d'etanols freds a 70%-85%-100% durant 1 min a cadascun d'ells. S'assequen a temperatura ambient.

7.1.3. Preparació de sondes

Es prepara: una barreja de 1 μl de sonda comercial del cromosoma a estudiar, 7 μl de buffer, 2 μl d'aigua tridestil·lada a temperatura ambient. S'ha de tenir cura amb la llum ja que les sondes estan marcades amb fluorocroms i perdran afinitat si no es tapen. Es fa un pols amb la microcentrifuga (ependorf-centrifuge 5415 c) durant 1 a 3 seg per barrejar bé. La sonda es posa a desnaturalitzar al bany de 73°C durant 5 min.

7.1.4. Hibridació

Els portes s'atemperen a 40°C i s'hi afegeix uns 10-15 μl de la sonda . Es segella el cubre sobre el portaobjectes amb goma líquida i es posa a hibridar en una caixa fosca i humida o s'utilitza l'aparell Hibrite (Izasa) de 12-16 h i a 37°C - 42°C depenent del tipus de sonda.

7.1.5. Rentats post-hibridació

Després de les 12-16 h d'hibridació es treu el cubre del portaobjectes. La preparació es submergeix en una cubeta amb 0.4x SSC /0.3 NP-40 2 min agitant 1-3 seg, i després en una altra cubeta 2x SSC /0.1.1% NP-40 a temperatura ambient 3 min agitant 1-3 seg. Seguidament, les preparacions es deixen assecar i es procedeix a la contratinció DAPI i a l'observació i estudi al microscopi de fluorescència.

7.2. Multipainting

7.2.1. Optimització de la tècnica

Per realitzar el pintat de tots els cromosomes (painting) simultaniament, s'ha utilitzat el Kit Chromoprobe-M Multiprobe System, (CytoCell Ltd, UK), que permet l'observació del painting de tots els cromosomes en el mateix portaobjectes però cadascun de forma separada en metafases independents.

Aquest portaobjectes està dividit en 24 àrees, enumerat respecte els diferents parells cromosòmics i un suport multisonda de la mateixa mida del portaobjectes que conté 24 pouets on cadascun d'ells conté la sonda d'un cromosoma marcada amb el fluorocrom Cy3. La mostra es va col·locant a cada àrea del porta subministrat pel kit (2µl/àrea). A cada pouet del suport multisondes s'hi afegeixen 2µl de solució d'hibridació escalfat prèviament, 2min a 37 °C. A continuació, es fa coincidir el portaobjectes amb el suport de forma que quedin correctament encaixades les diferents àrees del portaobjectes amb el seu pouet corresponent. Un cop encarats i unit el portaobjectes amb el suport, es posen a la placa calefactora a 75 °C durant 5 min, col·locant-se després a la cambra d'hibridació a 37 °C overnight. Finalment, es realitzen els rentats post-hibridació (tal com s'indica a l'apartat anterior) i la contratinció amb DAPI seguint el protocol de la casa comercial.

8. HIBRIDACIÓ GENÒMICA COMPARADA

Aquesta tècnica va ser descrita per Kallioniemi et al. (1992), i permet una anàlisi global del genoma humà.

Es basa en la hibridació competitiva simultània de DNA problema i DNA control o normal marcats diferencialment sobre cromosomes metafàsics normals.

8.1. OPTIMITZACIÓ DE LA TÈCNICA

En la figura 4 s'esquematitza el protocol de CGH utilitzat.

8.1.1. Preparació dels portaobjectes

La major part de l'estudi s'ha realitzat amb portes comercials (Vysis - CGH Metaphase Target Slides 46,XY). Però inicialment es van preparar els portes controls, amb la següent metodologia:

S'extreu sang d'un individu normal, es posa a cultivar i es processa fins a obtenir preparacions on hi ha cromosomes en estadi metafàsic ben extesos per facilitar al màxim l'òptima hibridació. Aquests cromosomes, han d'ésser evaluats al microscopi de contrast de fases tant cromato (cromosomes foscos) com morfològicament (cromosomes ben llargs, sense sol·lapacions). Cal assegurar que la preparació sigui ben neta i sense restes citoplasmàtiques, ja que dificultaria la hibridació. Aquestes preparacions s'envelleixen a l'estufa a 37 °C de 15-40 hores o durant 5 dies a temperatura ambient, perquè el material es faci més resistent ja que sinó a la hibridació els destruiria. Aquest material es pot guardar fins a la seva utilització, durant un màxim de 6 mesos, congelat a -20 °C.

8.1.2. Marcatge del DNA per NICK TRANSLATION

El DNA problema extret a partir de sang, líquid amniòtic o tumor, i el DNA control es marquen amb nucleòtids que porten els fluorocroms incorporats, la Fluoresceïna FITC (verd) i el Texas Red TR[®] (vermell), respectivament o a l'inrevés. El marcatge es va estandaritzar marcant el DNA problema amb Texas Red i el DNA normal amb Fluoresceïna, ja que el Texas Red marca més intens i es controlava millor el DNA problema.

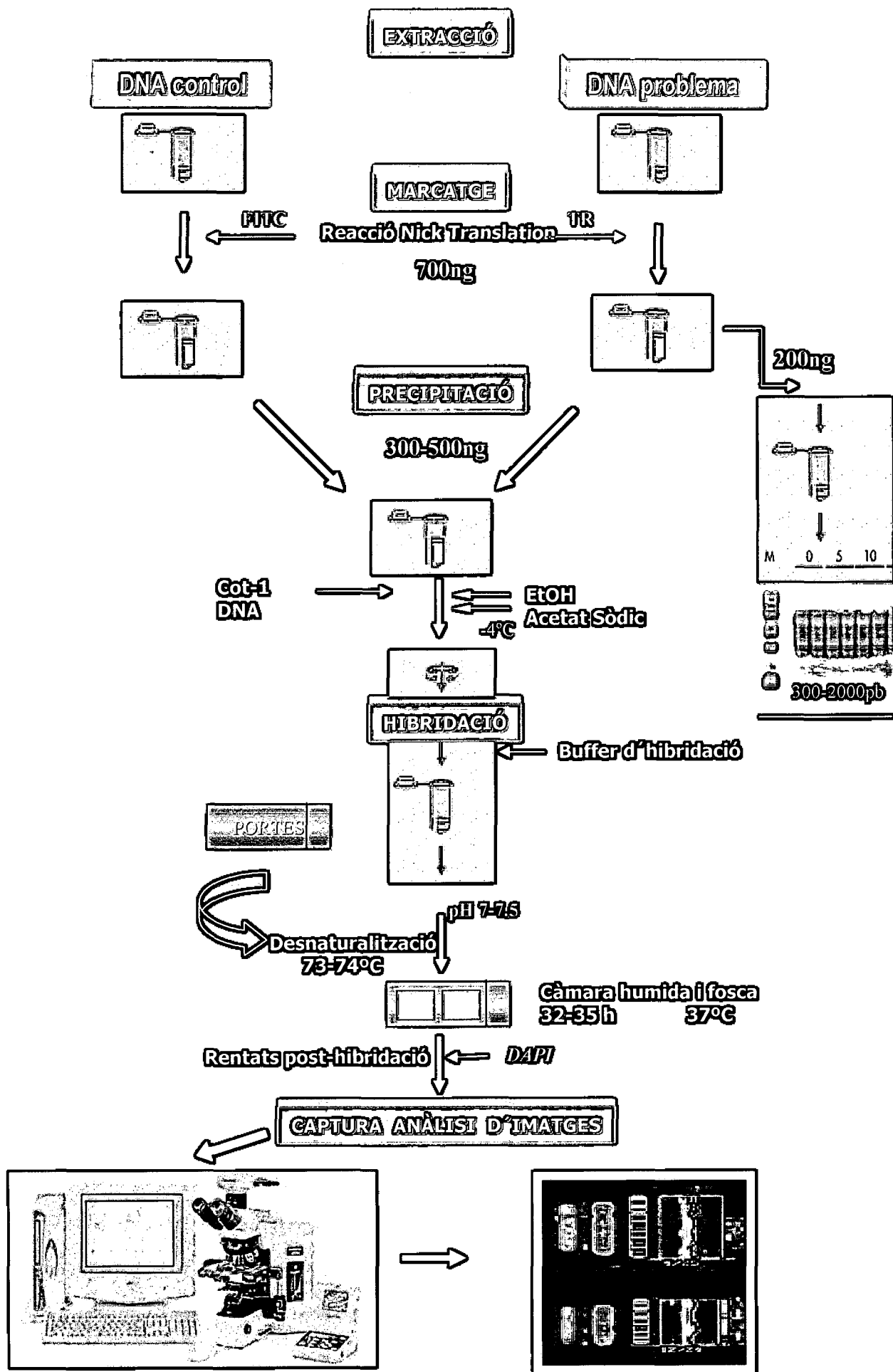
Pel marcatge dels DNAs es prepara segons s'indica a continuació:

Per un volum total de 50 μ l,

DNA concentració	X	X μ l de DNA per obtenir una quantitat total de 700-1000ng
22.5 μ l H ₂ O miliQ - X	22.5 -X	Aigua estèril miliQ
2,5 μ l Fluorocrom Verd/ Vermell	2.5	2,5 μ l Fluorocroms: Verd- 2.5 μ l 0.2mM de Spectrum Green (FITC) Vermell-2.5 μ l 0.2mM de Spectrum Red (TexasRed) Equivalència: 10 μ l 1mM dUTP (1nmol de Fluorescein-12- dUTP o Texas Red-5-dUTP) 40 μ l aigua tridestil·lada estèril
5 μ l 0,1mM dTTP	5	5 μ l 0.1mM dTTP : 10 μ l 0.3mM dTTP 20 μ l d'aigua estèril-miliQ
10 μ l dNTP mix 10 μ l C + A + G	10	10 μ l 0.1mM dNTP mix: 10 μ l de 0.3mM dATP 10 μ l de 0.3mM dCTP 10 μ l de 0.3mM dGTP (bases nitrogenades, dCTP 200 μ M, dGTP 200 μ M, dATP 200 μ M)
5 μ l 10 x Buffer Nick	5	5 μ l de buffer: 10x Nick Translation Buffer (Tris-HCl 500mM pH 7.2, 10mM MgSO ₄ , 1mM DDT)
5-10 μ l Nick Translation Enzim DNA Pol-I/Dnase I	5	5 μ l d'enzim: Nick Translation Enzyme. (Dnase I -stock 3mg/ml.1:2000 aigua estèril miliQ DNA-polymerasa I- 5 U/ μ l; en 50% glycerol)
Volum Total: 50 μ l	50 μ l	

Aquesta barreja s'afegeix en tubs de microcentrífuga (o eppendorfs) i s'incuba en un bany a 15 °C durant 1-2 hores. La reacció s'atura amb una incubació a 75°C durant 10 minuts per desnaturalitzar els enzims, i evitar la degradació del DNA.

Fig 4. Esquema del protocol de la CGH



8.1.3. Electroforesi en gel d'agarosa

Per la comprovació de la llargada dels fragments de DNA que ha d'estar compresa entre 100-1000 pb, es fa una electroforesi en gel d'agarosa (Ecogen).

Després de la reacció s'agafa una quantitat de 200 ng de cada DNA i es comprova la grandària dels fragments tallats i marcats de DNA, en un gel d'agarosa al 1% (4ml de 10xTBE, 40ml aigua destil.lada, 4 mg d'agarosa, 40µl de EtBr a una concentració final de 0.001% del seu volum). L'electroforesi es realitza a 80V durant 40 min. Per cada migració es necessari disposar d'un fragment marcador del que es conegui la seva longitud. Cada gel es col·loca sobre un transiluminador UV, per observar la mida dels fragments de la sonda, smears o llapissades de colors dels fluorocroms. Un cop avaluats s'ha de tenir en compte, que la grandària òptima és de 100-1000pb (figura 5), si els fragments són massa curts es disminueix la quantitat del 1'enzim o el temps d'incubació, i si són massa llargs es tornen a les condicions anteriors (al bany de 15 °C), ja que són les òptimes perquè els enzims actuin. Un cop s'han controlat els DNA marcats, es passa a hibridar els dos tipus de DNA, o es poden guardar a menys 20 °C .

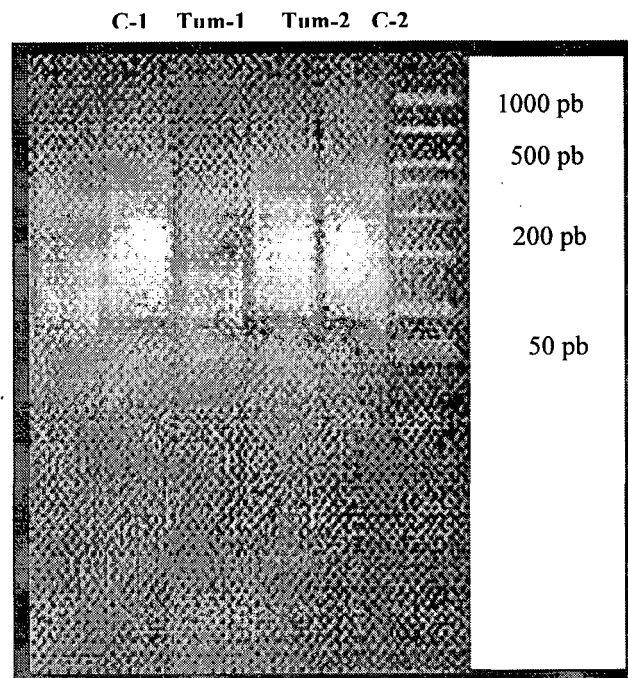


Figura 6. Comprovació de la reacció de marcatge de Nick Translation.

Detecció de la llargada dels fragments de DNA marcats en el gel d'agarosa.

Carril C-1, C-2 corresponen a controls, i Tum-1, Tum-2 a mostres tumorals

8.1.4. Precipitació de les sondes

S'hibriden quantitats iguals de 300ng-500ng de DNA problema i de DNA normal. S'afageix 10-15 µl de DNA Cot-1 humà (15 ng) (Vysis), ja que la Cot bloqueja la heterocromatina o DNA ric en seqüències altament repetitives, així s'evita que el DNA hibridi de forma inespecífica en zones que no resulten informatives, o en zones que puguin donar falsos positius. Tot junt es co-precipita amb 2,5 volums d'etanol pur fred (EtOH 100%) (Merck) i 0.1 volums d'acetat sòdic 3M pH 5.5, en gel o al congelador uns 20 min. Es passa a centrifugar a 12.000 rpm durant 30 min, a 4 °C. Es decanta el sobrenadant i s'intenta fer evaporar tot l'etanol, retingut a les parets del eppendorff, a 37 °C durant 10-15 min, ja que podria interferir en la desnaturalització dels DNAs. Es resuspèn en 15 µl de buffer d'hibridació o Solució A*. Es procedeix a una centrifugada curta (spin), i es deixa a temperatura ambient uns 15-20 min per permetre una total dissolució.

*Solució A: 50% de Formamida desionitzada + 1 50% Màster Mix (20% dextrà sulfat : 2g dextrà sulfat + 1ml 20xSSC, +9 ml d'aigua miliQ).

8.1.5. Desnaturalització de les sondes

Les sondes son desnaturalitzades durant 6-8 min en un bany a 72-74 °C

8.1.6. Desnaturalització dels portaobjectes

Es seleccionen les àrees dels portaobjectes on hi ha més metafases i es marca per sota el vidre amb llapis de diamant. Es desnaturalitzen en una solució de: 49ml Formamida, 7ml 2xSSC, 14ml aigua miliQ, durant 5-8 min a 73-74 °C, a pH 7-7.5 equilibrant-ho amb HCl al 35%. Quan la solució de desnaturalització arriba a 73-74 °C s'hi introdueixen els portaobjectes amb metafases normals (Vysis) durant 5-6 min. Es convenient no fer servir més de 4 portaobjectes alhora. Es deshidraten 1 min en una sèrie d'etanols freds al 70%- 90%- 100 %, per treure l'excés d'etanol i es deixent assecar a la foscor a temperatura ambient.

8.1.7. Hibridació

Els portaobjectes s'escalfen a 37 °C uns 3 min. Paral·lelament es desnaturalitza la sonda 6-8 min a 72-74 °C per tal d'obrir les cadenes de DNA per hibridar amb els cromosomes dels portaobjectes. S'aplica la sonda desnaturalitzada sobre del portaobjectes on s'ha escullit l'àrea òptima. Es col·loca el cubreobjectes (20x20mm) i es sella amb goma líquida especial. Es posa a hibridar tot junt en una caixa humida i fosca durant 2-3 dies en una estufa a 37 °C.

8.1.8. Rentats de Post-hibridació

S'extreu el cubreobjectes segellat, i els portaobjectes es renten amb la solució I, a 37 °C durant 5 min, barrejant una mica per tal d'eliminar qualsevol residu sobrant, es a dir qualsevol reste inespecífic de DNA que no ha hibridat. Es treu de la primera solució de rentat per passar-ho a la solució II, durant 1 min a temperatura ambient, i es deixa assecar a l'aire.

Solució I- 0.4xSSC/0.3% NP-40 (20 ml 20xSSC + 950 ml H₂O miliQ+ 3 ml NP-40 i ajustar a pH 7-7.5 amb NaOH, ajustar a volum final 1l i filtrar)

Solució II- 2xSSC/0.1% NP-40 (100 ml 20xSSC + 850 ml H₂O miliQ+1ml NP-40 i ajustar a pH 7-7.5 amb NaOH, ajustar al Volum de 1l).

8.1.9. Contratació DAPI

Seguidament es realitza la contratació afegint 12-15 µl DAPI + antifade a cada portaobjectes, i es col·loca el cubreobjectes de 24x60 mm. Els cromosomes es contratenyeixen amb 5 µg/ml de 4',6-diamidin-2-fenilindol (DAPI) i afegits en 7µl d'una solució buffer antifade (1,4-fenil-diamina) Vectashield (Vector Lab). Per evitar la pèrdua progressiva de color, les preparacions es guarden a 4 °C en una caixeta tapada sense llum perquè no perdin la fluorescència.

8.1.10. Captura d'imatges

La captura d'imatges es realitza en un Microscopi de fluorescència* d'alta qualitat, equipat amb una roda de filtres adequada per cada fluorocrom; connectat amb una càmera CCD d'alta sensibilitat (Photometrics Sensys/ Olympus U-SPT), i acoblada a un ordinador amb sistema d'anàlisi d'images digitals amb un software específic. S'ha utilitzat el sistema d'anàlisi Cytovision (Applied Imaging) i també el Quips de (Vysis) que tenen el software automatitzat per analitzar la CGH.

* La visualització i anàlisi d'imatges es va fer amb diferents aparells.

- Microscopi Olympus AX70 amb filtres pels fluorocroms utilitzats i connectats a un ordinador amb sistema d'anàlisi Cytovision (Applied Imaging).
- Microscopi Olympus BX60 amb filtres pels fluorocroms utilitzats i connectats a un ordinador Power Macintosh G3 amb software Quips® per Smartcapture (Quips Karyotyping/CGH. Digital Scientific Cambridge,UK. Vysis, NY)

Per visualitzar cada fluorocrom, respecte la seva longitud d'ona o combinacions, hi ha diferents filtres* específics que s'han d'acomodar als microscopis:

- Filtre de fluorescència pel color vermell U-MWY, per captar el marcatge del fluorocrom amb vermell del TR (Texas Red).
- Filtre de fluorescència pel color verd U-MNIBA per captar el marcatge del fluorocrom amb verd FITC (Fluorescein isothiocyanate)
- Filtre de fluorescència pel color blau U-MNU per captar el marcatge del fluorocrom amb blau DAPI.
- Filtre de fluorescència triple P/F/Pi 510.

A la figura 6, es mostra els diferents tipus de fluorocroms amb els seus nivells d'excitació i emissió, i filtres utilitzats per l'anàlisi de CGH

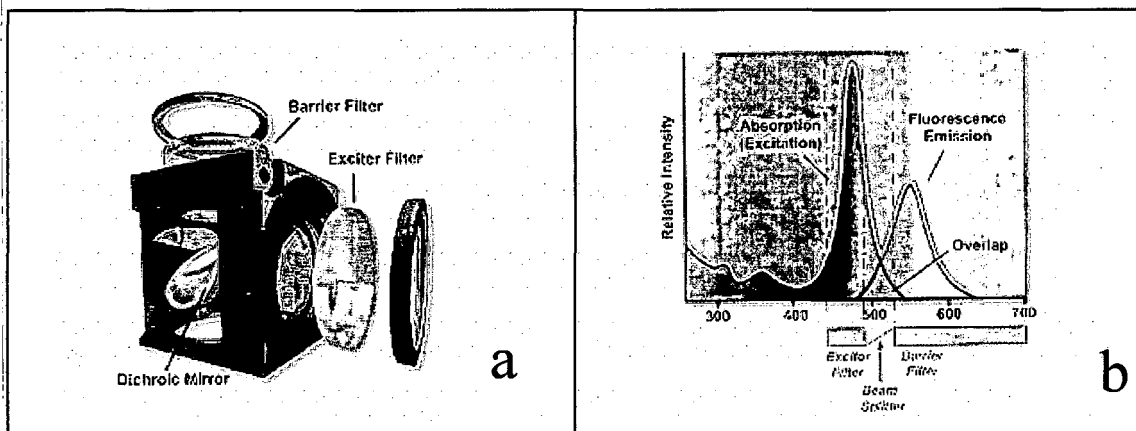


Figura 6. Tipus de fluorocroms i filtres utilitzats per l'anàlisi de CGH:

(a) Tipus de filtres

(b) Nivells d'excitació i emissió dels diferents fluorocroms

8.1.11. Anàlisi d'imatges

Les imatges més idònies són aquelles en que les metafases tenen els cromosomes llargs, poc solapats, i amb la fluorescència verda i vermell equivalent. Per l'anàlisi de cada mostra van ser captades de 10-25 metafases amb hibridacions uniformes d'alta intensitat. El software de CGH permet obtenir un perfil de fluorescència de tots els cromosomes de cada metafase. Però, prèviament cal controlar que hi hagi un patró d'hibridació uniforme, no granulós, amb una adequada intensitat, mínim de background de fluorescència, una segmentació dels cromosomes, una normalització d'intensitat de fluorescència, una determinació dels perfils d'intensitat per integració dels valors pixel normalitzats al llarg de línies perpendiculars a l'eix del cromosoma, i una determinació del quocient de fluorescència del perfil d'intensitats de fluorescència verd/vermell, que representa el perfil de cada cromosoma.

Per cada metafase es van capturar les imatges corresponents a la fluorescència verd, vermell i blau i van ser analitzades com a imatges separades (fig 7). L'imatge que representa el contrast DAPI blau va ésser invertida i utilitzada per cariotip semiautomàtic. Les fluorescències o intensitats fluorescent verdes (DNA control) i vermelles (DNA problema) van ésser determinades per cada cromosoma des del telòmer p fins el telòmer q integrant intensitats a intervals de 1 pixel al llarg de l'eix medial del cromosoma després de la correcció del background i de la normalització del ratio entre verd i vermell per cada metafase sencera establert en 1.0, es van calcular després els perfils del ràtio d'intensitat fluorescent de verd a vermell, en tots els cromosomes. La intensitat total depèn de molts factors, per tant a la captura s'ha de procedir a una normalització dels factors que hi actuen. L'aparell combina les dades de totes les metafases analitzades en cada hibridació i es va determinar un perfil de ràtio mig per cada cromosoma. Cada idiograma del cromosomes mostra el perfil de CGH de cadascun, i els ratio valorats estan entre 1.25 i 0.75 per representar els guanys i pèrdues respectivament de cada cromosoma. L'expressió d'alts nivells de DNA (amplificació o grans guanys) està considerat quan la fluorescència mitjana sobrepassa de 1.5. La selecció dels límits s'ha de fer en funció de la ploïdia del tumor i de la qualitat de les hibridacions en casos que s'analitzi DNA tumoral. Els resultats es van comprovar amb interval de confiança del 95%. En la figura 8 es mostren els perfils obtinguts de l'anàlisi de CGH.

Figura 7. Imatges seqüencials captades fent servir la càmera de microscopi fluorescent amb els filtres per fluoresceïna (verd), rodamina (vermell) i DAPI (blau)

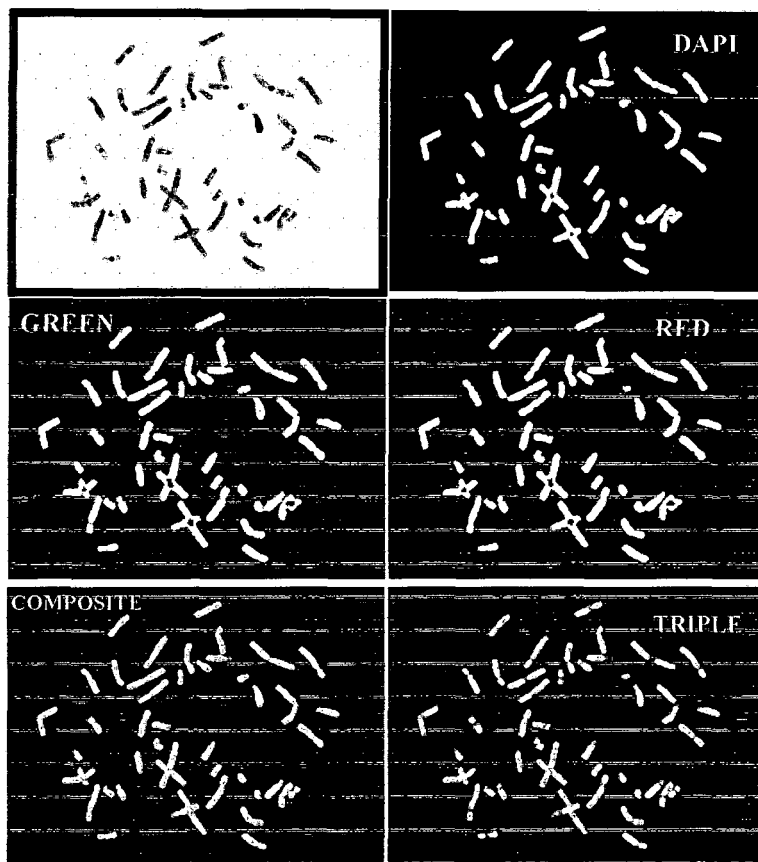
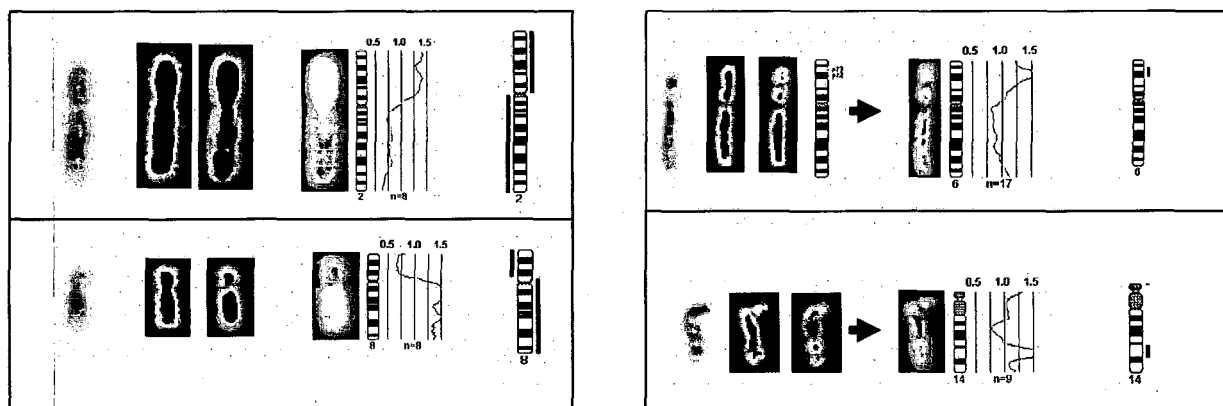


Figura 8. Seqüències de DNA amb guanys, pèrdues i amplificacions de material



NOMENCLATURA

Per a descriure els dels cariotips s'ha utilitzat la nomenclatura del International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature ISCN (1995), que inclou les tècniques de hibridació in situ. Per la classificació dels tumors s'ha utilitzat el sistema WHO (1973) i el TNM (1978).

4. RESULTATS

ARTICLES

1. **Identification of two de novo partial trisomies by comparative genomic hybridization.**
Rigola MA, Carrera M, Ribas I, De La Iglesia C, Mendez B, Egozcue J, Fuster C.
 Clin Genet. 2001 Feb;59(2):106-10.....
 2.2*
2. **Characterization of a heritable partial monosomy 18p by molecular and cytogenetic analysis.**
Rigola MA, Plaja A, Mediano C, Miro R, Egozcue J, Fuster C.
 Am J Med Genet. 2001 Nov 15;104(1):37-41.....
 2.3*
3. **A comparative genomic hybridization study in a 46,XX male.**
Rigola MA, Carrera M, Ribas I, Egozcue J, Miro R, Fuster C.
 Fertil Steril. 2002 Jul;78(1):186-8.....
 3.2*
4. **Comparative genomic hybridization analysis of transitional cell carcinomas of the renal pelvis.**
Rigola MA, Fuster C, Casadevall C, Bernues M, Caballin MR, Gelabert A, Egozcue J, Miro R.
 Cancer Genet Cytogenet. 2001 May;127(1):59-63.....
 1.7*
5. **Analysis of kidney tumors by comparative genomic hybridization and conventional cytogenetics.**
Rigola MA, Casadevall C, Bernues M, Caballin MR, Fuster C, Gelabert A, Egozcue J, Miro R.
 Cancer Genet Cytogenet. 2002 Aug;137(1):49-53.....
 1.7*
6. **Comparative genomic hybridization analysis of invasive bladder tumors with different grown patterns.**
Rigola MA, Hernando C, Fuster C, Gelabert A, Egozcue J, Miro R.
 Journal of Urology (enviat).....
 3.2*

* IMPACT FACTOR

Identification of two de novo partial trisomies by comparative genomic hybridization.

Rigola MA, Carrera M, Ribas I, De La Iglesia C, Mendez B, Egozcue J, Fuster C.
Clin Genet. 2001 Feb;59(2):106-10.....

2.2*

Short Report

Identification of two *de novo* partial trisomies by comparative genomic hybridization

Rigola MA, Carrera M, Ribas I, De La Iglesia C, Mendez B, Egozcue J, Fuster C. Identification of two *de novo* partial trisomies by comparative genomic hybridization.

Clin Genet 2001: 59: 106–110. © Munksgaard, 2001

We report the use of comparative genomic hybridization (CGH) to define the extra chromosome region present in two *de novo* partial trisomies 15q25-qter and Xp21-pter, which could not be clarified by conventional G-banding. Investigation with fluorescence *in situ* hybridization (FISH) revealed that the partial trisomy corresponded to an unbalanced translocation between Y and 15 chromosomes in 1 patient and an unbalanced X/X reorganization in the other patient. The combination of classical karyotyping, CGH, and FISH is useful for the identification and characterization of partial trisomies in clinical diagnostic laboratories, in order to delineate the chromosome regions implicated in specific clinical disorders.

Recent research has shown that some structural chromosome anomalies, such as many partial trisomies and monosomies, which are unidentifiable by G-banding, can be resolved using new molecular cytogenetic techniques. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) is now widely used in clinical diagnosis. However, it requires several rounds of whole chromosome paints before the extra or deleted material is recognized. A technique especially indicated in cases with poor cytogenetic material has been described by Escudero et al. (1), who used simultaneous and sequential FISH to detect different chromosome pairs after consecutive hybridizations on the same metaphase. However, these methods are too cumbersome, expensive, and time consuming for routine analysis. Novel approaches, such as multicolor-FISH (M-FISH), allow the identification of all chromosomes after a single hybridization, but require sophisticated equipment and computer software (2–4). The M-FISH technique is especially indicated to determine the origin of the chromosome fragments implicated in unbalanced aberrations and their lo-

**MA Rigola^a, M Carrera^b,
I Ribas^b, C De La Iglesia^b,
B Mendez^b, J Egozcue^a and
C Fuster^a**

^a Unitat de Biologia, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i d'Immunologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, ^b Centro de Patologia Cel·lular y Diagnóstico Prenatal, Barcelona, Spain

Key words: CGH – FISH – partial trisomy 15q and partial trisomy Xp – phenotype/genotype correlation

Corresponding author: Carme Fuster, Unitat de Biologia, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i d'Immunologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 5811175; fax: +34 93 5811025; e-mail: carme.fuster@uab.es

cation in the karyotype, but are not useful for identification of duplications or deletions of single chromosome bands. The microdissection method has been recently used to characterize chromosome segments in clinical diagnosis (5), but this technology is only available in a reduced number of laboratories and requires well-trained operators. Comparative genomic hybridization (CGH) has been successfully used in clinical diagnosis to identify gains or losses in unbalanced chromosome alterations after a single hybridization and without cell culture (6–19).

In this report, we describe the use of a combination of classical karyotyping, FISH, and CGH to identify the chromosome fragments implicated in two constitutional partial trisomies and to delineate the chromosome bands correlated with specific congenital malformations.

Case reports

Patient 1 was a 3-year-old boy. He was born at term after an uncomplicated 38-week gestation.

The most important clinical features described at the third month were obvious muscular hypotonia, horseshoe kidney, and facial dysmorphism. At the time of this study, he presented facial dysmorphism, cognitive defects, and behavioral and speech problems (Fig. 1). He had a 5-month-old brother, who was physically and mentally normal.

Patient 2 was a 35-year-old sterile woman with premature menopause.

Materials and methods

Cytogenetic analysis

Peripheral blood samples from these patients, their parents, and the brother of patient 1 were cultured for 72 h in RPMI medium. Metaphase chromosomes were analyzed by standard Wright-G-banding technique.

FISH analysis

To determine the chromosomes implicated in the unbalanced chromosome aberrations detected by G-banding, but unidentifiable, FISH was performed with a multipainting test for all chromosomes: 22 autosomes, X and Y (Kit Chromoprobe-M Multiprobe, CytoCell Ltd, UK). The hybridizations to metaphase spreads were performed according to the instructions of the supplier.

CGH analysis

CGH was used to determine the specific chromosome regions implicated in the chromosome



Fig. 1. Facial features in patient 1.

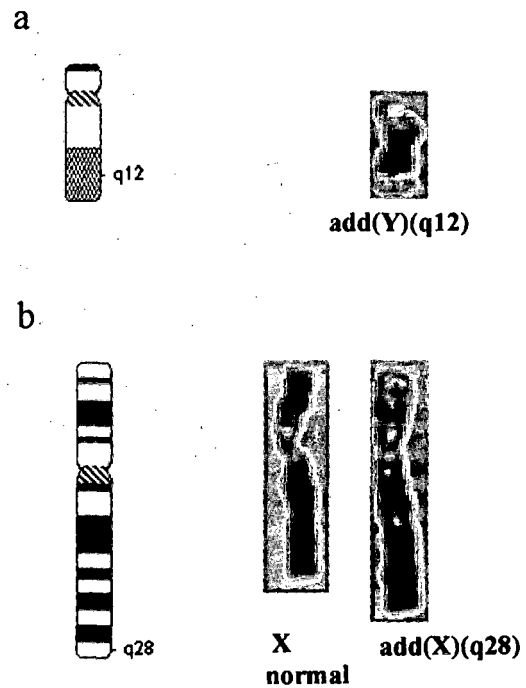


Fig. 2. Partial karyotype and idiogram of chromosomes showing the additional material. (a) Y-chromosome from patient 1 and (b) X-chromosomes from patient 2.

anomalies. For CGH, DNA was isolated from blood leukocytes of the probands and of healthy individuals of the same sex as the patients. DNA labeling, hybridization, and detection was performed essentially as described by Kallioniemi et al. (20) and according to the instructions of the supplier (Vysis, Downer Grove, IL, USA). Slides were analyzed using a Cytovision Ultra workstation (Applied Imaging, Sunderland, UK). The software performed a calculation of the patient DNA to normal DNA fluorescent ratios along the length of each chromosome. Ratio values above 1.25 and below 0.75 were considered to represent chromosomal gains and losses, respectively. In addition, control experiments in which the red-dUTP and green-dUTP labels were interchanged between normal and patient were also performed.

Results

G-banding chromosome analysis revealed an unbalanced abnormality in both patients. Karyotypes were 46,X,add (Y)(q12) in patient 1 and 46,X,add(X)(q28) in patient 2, respectively (Fig. 2). Parental karyotypes were normal in both cases, and brother of patient 1 was also of normal karyotype.

M-FISH analysis in patient 1 detected no signal on the distal Yqter after hybridization with a Y-chromosome-specific library and the presence of a

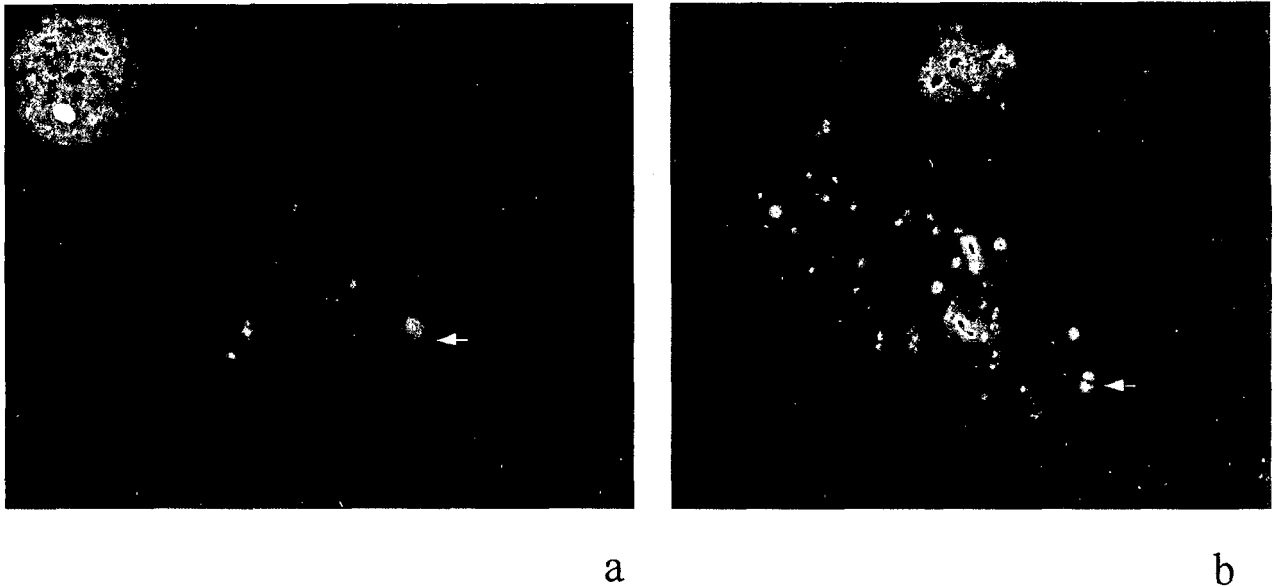


Fig. 3. FISH analysis from patient 1 revealed (a) no signal on the distal Yqter (arrow) using a Y-chromosome-specific library; the signals correspond to the normal region of the Y-chromosome (right) and to the Y material translocated to chromosome 15 (left) and (b) one signal on the long arm of the abnormal Y-chromosome (arrow) using a chromosome-15-specific library, in addition to the normal chromosomes 15.

chromosome 15 paint signal on the distal region of the Y-chromosome in addition to the two normal chromosomes 15 (Fig. 3). A hybridization using only a chromosome painting probe for 15q (WCP 15q Spectrum Orange, Vysis) also showed the presence of a chromosome 15 paint signal on the distal Yqter. In patient 2, FISH studies showed a signal on all add (X) when an X-chromosome paint was used (Fig. 4).

CGH analysis was performed to identify and characterize the additional chromosome fragment on the add (Y) and add (X) chromosomes. In patient 1, the CGH profiles of chromosome 15 showed a gain in the region 15q25-qter, and in patient 2, the CGH profiles showed a gain in the Xp21-pter and also a loss of Xq28-qter material (Fig. 5). All other chromosomes in both patients had normal CGH profiles.

Based on classical cytogenetic, FISH, and CGH data, the karyotypes of patients 1 and 2 were defined as 46,X,add(Y)(q12),rev ish der (Y)t-(Y;15)(q12;q25,enh(15q25) and 46,X,add(X)-(q28),rev ish der(X)t(X;X) (q28;p21),enh (Xp21).

Discussion

The precise characterization of extra or missing chromosome fragments implicated in constitutional unbalanced karyotypes is very important, because they provide clues as to the discovery of genes implicated in specific clinical disorders. However, partial trisomies and monosomies may not be

resolved by classical cytogenetics methods when small segments of a size similar to that of single of chromosome bands are implicated. The introduction of new molecular cytogenetic techniques, especially FISH and CGH, in clinical diagnosis allows the delineation of these chromosome anomalies (6–19). The present report is a new contribution showing the usefulness of CGH, in combination with FISH, to characterize the chromosome fragments implicated in two *de novo* constitutional partial trisomies.

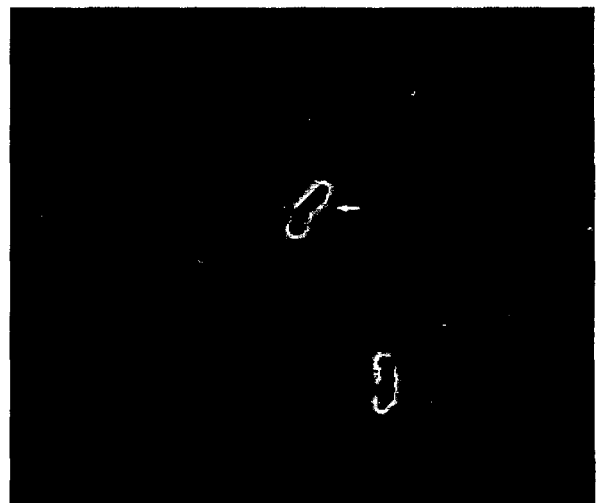


Fig. 4. FISH analysis from patient 2 showed signal covering all add (X) (arrow) using a X-chromosome paint.

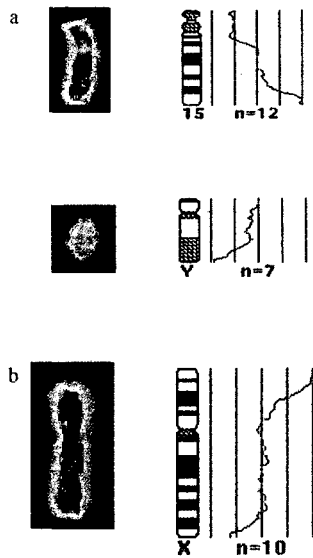


Fig. 5. CGH results from patients 1 and 2. Lines, from left to right on CGH profiles, represent fluorescence ratio values of 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, and 1.5. The vertical lines on the right side of the chromosome indicate gains; those on the left indicate losses of the corresponding chromosomal regions. Chromosomes and profiles obtained by CGH showed a gain of (a) 15q25-qter in patient 1 and (b) Xp21-pter in patient 2.

A comparison of the clinical features from patients 1 and 2 with previous published cases with the same trisomies reveals similar common clinical abnormalities in both cases. The severe hypotonia, horseshoe kidney, and facial asymmetry present in patient 1 are common clinical features associated with partial trisomy 15 (21). The review by Chander et al. (21) described that most cases with a duplication of the distal part of 15q have resulted from unbalanced translocations frequently derived from a balanced translocation carried by a parent, usually the mother. Only a few patients with a 46,X,der(Y)t(Y;15) karyotype have been described in the literature; the chromosome translocation involved the Yq12 and 15p11 breakpoints in most cases (22). Until now, only a case with a der(Y)t(Y;15q) has been published (23), corresponding to a boy with mental and growth retardation, microcephaly, spastic quadriplegia, and undescended testes; in this paper, the breakpoints implicated in this reorganization are not indicated. Our patient 1 is the second case in the literature with a der(Y)t(Y;15) affecting the long arm of chromosome 15, which suggests that the genetic unbalance of 15q25-qter expressed in our patient can account for this abnormal phenotype.

The CGH results from patient 2 show not only the Xp21-pter region duplication, but also the Xq28-qter region loss. Kallionemi et al. (20) observed that the green and red fluorescence intensi-

ties gradually decrease at the chromosome telomeres and suggest that caution should, therefore, be exercised in the interpretation of ratio changes at chromosome telomeres. In our case, due to our knowledge of the G-banded and FISH results, we can accept the Xq28-qter deletion.

Females with duplication of segments of the X-chromosome are fertile, provided that there are no X/X rearrangements, while patients with X/X rearrangements leading to a duplication of the short or long arm (without significant deletions) may or may not be fertile (24). Our patient 2, with a partial trisomy Xp produced *de novo* by X/X rearrangements, presents sterility and early-onset menopause as phenotype alterations. The last clinical alteration is also seen in 47,XXX females and in females with duplications of Xp or Xq (25). No correlation with specific phenotype or clinical features other than sterility and premature menopause was found in our case.

In this paper, we describe the combined use of FISH and CGH techniques; first FISH was used to identify the origin and localization of the extra chromosome material detected by G-banding [in patient 1 the add (Y) corresponded to a 15 chromosome fragment located in Yqter, and in patient 2 the add (X) was from the X-chromosome] and the CGH method to characterize the chromosome fragment gains (the 15q25-qter region and Xp21-pter in patients 1 and 2, respectively). In conclusion, according to previous data (8, 9, 13–19), the combination of conventional and molecular cytogenetic techniques is useful to characterize unknown extra chromosome material in partial trisomies and to contribute to establish genotype/phenotype correlations.

Acknowledgements

Financial support was given by DGEIC (PB 98-0891), UAB (1999, EMER-21), and CIRIT (1998, SGR00061 and 1999, SGR-00104).

References

- Escudero T, Fuster C, Coll MD, Egozcue J. Cytogenetic analysis using simultaneous and sequential fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 100: 111–113.
- Schröck E, du Manoir S, Veldman T et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996; 273: 494–497.
- Speicher MR, Ballard SG, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multicolor FISH. *Nature Genet* 1996; 12: 368–375.
- Hadd RB, Schröck E, Meck J et al. Identification of *de novo* chromosomal markers and derivatives by spectral karyotyping. *Hum Genet* 1998; 103: 619–625.

5. Stone D, Ning Y, Guan X-Y, Kaiser-Kupfer M, Wynshaw-Boris A, Biesecker L. Characterization of familial partial 10p trisomy by chromosomal microdissection, FISH, and microsatellite dosage analysis. *Hum Genet* 1996; 98: 396-402.
6. Bryndorf T, Kirchoff M, Rose H et al. Comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 1211-1220.
7. Wang BBT, Yu LC, Peng W, Falk RE, Williams J. Prenatal identification of i (Yp) by molecular cytogenetic analysis. *Prenatal Diagnosis* 1995; 15: 1115-1119.
8. Erdel M, Duba HC, Verdorfer I et al. Comparative genomic hybridization reveals a partial de novo trisomy 6q23-qter in an infant with congenital malformations: delineation of the phenotype. *Hum Genet* 1997; 99: 596-601.
9. Levy B, Gershin IF, Desnick RJ et al. Characterization of a de novo unbalanced chromosome rearrangements by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization. *Cytogenetic Cell Genet* 1997; 76: 68-71.
10. Yu LC, Moore DH, II, Magrane et al. Objective aneuploidy detection for fetal and neonatal screening using comparative genomic hybridization (CGH). *Cytometry* 1997; 28: 191-197.
11. Nacheva EP, Grace CD, Bittner M, Ledbetter DH, Jenkins RB, Green AR. Comparative genomic hybridization: a comparison with molecular and cytogenetic analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 100: 93-105.
12. Daniely M, Aviram-Goldring A, Barkai G, Goldman B. Deletion of chromosomal aberration in fetuses arising from recurrent spontaneous abortion by comparative genomic hybridization. *Human Reproduction* 1998; 13: 805-809.
13. Boceno M, Rival JM, Nomballais MF, David A, Avet-Loiseau H. Characterization of two add (4qter) chromosomes by comparative genomic hybridization. *Ann Génét* 1998; 41: 83-86.
14. Lapierre JM, Cacheux V, Collot N et al. Comparison of comparative genomic hybridization with conventional karyotype and classical fluorescence in situ hybridization for prenatal and postnatal diagnosis of unbalanced chromosome abnormalities. *Ann Génét* 1998; 41: 133-140.
15. Benzacken B, Lapierre JM, Siffroi JP, Chalvon A, Tachdjian G. Identification and characterization of a de novo partial trisomy 10p by comparative genomic hybridization (CGH). *Clin Genet* 1998; 54: 334-340.
16. Daniely M, Barkai G, Golman B, Aviram-Goldring A. Structural unbalanced chromosome rearrangements resolved by comparative genomic hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1999; 86: 51-55.
17. Lapierre JM, Cacheux V, Luton D et al. Analysis of uncultured amniocytes by comparative genomic hybridization: a prospective prenatal study. *Prenat Diagn* 2000; 20: 123-131.
18. Breen CJ, Barton L, Carey A et al. Applications of comparative genomic hybridization in constitutional chromosome studies. *J Med Genet* 1999; 36: 511-517.
19. Lestou VS, Desilets V, Lomax BL et al. Comparative genomic hybridization: a new approach to screening for intrauterine complete or mosaic aneuploidy. *Am J Med Genet* 2000; 92: 281-284.
20. Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J et al. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosom Cancer* 1994; 10: 231-243.
21. Chandler K, Schrander-Stumpel RM, Engelen J, Theunissen P, Fryns JP. Partial trisomy 15q: report of a patient and literature review. *Genetic Counseling* 1997; 8: 91-97.
22. Hsu LYF. Phenotype/karyotype correlations of Y chromosome aneuploidy with emphasis on structural aberrations in postnatally diagnosed cases. *Am J Med Genet* 1994; 53: 108-140.
23. Distèche CM, Brown L, Saal H et al. Molecular detection of a translocation (Y;15) in a 45,X male. *Hum Genet* 1986; 74: 372-377.
24. Emery AFH, Rimoin DL. *Principles and Practice of Medical Genetics*. New York: Churchill Livingstone, 1996.
25. Schinzel A, ed. *Catalogue of Unbalanced Chromosome Aberrations in Man*. New York, Berlin: De Gruyter, 1984: 781-784.

Characterization of a heritable partial monosomy 18p by molecular and cytogenetic analysis.

Rigola MA, Plaja A, Mediano C, Miro R, Egozcue J, Fuster C.

Am J Med Genet. 2001 Nov 15;104(1):37-41.....

2.3*

Brief Clinical Report

Characterization of a Heritable Partial Monosomy 18p by Molecular and Cytogenetic Analysis

M.A. Rigola,¹ A. Plaja,² C. Mediano,² R. Miró,¹ J. Egozcue,¹ and C. Fuster^{1*}

¹Unitat de Biologia, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

²Unitat de Genètica, Hospital Materno-Infantil de la Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

This report describes the fourth case of heritable 18p monosomy, which was ascertained by prenatal diagnosis. Cytogenetic analysis of amniotic fluid cells by G-banding showed an apparently distal 18p chromosome deletion and a derivative X chromosome resulting from a translocation between the X and Y chromosomes. Analysis of peripheral blood lymphocytes from the parents by G-banding revealed the same chromosome 18 deletion in the mother, who did not have the X/Y translocation. Comparative genomic hybridization (CGH) studies confirmed the loss of chromosome region 18p11.3-pter previously detected, and eliminated the presence of unbalanced reorganizations of other chromosome regions. No subtle translocation was detected by fluorescence in situ hybridization (FISH) studies using whole chromosome specific painting probes. This is a new report of a heritable 18p monosomy. Although in our case the mother had several minor congenital malformations, the loss of 18p11.3 band was not associated with any obvious phenotypic alteration in the fetus.

© 2001 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: fluorescence in situ hybridization (FISH); comparative genomic hybridization

(CGH); prenatal diagnosis;
heritable 18p monosomy

INTRODUCTION

After the "cri du chat" syndrome, 18p- is probably the second most frequent autosomal deletion syndrome. The 18p- syndrome, described by de Grouchy et al. [1963], is not easily recognizable through clinical features, due to its high phenotypic variability [Schinzel, 1984]. This deletion occurs de novo in about 85% of patients, and in 15% of cases, it results from the segregation of familial rearrangements. Most patients with de novo 18p monosomy involve an unbalanced translocation; only a few cases are described with a pure deletion 18 deleted [Taine et al., 1997; Tonk and Krishma, 1997]. The parental origin of the deleted chromosome has been studied by molecular analysis in only three cases, in which a paternal origin was demonstrated in two patients and a maternal origin in one [Cody et al., 1997; Dellavecchia et al., 1999]. Familial transmission of the del (18p) syndrome is rare and has only been previously reported in three cases, all of them with maternal transmission [Uchida et al., 1965; Velagaleti et al., 1996; Tsukahara et al., 2001].

We describe a new case of heritable 18p monosomy detected by prenatal diagnosis. In this case, the anomaly was a deletion of chromosome 18 at the p11.3 band, without evidence of any other chromosome involvement. The fetus also had the X/Y translocation. At necropsy, no obvious malformations were observed in the fetus.

CLINICAL REPORT

A 26-year-old woman requested a prenatal diagnosis at her 16th week of pregnancy because she had a previous son with mental retardation. Cytogenetic analysis of cultured amniotic fluid cells after Wright's G-banding revealed an abnormal karyotype: 46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;q11), del(18)(p?). The couple decided not to continue the pregnancy. Autopsy did not

Grant sponsor: DGESIC; Grant number: PB98-0891; Grant sponsor: UAB; Grant number: EMER 99-21; Grant sponsor: CIRIT; Grant numbers: 1998,SGR-00061, 1999,SGR-00104.

*Correspondence to: C. Fuster, Unitat de Biologia, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain.

E-mail: carme.fuster@uab.es

Received 12 June 2000; Accepted 14 June 2001

DOI 10.1002/ajmg.1584

reveal any obvious congenital malformations in the fetus.

The woman had borderline mental retardation (WAIS, adult intelligence scale and Rawen tests were below the 5th centile). She weighed 50 kg (below 25th centile), measured 162.5 cm (25th centile), and had an occipitofrontal circumference of 54.5 cm (below 50th centile). She had a normal face with a clinical impression of hypertelorism (interpupillary distance 6.15 cm, above 75th centile), a broad nasal bridge, and normal ears. She had a large mouth (5.4 cm, above the 90th centile). She had no heart defects, strabismus, ptosis, or history of seizures.

MATERIALS AND METHODS

Cytogenetic Analysis

Peripheral blood samples obtained from the parents and their son were cultured for 72 hr in RPMI medium. Metaphase chromosomes were analyzed by the standard Wright's G-banding technique.

Comparative Genomic Hybridization (CGH) Analysis

For CGH, DNA was isolated from blood leukocytes of the patient and of a healthy individual of the same sex. DNA labelling, hybridization, and detection were performed essentially as described by Kallioniemi et al. [1994], and according to the instructions of the supplier (Vysis, Downer Grove, IL). Slides were analyzed using a Cytovision Ultra workstation (Applied Imaging, Sutherland, UK). The software performed a calculation of the patient DNA to normal DNA fluorescent ratios along the length of each chromosome.

Ratio values of CGH above 1.25 and below 0.75 were considered to represent chromosomal gains and losses, respectively.

Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Analysis

In order to confirm the CGH findings, we used FISH with a whole chromosome-18-specific painting probe. Chromosome painting was performed using indirectly-labelled chromosome paints (Cambio, Cambridge, UK) according to the manufacturer's instructions.

RESULTS

Cytogenetic Analysis

In the fetus, cytogenetic analysis of the cultured amniotic fluid cells after Wright's G-banding revealed an abnormal karyotype: 46,X, der(X)t(X;Y)(p22.3;q11), del(18)(p?) (Fig. 1). In the mother, evaluation of G-banded chromosome preparations showed the presence of a non-mosaic, unbalanced 46,XX, del(18)(p11.3) karyotype. The father and a previous child (with obvious psychomotor retardation and epilepsy) had normal karyotypes, but no paternity tests were performed.

FISH and CGH Analyses

To confirm the presence of the chromosome deletion (18)(p11.3) in the woman and detect possible partial trisomies or monosomies involving other chromosome regions in this family, CGH was used. CGH findings in the mother defined only the loss of 18p11.3-pter; other chromosomes from this patient had normal CGH profiles (Fig. 2).

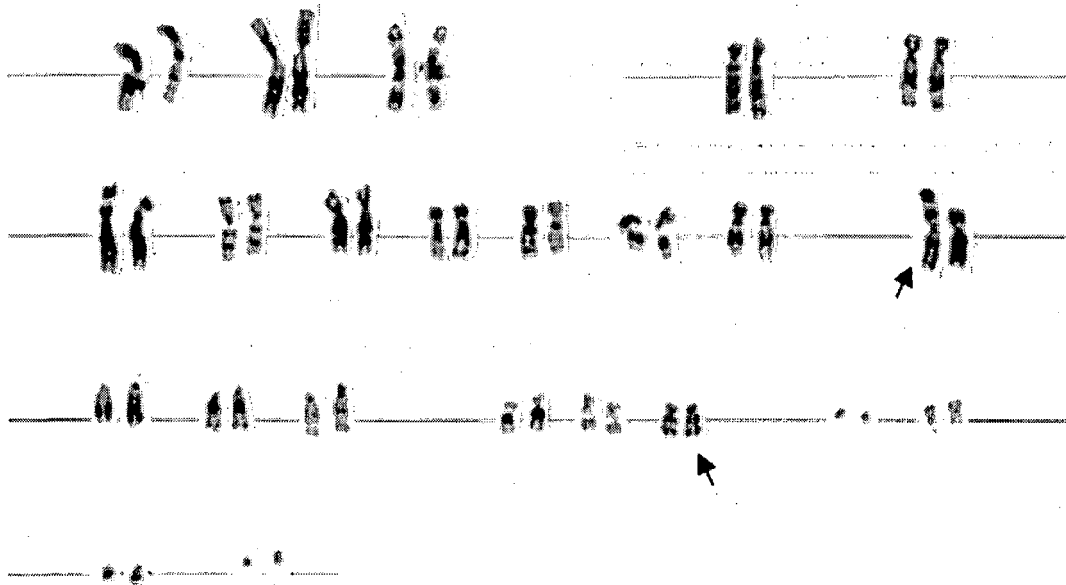


Fig. 1. Unbalanced karyotypes from the fetus showing an apparent distal 18p chromosome deletion and a derivative X chromosome resulting from a chromosome translocation between the X and Y chromosomes.

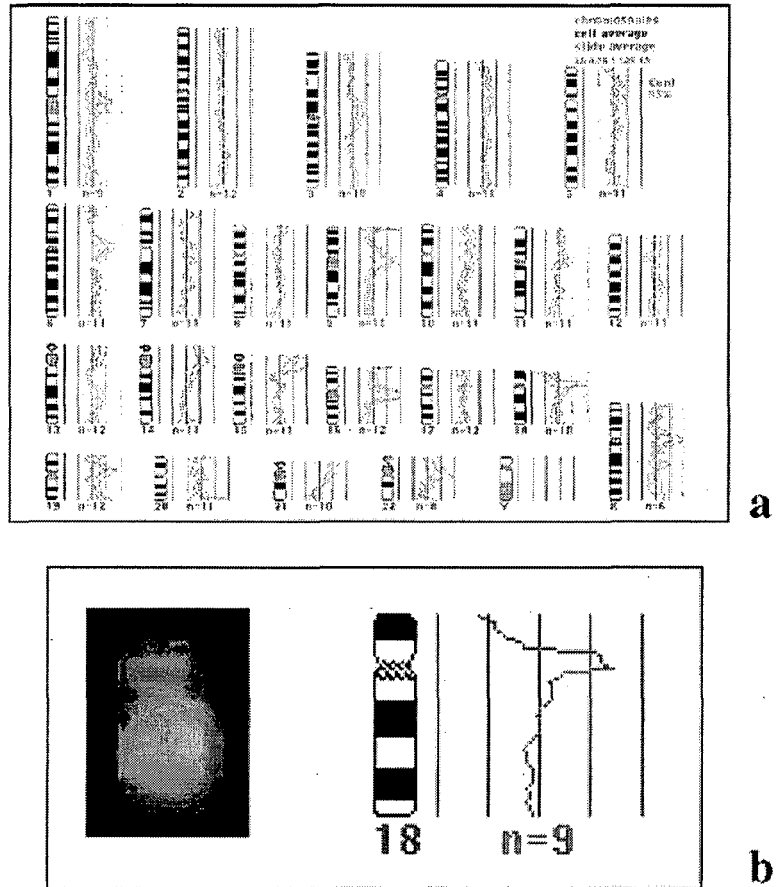


Fig. 2. CGH results from the mother. **a:** Chromosome ideogram with ratio profiles summarizing the results from ten metaphases analyzed. The ratio of fluorescein isothiocyanate/tetraethylrhodamine (FITC/TRIC) fluorescence intensities for each chromosome or chromosomal region reflects the relative copy number in the patient's genome compared with a normal

individual. The lanes placed on the right side of the ideogram indicate the ratios: 0.75 (left) for monosomies, 1 (middle) for disomies, and 1.25 (right) for trisomies. **b:** Profile of the deleted chromosome 18 after CGH showing the loss of material on 18p.

To detect a possible chromosome translocation in amniotic fluid cells and in the mother, we used FISH with whole chromosome painting probes; the results showed a complete hybridization in both the normal and the deleted 18 chromosomes. The absence of chromosome translocations expressed as outlying areas of visible hybridization confirmed the nature of this partial monosomy (Fig. 3).

DISCUSSION

In this report, we describe the fourth case with a familial transmission of an 18p deletion. The cytogenetic results in amniotic fluid cells not only allowed detection of the maternal transmission of this deletion, but also demonstrated the presence of a de novo structural chromosome aberration produced in the paternal germ cells, t(X;Y)(p22.3;q11).

As in previous reports, maternal transmission was observed [Uchida et al., 1965; Velagaleti et al., 1996;

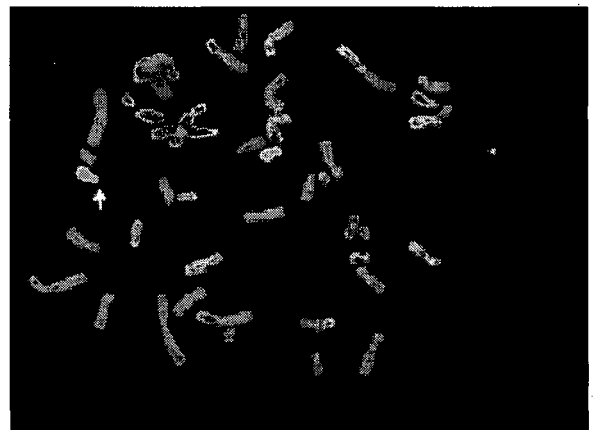


Fig. 3. FISH analysis of a metaphase from the mother using an 18 chromosome-specific library. Arrow points to the deleted chromosome 18.

Tsukahara et al., 2001], although the breakpoint of the deletion was not the same.

Our patient had no history of spontaneous abortions but had a mild mental retardation and several minor congenital anomalies. The clinical characteristics of the three previous cases of inherited partial monosomy described were not comparable because the size of the deleted chromosome segments was different. Uchida et al. [1965] reported the loss of the whole short arm of chromosome 18 in a woman and in her two children. The mother, a mosaic for 18p-, showed mental retardation, short stature, dental caries, and alopecia congenita. Her first child had cebocephaly and died shortly after birth and the second child had a phenotype similar to the mother: mental retardation, short stature, and dental caries but no alopecia. He had, in addition, an eyelid abnormality, i.e., ptosis and epicanthus. Velagaleti et al. [1996] described a nonmosaic, del(18)(p11.2) in a mother and her daughter. The mother had mild mental retardation, short stature, and an ocular abnormality (cataracts and exotropia). Physical finding in the daughter showed a similar phenotype, including mental retardation, short stature, and myopia. Other significant findings were bilateral cubitus valgus and low nuchal hairline with short neck. Tsukahara et al. [2001] described the presence of round face, hypertelorism, broad nasal bridge, high palate, and microcephaly in a woman and her two children with a nonmosaic, del (18)(p11.2). The only common feature observed in the four cases (including this report) is the association of mental retardation with loss of 18p11.3-pter. Recently, Gripp et al. [2000] related the gene coding for the transforming growth-interacting factor *TGIF* with holoprosencephaly. The *TGIF* gene is located in 18p11.3. This suggests that in our case, the mother's mild mental retardation could be due to a deletion of *TGIF*.

None of the cases published in the literature of a familial deletion 18p syndrome, including this report, had a history of spontaneous abortion. These findings support the idea that gametes with 18p- may result in viable offspring; for this reason, genetic counseling is necessary for these patients.

Clinical application of CGH for the characterization of constitutional chromosome unbalances has provided useful information in some cases [Bryndorf et al., 1995; Wang et al., 1995; Kallioniemi, 1996; Erdel et al., 1997; Levy et al., 1997; Olson and Magenis, 1998]. In our case, the subtle deletion of chromosome 18 was confirmed by CGH. This result is in agreement with the studies published by Nacheva et al. [1998] and Daniely et al. [1998, 1999] who demonstrated that CGH could detect a wide range of quantitative genetic alterations, including duplications or deletions of single chromosome bands. Moreover, some constitutional chromosome deletions were confirmed or identified after cytogenetic analyses using CGH in fetal and neonatal patients [Yu et al., 1997; Lapierre et al., 1998, 2000].

In our case, no translocations affecting chromosome 18 were detected using FISH analysis with a painting probe for chromosome 18. This is the fourth case in the

literature of an inherited 18p monosomy not associated with the presence of an unbalanced translocation. It also shows that the use of molecular (FISH and CGH) techniques in clinical cytogenetic laboratories can contribute to genetic counseling and to the identification or confirmation of chromosome regions implicated in particular congenital malformations.

The lack of correlation between the loss of the 18p11.3 chromosome band and any obvious congenital malformations in the fetus, and the presence of only nonspecific minor congenital malformations in the mother other than the mild mental retardation, suggests that the external phenotype is subtle.

REFERENCES

- Bryndorf T, Kirchoff M, Rose H, Maahr J, Gerdes T, Karhu R, Kallioniemi A, Christensen B, Lundsteen C, Philip J. 1995. Comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. *Am J Hum Genet* 57:1211-1220.
- Cody JD, Pierce JF, Brkanac Z, Plaetke R, Ghidoni PD, Kaye CJ, Leach RJ. 1997. Preferential loss of the paternal alleles in the 18q- syndrome. *Am J Med Genet* 69:280-286.
- Daniely M, Aviram-Goldring A, Barkai G, Goldman B. 1998. Deletion of chromosomal aberration in fetuses arising from recurrent spontaneous abortion by comparative genomic hybridization. *Hum Reprod* 13:805-809.
- Daniely M, Barkai G, Goldman B, Aviram-Goldring A. 1999. Structural unbalanced chromosome rearrangements resolved by comparative genomic hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 86:51-55.
- de Grouchy J, Lamy M, Theffry S, Arthuis M, Salmon C. 1963. Dysmorphic complexe avec oligophrenie: deletion des bras courts d'un chromosome 18. *C R Acad Sci III* 256:1028-1029.
- Dellavecchia C, Guala A, Olivieri C, Haintink O, Cadario F, Luinetti O, Fiocca R, Minelli A, Danesino C, Bona G. 1999. Early onset of gastric carcinoma and constitutional deletion of 18p. *Cancer Genet Cytogenet* 113:96-99.
- Erdel M, Duba HC, Verdorfer I, Lingenhel A, Geiger R, Guttenberger KH, Ludescher E, Utermann B, Utermann G. 1997. Comparative genomic hybridization reveals a partial de novo trisomy 6q23-qter in an infant with congenital malformations: delineation of the phenotype. *Hum Genet* 99:596-601.
- Gripp KW, Wotton D, Edwards MC, Roessler E, Ades L, Meitnecke P, Richieri-Costa A, Zackai EH, Massague J, Muenke M, Elledge SJ. 2000. Mutations in *TGIF* cause holoprosencephaly and link *NODAL* signaling to human neural axis determination. *Nat Genet* 25:205-208.
- Kallioniemi OP. 1996. Comparative genomic hybridization gaining in popularity. *Trends Genet* 12:237-238.
- 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* 10:231-243.
- Lapierre JM, Cacheux V, Collot N, Da Silva F, Hervy N, Rivet D, Romana S, Wiss J, Benzaken B, Aurias A, Tachdjian G. 1998. Comparison of comparative genomic hybridization with conventional karyotype and classical fluorescence in situ hybridization for prenatal and postnatal diagnosis of unbalanced chromosome abnormalities. *Ann Genet* 41:133-140.
- Lapierre JM, Cacheux V, Luton D, Collot N, Oury JF, Aurias A, Tachdjian G. 2000. Analysis of uncultured amniocytes by comparative genomic hybridization: a prospective prenatal study. *Prenat Diagn* 20:123-131.
- Levy B, Gershin IF, Desnick RJ, Babu A, Gelb BD, Hirschhorn K, Cotter PD. 1997. Characterization of a de novo unbalanced chromosome rearrangement by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 76:68-71.
- Nacheva EP, Grace CD, Bittner M, Ledbetter DH, Jenkis RB, Green AR. 1998. Comparative genomic hybridization: a comparison with molecular and cytogenetic analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 100:93-105.
- Olson SB, Magenis RE. 1998. Preferential paternal origin of de novo structural chromosome rearrangements. In: Daniel A, editor. *The cytogenetics of mammalian autosomal rearrangements*. New York: Alan R. Liss, Inc. p 583-599.

- Schinzel A. 1984. 18p- syndrome. In: Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man. Berlin: Walter de Gruyter & Co. p 604-607.
- Taine L, Goizet C, Wen ZQ, Chateil JF, Battin J, Saura R, Lacombe D. 1997. 18p monosomy with midline defects and a de novo satellite identified by FISH. *Ann Genet* 40:158-163.
- Tonk V, Krishma J. 1997. De novo inherited 18p deletion in a mother-fetus pair with extremely variable expression, confirmed by fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 73:193-196.
- Tsukahara M, Imaizumi K, Fugita K, Tateishi H, Uchida M. 2001. Familial del(18p) syndrome. *Am J Med Genet* 99:67-69.
- Uchida IA, Mc Rae KN, Wang HC, Ray M. 1965. Familial short arm deficiency of chromosome 18 concomitant with arrhinencephaly and alopecia congenita. *Am J Hum Genet* 17:410-419.
- Velagaleti GV, Harris S, Carpenter NJ, Coldwell J, Say B. 1996. Familial deletion of chromosome 18 (p11.2). *Ann Genet* 39:201-204.
- Wang BBT, Yu LC, Peng W, Falk RE, Williams J. 1995. Prenatal identification of i(Yp) by molecular cytogenetic analysis. *Prenat Diagn* 15:1115-1119.
- Yu LC, Moore DH, Magrane G, Gronin J, Pinkel D, Lebo RV, Gray JW. 1997. Objective aneuploidy detection for fetal and neonatal screening using comparative genomic hybridization (CGH). *Cytometry* 28:191-197.

A comparative genomic hybridization study in a 46,XX male.

Rigola MA, Carrera M, Ribas I, Egozcue J, Miro R, Fuster C.

Fertil Steril. 2002 Jul;78(1):186-8.....

3.2*

A comparative genomic hybridization study in a 46,XX male

M. Angels Rigola, M.S.,^a Marta Carrera, M.S.,^b Isabel Ribas, M.S.,^b
Josep Egozcue, M.D.,^a Rosa Miró, Ph.D.,^a and Carme Fuster, Ph.D.^a

Universitat Autònoma de Barcelona and Centro de Patología Celular y Diagnóstico Prenatal, Barcelona, Spain

Objective: To identify Y chromosome material in an azoospermic male with an XX karyotype.

Design: Case report.

Setting: Faculty of medicine and Centro de Patología Celular (CPC) medical center.

Patient(s): A 33-year-old man with infertility.

Intervention(s): G-banding, fluorescence in situ hybridization (FISH), polymerase chain reaction (PCR), and comparative genomic hybridization (CGH).

Main Outcome Measure(s): FISH for X and Y chromosomes, PCR for the SRY gene and amelogenin gene in the Xp (AMGX) and (AMGY), and losses or gains with CGH.

Result(s): FISH analysis using X and Y chromosome-specific probes showed an X chromosome containing Y chromosome sequences on the top of the short arm; this Y chromosome region was not visible by conventional cytogenetic analysis. PCR amplification of DNA showed the presence of the sex-determining region of the Y chromosome (SRY) and the amelogenin gene in the pseudoautosomal boundary of the X chromosome (AMGX). CGH confirmed the presence of the chromosome region Yp11.2-pter and detected the presence of the two otherwise normal X chromosomes.

Conclusion(s): The two Xpter (XPARI) pseudoautosomal regions present in this XX male suggest the need to reevaluate XX males using CGH and PCR to characterize the clinical variability in XX males due to genes other than those located on the Y chromosome. (Fertil Steril® 2002;78:186–8. ©2002 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: XX males, FISH, PCR, CGH

The human X and Y chromosomes are known to pair during meiosis. This occurs in the distal short arms of the X and Y because of a sharing of bases in the pseudoautosomal region (PAR1), which consists of some 3,000 kb of DNA in each chromosome (1). Homology of the PAR1 in the X and Y chromosomes results in regular crossing-over during spermatogenesis. Most XX males originate from an abnormal X-Y interchange (2), with transfer of the SRY gene (for sex-determining region Y) from distal Yp near the YPAR1 to distal Xp (XPARI) during meiosis in the father (3).

Recent research has shown that comparative genomic hybridization (CGH) can be successfully used in clinical diagnosis to identify gains or losses in unbalanced chromosome alterations (4–9).

We describe the combined use of fluorescence in situ hybridization (FISH), polymerase

chain reaction (PCR), and CGH for the identification of Y chromosome material in an azoospermic male with an XX karyotype. To our knowledge, this is the first use of the CGH method to identify the small unbalanced chromosome rearrangement implicated in an XX male.

CASE REPORT

The 46,XX karyotype was found during examination of the patient to find the cause of infertility. The patient was a 33-year-old man with a normal phenotype; genitalia and testes were normal and no gynecomastia was found. There was no evidence of mental retardation. Sperm analysis showed azoospermia. Familial cytogenetic investigations have not yet been possible.

Received November 21, 2001; revised and accepted February 21, 2002.

Supported by DGICYT PB98-0891 (Direcció General de Investigació-Ministerio de Ciencia y Tecnología) and CIRIT (Comissionat per a Universitats i Recerca-Generalitat de Catalunya) 1998, SGR-00061 and 1999, and SGR-00104.

Reprint requests: Carme Fuster, Ph.D., Unitat de Biologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193, Bellaterra, Barcelona, Spain (FAX: 34-93-5811025; E-mail: carme.fuster@uab.es).

^a Unitat de Biologia, Departament de Biologia Celular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona.

^b Centro de Patología Celular y Diagnóstico Prenatal (CPC).

0015-0282/02/\$22.00
PII S0015-0282(02)03165-5

MATERIAL AND METHODS

Cytogenetic and FISH Analyses

A peripheral blood sample from this patient was cultured for 72 hours in RPMI-1640 medium. Metaphase chromosomes were analyzed by the standard Wright-G-banding technique. FISH was performed with multipainting probes (Kit Chromoprobe-M Multiprobe, CytoCell Ltd., UK). Hybridization to metaphase spreads was performed according to the manufacturer's instructions.

PCR and CGH Analyses

The patient's DNA was extracted from a blood sample according to standard procedure. PCR analyses for the SRY-gene and amelogenin gene in the Xp (AMGX) and Yp (AMGY) pseudoautosomal boundary were performed using primers and conditions as described elsewhere (10). After amplification, the fluorescent PCR products were mixed with a reference molecular standard (GeneScan-500 TAMRA; Applied Biosystems, Foster City, CA) and electrophoresis was performed with an automated DNA sequencer (ABI 310 Genetic Analyser; Applied Biosystems).

CGH was carried out to identify the origin of a small, excess chromosomal segment on the Y chromosome. For CGH, the red-labeled patient DNA and the green-labeled control reference DNA were hybridized on normal male metaphases following the manufacturer's instructions (Vysis, Downers Grove, IL) and standard nick translation was performed using a commercial kit. The 1:1 probe mixture (500 ng) was hybridized in combination with unlabeled human Cot-1 DNA on normal male metaphase spreads.

Slides were analyzed using a Cytovision Ultra Workstation (Applied Imaging, Sunderland, UK). The software performed a calculation of the patient DNA to normal DNA fluorescent ratios along the length of each chromosome. Ratio values of CGH above 1.25 and below 0.75 were considered to represent chromosomal gains and losses, respectively.

RESULTS

Evaluation of G-banded chromosome preparations from phytohaemagglutinin-stimulated lymphocytes of the patient revealed a 46,XX karyotype. Cytogenetic studies confirmed a nonmosaic karyotype in all metaphases analyzed.

FISH analysis using multipainting probes showed an X chromosome containing Y chromosome sequences on the top of the short arm; this Y chromosome region is not visible by conventional cytogenetic analysis. PCR analysis detected the presence of the X-derived sequence of the AMGX gene and the sequence of the Y chromosome SRY gene but not the AMGY gene.

When CGH was carried out using normal male reference DNA (46,XY), we detected the loss of the Yp11.2-qter region and the gain of an entire X chromosome (Fig. 1A).

When CGH was performed with normal female reference DNA (46,XX), we identified the gain of region Yp11.2-pter and otherwise, normal profiles were observed for the entire X chromosome (Fig. 1B). In two experiments, normal profiles were also found for the autosomes.

Based on the FISH, PCR, and CGH data, the patient's karyotype was defined as 46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.2).

DISCUSSION

Identification of the chromosomal material in unbalanced translocation is important for the determination of the genes implicated in the pathology. It has been demonstrated that CGH is a powerful technique to identify the gain and loss of chromosomal material (5–9).

The 46,XX male condition is genetically heterogeneous, and the phenotype does not always correlate with the presence or absence of Y sequences (11–15). Our purpose was to determine whether CGH could identify the small excess of Y chromosome material on the X chromosome.

The results, using male and female controls, allowed for the identification of Y chromosome material in this 46,XX male as Yp11.2-pter and detected the presence of the two normal X chromosomes. According to Tateno et al. (16), azoospermia in this individual could be caused by the deletion of Yq involving the DAZ gene.

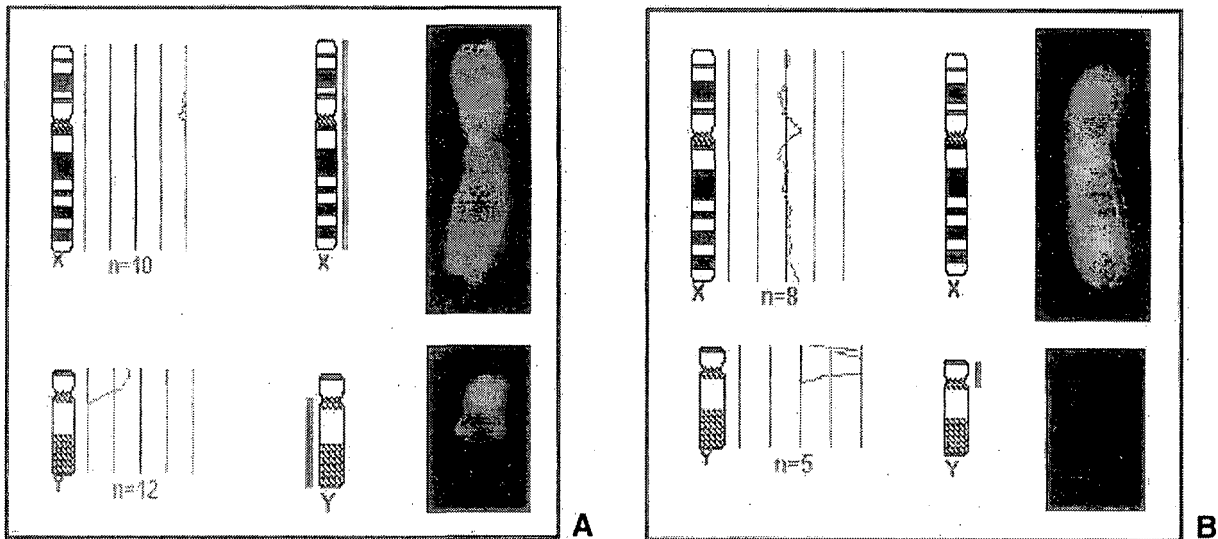
In the two different CGH assays using normal male or female controls, we did not detect any loss of chromosomal material on Xpter, corresponding to XPAR1. This could be explained by the small size of the regions putatively lost (<5 Mb) or by the implication of telomeric regions, because the two most important limitations of the use of CGH are the identification of deletions smaller than 5–10 Mb and the implication of telomeric, pericentromeric, and heterochromatic regions. However, in recent years the greater use of CGH for the identification of constitutional chromosome alterations has shown its usefulness in the detection of losses or gains of telomeric regions.

Taking into account the resolution observed, CGH clinical reports, and the most frequent origin of the XX condition in males (17–19), the presence of two XPAR1's (i.e., the conservation of the pseudoautosomal region in Xpter) observed by CGH in our 46,XX male could also be explained by an unbalanced translocation between terminals XPAR1 and Yp11.2 that produced the derivative der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.2) during spermatogenesis in the father.

Our findings suggest the need to reevaluate 46,XX males using CGH and PCR to evaluate the complete presence of one or two PARX1 regions in these individuals and to correlate it with possible phenotypic differences. Our results corroborate that the XX male condition may result from the presence of Xp segments of different lengths in der(X)t(X;Y), as previously suggested by other authors (2, 20, 21). Molec-

FIGURE 1

Profiles and chromosomes obtained by CGH: (A), When a normal male reference DNA was used, the profiles showed the loss of Yp11.2-ter and the gain of the entire X. (B), When a normal female reference DNA was used, the profiles showed the gain of Yp11.2-pter and normal profiles for the entire X. The lines from left to right on the CGH profiles represent fluorescence ratio values of 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, and 1.5. The vertical green lines on the right of the chromosome ideograms indicate gains, while the red lines on the left indicate losses of the corresponding chromosomal regions.



Rigola. CGH study in a 46,XX male. *Fertil Steril* 2002.

ular studies may allow a better characterization of the clinical variability in XX males due to genes other than those located in the Y chromosome.

References

- Ellis N, Goodfellow PN. The mammalian pseudoautosomal region. *Trends Genet* 1989;5:406-10.
- Ferguson-Smith MA. Karyotype-phenotype correlations in gonadal dysgenesis and their bearing on the pathogenesis of malformations. *J Med Genet* 1965;2:142-55.
- Sinclair AH, Bertra P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, et al. A gene for the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 1990;346:240-4.
- Bryndorf T, Kirchchhoff M, Rose H, Maahr J, Gerdes T, Karhu R, et al. Comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. *Am J Hum Genet* 1995;57:1211-20.
- Yu LC, Moore DH II, Magrane G, Gronin J, Pinkel D, Lebo RV, et al. Objective aneuploidy detection for fetal and neonatal screening using comparative genomic hybridization. *Cytometry* 1997;28(3):191-7.
- Lapierre JM, Cacheux V, Collot N, Da Silva F, Hervy N, Rivet D, et al. Comparison of comparative genomic hybridization with conventional karyotype and classical fluorescence in situ hybridization for prenatal and postnatal diagnosis of unbalanced chromosome abnormalities. *Ann Genet* 1998;41:133-40.
- Daniely M, Barkai G, Godman B, Avidam-Goldring A. Structural unbalanced chromosome rearrangements resolved by comparative genomic hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1999;86:51-5.
- Breen CJ, Barton L, Carey A, Dunlop A, Glancy M, Hall K, et al. Applications of comparative genomic hybridization in constitutional chromosome studies. *J Med Genet* 1999;36:511-7.
- Rigola MA, Carrera M, Ribas I, De la Iglesia C, Mendez B, Egozcue J, et al. Identification of two de novo partial trisomies by comparative genomic hybridization. *Clin Genet* 2001;59:106-10.
- Cirigliano V, Sherlock J, Conway G, Quilter C, Rodeck C, Adinolfi M. Rapid detection of chromosomes X and Y aneuploidies by quantitative fluorescent PCR. *Prenat Diagn* 1999;19:1099-103.
- Numabe H, Nagafuchi S, Nakahori Y, Tamura T, Kiuchi H, Namiki M, et al. DNA analyses of XX and XX-hypospadiac males 1992;90:211-4.
- Lopez M, Torres L, Mendez JP, Cervantes A, Perez-Palacios G, Erickson RP, et al. Clinical traits and molecular findings in 46,XX males. *Clin Genet* 1995;1:29-34.
- Mittwoch U. Sex determination and sex reversal: genotype, phenotype, dogma and semantics. *Hum Genet* 1992;89:467-79.
- Ploch E, Vlasak I, Rittinger O, Bergendi E, Stopar M, Kurnik P, et al. Clinical, cytogenetic and molecular analysis of three 46,XX. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1999;12:389-95.
- Kusz K, Kotecki M, Wojda A, Szarras-Czapnik M, Latos-Bielenska A, Warenik-Szymankiewicz A, et al. Incomplete masculinisation of XX subjects carrying the SRY gene on inactive X chromosome. *J Med Genet* 1999;36:452-6.
- Tateno T, Sasagawa I, Ashida J, Nakada T. Deletion of Y chromosome involving the DAZ (deleted in azoospermia) gene in XX males. *Arch Androl* 1999;42:179-83.
- Weil D, Wang I, Dietrich A, Poustka A, Wessenbach J, Petit C. Highly homologous loci on the X and Y chromosomes are hot-spots for ectopic recombinations leading to XX maleness. *Nat Genet* 1994;7:4514-9.
- Schiebel K, Winkelmann M, Mertz A, Xu X, Page DC, Weil D, et al. Abnormal XY interchange between a novel isolated protein kinase gene, PRKY, and its homologue, PRKX, accounts for one third of all (Y+)XX males and (Y-)XY females. *Hum Mol Genet* 1997;6:1985-9.
- Suzuki Y, Sasagawa I, Yazawa H, Tateno T, Nakada T, Saito H, et al. Localization of the sex-determining region—Y gene in XX males. *Arch Androl* 2000;44:133-6.
- Madan K, Walker S. Possible evidence for Xp+ in an XX male. *Lancet* 1974;1:1223.
- Evans H, Buckton KE, Spowart G, Carothers AD. Heteromorphic X chromosomes in XX males: evidence for the involvement of X-Y interchange. *Hum Genet* 1979;49:11-31.

Comparative genomic hybridization analysis of transitional cell carcinomas of the renal pelvis.

Rigola MA, Fuster C, Casadevall C, Bernues M, Caballin MR, Gelabert A, Egozcue J, Miro R.

Cancer Genet Cytogenet. 2001 May;127(1):59-63.....

1.7*

Comparative genomic hybridization analysis of transitional cell carcinomas of the renal pelvis

María Angels Rigola^a, Carme Fuster^a, Carme Casadevall^b, Marta Bernués^b,
María Rosa Caballín^b, Antoni Gelabert^c, José Egozcue^a, Rosa Miró^{a,b,*}

^aDepartament de Biologia Cel·lular, Fisiologia, Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra E-08193, Spain

^bInstitut de Biologia Fonamental, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra E-08193, Spain

^cServei d'Urologia, Hospital de Nostra Sra. del Mar, Barcelona, Spain

Received 1 August 2000; accepted 20 October 2000

Abstract

We used comparative genomic hybridization to analyze 10 primary tumor samples from patients with transitional cell carcinoma of the renal pelvis. The most frequent loss was located at 9q, that is, in 50% of the tumors. Gains of DNA sequences were most frequently observed in chromosome regions 1q21~q23, 2p23~p25, 8q21.1~q22 and in the whole chromosome 20. High level amplifications at 1q21~q25, 6p22~p23, 8q21~q22, 8q22~q24.1, 11q13, and 12q14~q21 were detected. Most of these regions have previously been reported to be involved in transitional cell carcinoma of the bladder, thus confirming the importance of an increasing number of chromosome imbalances in the development and progression of this type of tumors. © 2001 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Carcinomas of the renal pelvis are quite rare and account for only 5% of renal tumors. Most of them are transitional cell carcinomas (TCCs) and the general morphologic features, etiology, and biological behavior of these tumors are similar to those of TCCs of the bladder [1].

Tumors of the renal pelvis tend to be multicentric, and their simultaneous occurrence in the ureter or the bladder is common. Follow-up data have revealed that survival is lower among patients in whom the carcinoma also affects the bladder.

Cytogenetic studies of 25 renal pelvis TCCs [2–7], concluded that the karyotypes did not seem to differ from those found in the more frequent bladder TCCs. The cytogenetic changes involved chromosomes 1, 3, 5, and 14. Other common changes were trisomies 7 and 20, monosomy 9, and the loss of the Y chromosome.

Allelic loss analysis [8] did not show any statistical differences between cancers of the ureter and renal pelvis and those of the bladder. Loss of heterozygosity was frequent at 9q, 11p, 17p, 13q, and 3p.

Comparative genomic hybridization (CGH) allows the screening of whole tumor genomes for DNA sequence copy number changes, and has been successfully used for the cytogenetic characterization of bladder TCCs [9–16].

In the present study, comparative genomic hybridization (CGH) was used for a comprehensive screening of chromosomal imbalances in 10 primary transitional cell carcinomas of the renal pelvis.

2. Materials and methods

2.1. Patients and samples

Primary tumor specimens from 10 patients were included in this study. None of the patients had received prior X-ray or chemotherapy. Clinical and pathological data from the patients are included in Table 1. All tumors except case 2 (mixed solid-papillary) had a papillary growth pattern. One tumor (case 3) was classified as transitional cell carcinoma with focal squamous-cell differentiation.

Tumor samples were obtained at surgery. The specimens were frozen immediately after surgical removal and stored at -80°C until analysis. Portions of each specimen were examined by a pathologist to confirm the presence of the tumor, evaluation of tissue morphology, and staging. All spec-

* Corresponding author. Tel.: 34-3-581-1379; fax: 34-3-581-2011.

E-mail address: rosamiro@uab.es and mariaangels.rigola@uab.es (M.A. Rigola).

Table 1
Patient data and tumor characteristics

Case	Sex/Age	Stage/Grade	Evolution (months)	Survival (months)
1	M/68	pT3/GIII	—	<3,CRD
2	F/66	pT3/GIII	Met. liver at diagnosis(6)	<7,CRD
3	M/63	pT3/GII	Rec. P; pT3/GII (24)	>30
4	F/64	pTa/GIII	Rec. B; pT1/GII (24)	>24
5	M/80	pTa/GII	—	>45
6	M/74	pTa/GI	Rec. P; pT1/GIII (18)	>26
7	M/74	pT1/GII	Rec. P; pT3/GIII (8) Met. bone & liver	<9,CRD
8	M/76	pT3/GIII	—	>34
9	M/89	pTa/GIII	—	>35
10	M/75	pT1/GII	Rec. B; pT1/GII (15)	>15

Abbreviations: Rec, Recurrence; P, renal pelvis; B, bladder; Met, metastasis; CRD, cancer related death.

imens were graded according to the WHO classification [17] and staged according to the TNM system [18].

2.2. DNA extraction

High-molecular-weight DNAs were extracted from tumor and leukocyte samples according to a method described elsewhere [19], with minor modifications. Briefly, frozen tumor tissue was powdered in chilled liquid nitrogen and homogenized in 100 mM NaCl, 10 mM Tris HCl, 25 mM EDTA, and 0.5% SDS, pH 8.

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

2.3. CGH Analysis

CGH analysis was performed according to the method described by Beà et al. [20]. Normal and tumor DNA were labelled with SpectrumRed-dUTP and SpectrumGreen-dUTP by nick translation using a commercial kit (Vysis, Downers Grove, IL). Subsequently, equal amounts of normal and tumor-labelled probes (500 ng) and 10 µg of Cot-1 DNA were coprecipitated 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, Downers Grove, IL) were denatured for 5 minutes at 74°C and hybridized 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.

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 to 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 above 1.25 and below 0.75 were consid-

ered 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-labelled 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.

3. Results

The CGH findings of all 10 tumors examined in this study are shown in Fig. 1. On average, there were 5.9 alterations per tumor (range 0–12). Deletions (mean 2.9; range 0–6) were more frequent than gains (mean 2; range 0–7). Two tumors (cases 1 and 5) had no chromosome imbalances and one (case 3) had a 1q25~q44 gain as the sole abnormality. Loss of chromosome arm 8p accompanying a gain of 8q was observed in one case, and it probably represents an isochromosome 8q. An isochromosome 2p was detected in the same tumor (case 6).

Loss of chromosome arm 9q was detected in 50% of the tumors analyzed. Minimal loss was defined at 9q22~q32 (case 8). Other deletions detected in at least two cases were at 2p, 8p (consensus region 8p21~p22), 11p (consensus region 11p14~p15), 13q, 14q, 17p12~p13, 18q12.2~q21, and Xq.

Gain of chromosomal material was seen on 1q, 2p, 3p24~p25, 3q25~q29, 6p, 8q21~q22, 9p23~p24, 17q, and 20.

High-level amplifications (mean 1; range 0–3) were observed at 1q21~q25, 2p23~p25, 6p22~p23, 8q21~q22, 8q22~q24.1, 11q13, 12q14~q21, and 12q23~q24. Most of these amplification sites were at loci that also had frequent, circumscribed, low-level gains.

Minimal regions of gains and losses detected in case 2 and a GIII pT3 tumor with metastasis at diagnosis contributed to delineate consensus regions of gains on 3p24~p25, 6p22~p23, and 8q21~q22 and of losses on 8p21~p22.

Although the number of cases studied was limited and the tumors were of mixed grade and stage, genetic instability, calculated as no. aberrations/no. tumors, was maintained in all

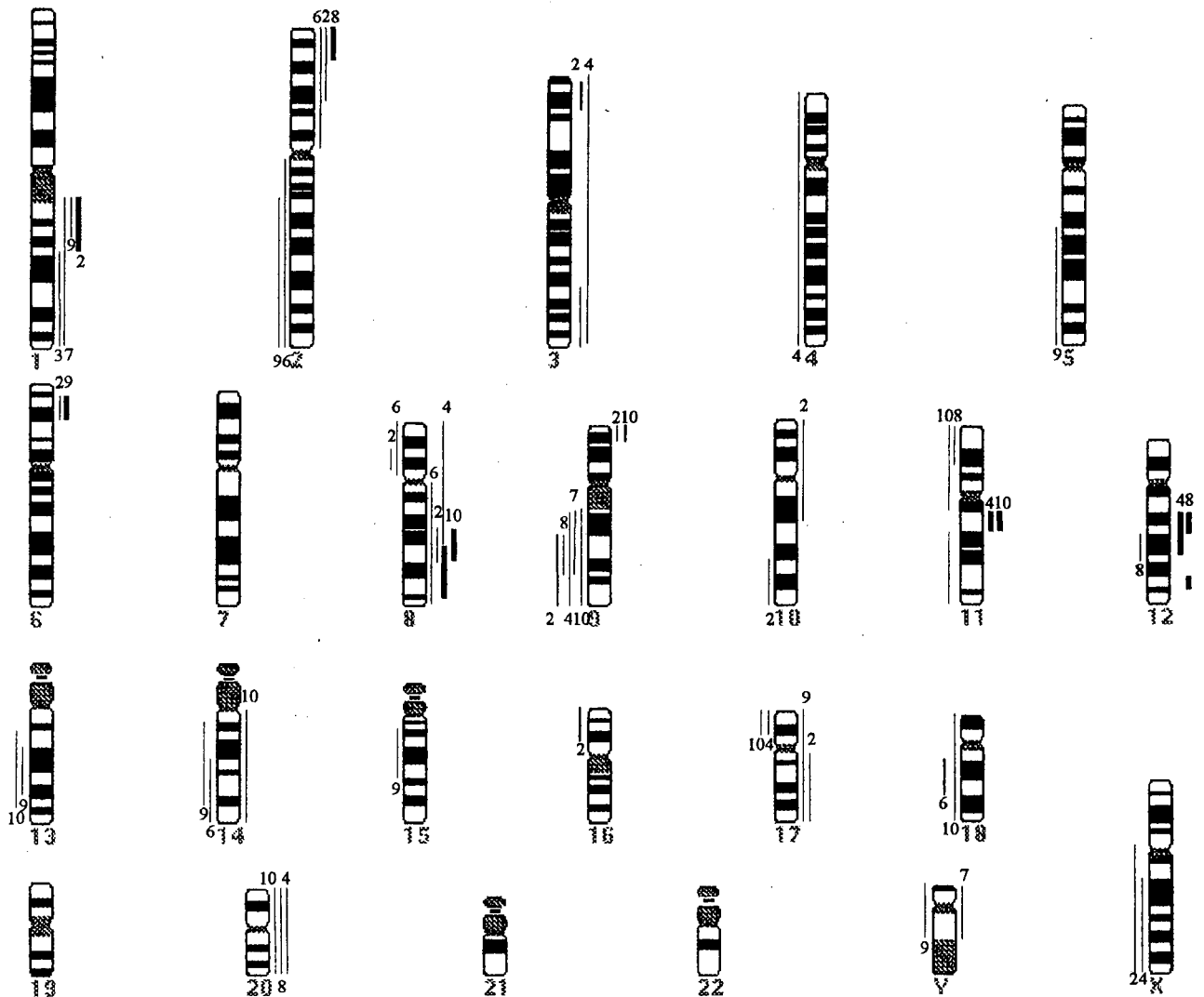


Fig. 1. Summary of all relative DNA sequence copy number changes detected by CGH in 10 TCCs of the renal pelvis. The vertical lines on the right side of the chromosome indicate gains; the lines on the left, losses of the corresponding chromosomal regions. The case number is indicated above or below each line. Amplifications are indicated as solid bars. Chromosomes 1p, 16p, 19, and 22 were not analyzed.

stages (6.5, 6.5, and 5 for pta, pt1, and pt3 tumors, respectively). Independently of stage, there were more alterations in grade III than in grade II carcinomas (7.8 in grade III versus 2.7 in grade II). Grade III pTa carcinomas had 10 aberrations per tumor; this number was even higher than the one observed in grade III pT3 carcinomas (6.3 aberrations per tumor).

In more advanced stages, gains predominated over deletions. The ratio gains:losses in pT3 tumors was 10:7, whereas in pTa and pT1 tumors they were 2:3.5 and 1.5:4, respectively.

4. Discussion

To our knowledge, this is the first genome screening of losses and gains of DNA sequences in TCC of the renal pelvis by CGH. Our results indicate that TCC of the renal pelvis are genetically complex; about 80% of tumors showed

one or more DNA sequence copy number aberrations (range 3–12), indicating the presence of clonal genetic changes.

In spite of the relatively low number of cases analyzed, a clear non-random distribution of gains and losses can be observed in Figure 1.

The most frequently observed aberration was the loss of 9q, which was found in five of the 10 cases (50%). The predominance of 9q losses in all stages and grades argues for a decisive role of a disturbed function of one or several genes on chromosome 9 for initiation of papillary transitional cell carcinomas. 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 9p22p23 and 9p11p13 on the p arm and within 9q12~q13, 9q21~q22, and 9q34 on the q arm [21].

Gains (including high-level amplifications) most frequently involved four different chromosome regions: 8q21.2~q22 (40% of the tumors), 1q21~q23, 2p23~p25, and 20 (30% each). The remaining gains and losses mentioned in the results section were observed in 20% of cases. Cytogenetic analysis of renal pelvis TCCs [2–7] had previously revealed the occurrence of structural aberrations involving gains on 1q and deletions on 5q, 1p, 14q, and 8p. Trisomies for chromosomes 7 and 20 were also frequent, as well as losses of chromosomes 9 and Y.

Overall, our CGH results confirmed those obtained by conventional cytogenetics, and revealed a more extensive number of chromosome anomalies involved, including high-level amplifications at eight chromosome sites. In previous studies, some discrepancies with respect to gains of chromosome 7 have been observed that were not observed in the present study. Another remarkable difference concerns the high frequency (12/19) of tumors with normal karyotypes described in the largest series of renal pelvis TCCs studied by conventional cytogenetics [7]. The results seem to be in contradiction with those obtained in the present study. Perhaps conventional cytogenetic analyses do not provide enough information about the chromosome imbalances present in these tumors, or the metaphases karyotyped did not correspond to the main cell populations of the tumors. However, taking into consideration the data obtained by Dutrillaux [22] in colon cancers, it can be suggested that renal pelvis carcinomas, as well as other types of solid tumors, could present at least three patterns of chromosomal behavior: one characterized by gross aneuploidy and multiple structural chromosome changes, another with no chromosome abnormalities, and a third characterized by a limited number of numerical chromosome abnormalities, such as trisomies for chromosomes 7 and 20 and the loss of the Y chromosome.

In two of the 10 tumors of the present study (cases 1 and 5), no chromosome anomalies were detected by CGH, indicating that 1) genetic aberrations, if any, might have been beyond the detection limit of the CGH or 2) only a minority of the cells carried specific chromosomal changes, which again could result in normal CGH profiles. A karyotype analysis of one of these tumors (case 1) was carried out in our laboratory. A normal karyotype, 46,XY, was observed in 11 metaphases; the remaining cells were heterogeneous, with a composite karyotype: 25–41,X,-Y[7],del(6)(q23)[2],+7[6],-14[4],-19[3][cp17]. These results indicate that the existence of clonal chromosome abnormalities present in a minority cell population can only be detected by cytogenetic analysis. This intratumor karyotype variability may also have a central role in tumor development and progression.

To determine if TCCs of the renal pelvis and bladder shared the same chromosome imbalances, we compared our results with those obtained in bladder tumors of the papillary type [11–16]. Our comparison revealed a close concordance with respect to losses at 2q, 8p, 9q, 11p, 13q, 17p, and 18q and gains at 1q, 6p, 8q, and 17q.

We can conclude that most of the genetic changes detected in the present study have been reported previously in bladder cancer, confirming that these tumors have a common biological behavior and similar genetic abnormalities.

Acknowledgments

Financial support by CICYT (SAF 96-0177) and CIRIT (1998, SGR-00061; 1999, SGR-00104).

References

- [1] Kvist E, Lauritzen AF, Bredeben J, Luke M, Sjolín KE. A comparative study of transitional cell tumors of the bladder and upper urinary tract. *Cancer* 1988;61:2109–12.
- [2] Hecht F, Berger CS, Sandberg AA. Nonreciprocal chromosome translocation t(5;14) in cancers of the kidney: adenocarcinoma of the renal parenchyma and transitional cell carcinoma of the kidney pelvis. *Cancer Genet Cytogenet* 1985;14:197–200.
- [3] Berger CS, Sandberg AA, Todd IAD, Pennington R, Haddad F, Hecht B, Hecht F. Chromosomes in kidney, ureter, and bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 1986;23:1–24.
- [4] Norderson I, Ljungberg B, Roos R. Chromosomes in renal carcinoma with reference to intratumor heterogeneity. *Cancer Genet Cytogenet* 1988;32:35–41.
- [5] Vanni R, Nieddu M, Scarpa R, Migliari R, Usai E. Trisomy 7 in a case of transitional cell carcinoma of the kidney. *Cancer Genet Cytogenet* 1989;41:149–51.
- [6] Fadl-Elmula I, Gorunova L, Mandahl N, Elfving P, Lundgren R, Rademark C, Hcim S. Cytogenetic analysis of upper urinary tract transitional cell carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;115:123–7.
- [7] Dal Cin P, Roskams T, Van Poppel H, Balzarini P, Van den Berghe H. Cytogenetic investigation of transitional cell carcinomas of the upper urinary tract. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;114:117–20.
- [8] Habuchi T, Ogawa K, Koshiha M, Hamazaki S, Takahashi R, Sugiyama T, Yoshida O. Accumulated allelic losses in the development of invasive urothelial cancer. *Int J Cancer* 1993;53:579–84.
- [9] Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Citro G, Sauter G, DeVries S, Kerschmann R, Carroll R, Waldan F. Identification of gains and losses of DNA sequences in primary bladder cancer by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosom Cancer* 1995;12:213–9.
- [10] Voorter C, Joos S, Bringuier PP, Vallinga M, Poddighe P, Schalken J, Du Manoir S, Ramaekers F, Lichter P, Hopman A. Detection of chromosomal imbalances in transitional cell carcinoma of the bladder by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 1995;146:1341–54.
- [11] Richter J, Jiang F, Görög J, Sartorius G, Moch H, Egenter G, Gasser T, Mihatsch M, Sauter G. Marked genetic differences between pTa and pT1 papillary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 1997;57:2860–4.
- [12] Richter J, Beffa L, Wagner U, Schraml P, Gasser TC, Moch H, Mihatsch MJ, Sauter G. Patterns of chromosome imbalances in advanced urinary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 1998;153:1615–21.
- [13] Simon R, Büreger H, Brinkschmidt C, Böcker W, Hertker L, Terpe HJ. Chromosomal aberrations associated with invasion in papillary superficial bladder cancer. *J Pathol* 1998;185:345–51.
- [14] Bruch J, Wöhr G, Hautmann R, Mattfeldt T, Brüderlein S, Möller P, Sauter S, Hameister H, Vogel W, Paiss T. Chromosomal changes during progression of transitional cell carcinoma of the bladder and delineation of the amplified interval on chromosome arm 8q. *Genes Chromosom Cancer* 1998;23:167–74.
- [15] Richter J, Wagner U, Schraml P, Maurer R, Alund G, Knönagel H, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser TC, Sauter G. Chromosomal imbal-

- ances are associated with a high risk of progression in early invasive (pT1) urinary bladder cancer. *Cancer Res* 1999;59:5687–91.
- [16] Zhao J, Richter J, Wagner U, Roth B, Schrami P, Zellweger T, Ackermann D, Schmid U, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser TC, Sauter G. Chromosomal imbalances in noninvasive papillary bladder neoplasm (pTa). *Cancer Res* 1999;59:4658–61.
- [17] WHO (1973): Histological typing of urinary bladder tumors. In: International classification of tumors No. 10. Geneva.
- [18] Union International Contre le Cancer. TNM Classification of Malignant Tumors. Geneva: Union International Contre le Cancer, 1978.
- [19] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [20] Beà S, Ribas M, Hernández JM, Bosch F, Pinyol M, Hernández L, García JL, Flores T, González M, López-Guillermo A, Piris MA, Cardesa A, Montserrat E, Miró R, Campo E. Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. *Blood* 1999; 23:4365–74.
- [21] Czerniak B, Chaturvedi V, Li L, Hodges S, Johnston D, Ro JY, Rajyalakshmi L, Logothetis C, Von Eschenbach AC, Grossman HB, Benedict WF, Batsakis JG. 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* 1999;18:1185–96.
- [22] Dutrillaux B. Pathways of chromosome alteration in human epithelial cancers. *Adv Cancer Res* 1995;67:59–82.

Analysis of kidney tumors by comparative genomic hybridization and conventional cytogenetics.

Rigola MA, Casadevall C, Bernues M, Caballin MR, Fuster C, Gelabert A, Egozcue J, Miro R.

Cancer Genet Cytogenet. 2002 Aug;137(1):49-53.....

1.7*



ELSEVIER

Cancer Genetics and Cytogenetics 137 (2002) 49–53

CANCER GENETICS
AND
CYTOGENETICS

Analysis of kidney tumors by comparative genomic hybridization and conventional cytogenetics

Maria Angels Rigola^{a,b}, Carme Casadevall^a, Marta Bernués^a, Maria Rosa Caballín^a,
Carme Fuster^{b,c}, Antoni Gelabert^c, Josep Egozcue^{a,b}, Rosa Miró^{a,b,*}

^a*Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain*

^b*Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain*

^c*Servei d'Urologia, Hospital de Nostra Sra Del Mar, Barcelona, Spain*

Received 13 November 2001; received in revised form 4 February 2002; accepted 5 February 2002

Abstract

Comparative genomic hybridization (CGH) and conventional cytogenetic karyotyping were used to screen for losses and gains of DNA sequences along chromosomes in ten renal tumors (RCC) of different histologic types (clear-cell RCC, papillary RCC, and one oncocytoma). Loss of 3p was the most common change in clear-cell RCC. All papillary tumors, either adenomas or carcinomas revealed gains of chromosomes 7 and 17q without limitation to size and grade. Homozygotic loss of the pseudoautosomal Xp or Yp region was detected in three RCC tumors. A dicentric (Y;14) was present as the sole chromosome abnormality in the oncocytoma. Both techniques showed concordant results in tumors with homogeneous karyotype. However, in tumors with several composite clones some discrepancies were observed, especially in cases of clear-cell RCC where chromosomal abnormalities present in a low number of metaphases could not be detected by CGH. © 2002 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Renal cell carcinomas (RCC) are a heterogeneous group of tumors, both at the histologic and cytogenetic level. Specific genomic changes characterize most of their morphologic subtypes. The papillary type of RCC (pRCC) generally exhibits a combination of numerical changes, including sex chromosome loss with trisomy or tetrasomy 7 and trisomy 17 [1], whereas additional trisomies 3, 12, 16, and 20 may appear in association with a more aggressive behavior of the tumor [2]. Tumors with translocations involving Xp11.2 and their variants represent a new subgroup of pRCC [3–4].

The abnormalities most often observed in cytogenetic studies of clear-cell RCC are loss of 3p, gain of 5q22qter, deletions of 6q, gains of chromosomes 5, 7, 10, and losses of 8p and 14q, as well as of chromosomes 9 and Y [2,5–6].

Oncocytomas constitute a heterogeneous group with at least two different cytogenetic types: one characterized by loss of chromosomes 1 and Y (in males), and another, which displays structural rearrangements involving chromosome regions 11q12~q13 [7–8].

Comparative genomic hybridization (CGH) studies in pRCC have shown, in addition to gains observed cytogenetically, overrepresentation of 5q and losses of 1p, 4q, 6q, 9p, 13q, as well as of chromosomes X and Y [9–10]. In clear-cell RCC, losses were most prevalent at 3p, 9p, and 13q. Other frequent sites of deletion include 6q, 8p, 14q, and 17p. Gains more frequently involve 5q and chromosome 7 [11–13].

Loss of genetic material from chromosome 1 is the most common genetic alteration detected in oncocytomas by CGH. Other frequent losses involving chromosomes 14 and a sex chromosome have also been found [14].

Recurrent gains and losses detected by CGH in RCC are consistent with conventional cytogenetic findings in clear-cell RCC and pRCC. However, several chromosome gains or losses, which are rarely found by cytogenetic studies, have been more frequently detected by CGH studies. Discrepancies between these two methods most likely reflect differences between CGH and conventional cytogenetics in their ability to detect unbalanced genetic material

In order to compare cytogenetic and CGH results of the same sample, we used CGH to analyze different types of renal tumors, which had also been characterized by cytogenetic analysis in our laboratory. We further sought for differences in chromosomal aberrations in relation to tumor size, stage, grade and survival.

* Corresponding author.

E-mail address: Rosa.Miró@uab.es (R. Miró).

2. Materials and methods

2.1. Patients and samples

Tumor specimens from eight patients were included in this study. A total of four cases (cases 1–4) were clear-cell RCC, three cases were pRCC (cases 5–7), and one was an oncocytoma (case 8). For case 1, the corresponding normal kidney tissue was also included. The clinical and histopathologic findings in the eight patients are indicated in Table 1.

Histologic grading of the tumors was done according to the Fuhrmann system and pathologic stage according to the tumor-node-metastasis classification system [15]. All papillary tumors analyzed were of subtype 1 (pale cytoplasm) as suggested by Delahunt and Eble [16].

Overall survival data were available for seven patients. Five patients had a survival of more than 5 years. One patient who had survived for more than 3 years (case 6) was lost to clinical follow-up.

The tumor specimens were obtained from radical or partial nephrectomies performed at the Department of Urology of the Hospital del Mar, Barcelona. One part of each tumor was cultured for cytogenetic analysis and the other was frozen and stored at -80°C until analysis. Normal kidney tissue from an area away from the tumor was obtained in one case (case 1).

2.2. Cytogenetic analysis

For cytogenetic analysis, all specimens were washed twice with culture medium supplemented with antibiotic and disaggregated enzymatically with collagenase II (2000 U/mL) for 2 hours at 37°C . The disaggregated cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, antibiotics and growth factors as previously described [17]. Six to ten days later, Colcemid was added to cultures at a final concentration of $0.03\ \mu\text{g/mL}$, and cells were harvested after 3 hours of incubation at 37°C . Chromosome slides were prepared in the conventional way, and G-banding was performed using Wright stain. The International System for Human Cytogenetic Nomenclature [18] was used to describe the tumor karyotypes. No unstained slides or cells in fixative had been saved from the cases, precluding further studies by fluorescence in situ hybridization (FISH).

2.3. CGH analysis

CGH analysis was performed according to the method described by Rigola et al. [19]. Normal and tumor DNA were labeled with SpectrumRed-dUTP and SpectrumGreen-dUTP by nick translation using a commercial kit (Vysis, Downers Grove, IL, USA). Subsequently, equal amounts of normal and tumor labeled probes (500 ng) and $10\ \mu\text{g}$ of Cot-1 DNA were coprecipitated using ethanol. The precipitated DNA was dissolved in $12\ \mu\text{l}$ 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 2–3 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.

Slides were analyzed using a Cytovision Ultra workstation (Applied Imaging, Sunderland, UK) and Quips Smart Capture Software from Vysis. Ratio values above 1.25 and below 0.75 were considered to represent chromosomal gains and losses, respectively. 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 cells were also performed.

3. Results

Cytogenetic and CGH data of the primary renal tumors are summarized in Table 2. G-banding analysis of clear-cell RCC (cases 1–4) showed heterogeneous results. Normal karyotypes and metaphases with random chromosome abnormalities were detected in the two tumors analyzed (T1 and T2) from case 1. Trisomy 7 was present in 6 of 9 metaphases analyzed from normal renal mucosa from the same patient.

An unbalanced $t(3;8)$ with loss of $3q11\sim\text{pter}$ as the sole abnormality of the tumor was found in two metaphases of case 2. G banding analysis of case 3 showed four cell clones:

Table 1
Clinical and histopathologic data of RCC studied by karyotyping and CGH

Case no.	Age/sex	Tumor type	Tumor size (cm)	TNM	Histologic grade	Treatment	Survival (months)
1	66/F	Clear cell RCC ^a	?	T ₂ NoMo	G1	Radical nephrectomy	>60
			4	T ₁ NoMo	G1		
2	63/F	Clear cell RCC	7	T ₁ NoMo	G3	Radical nephrectomy	>60
3	63/M	Clear cell RCC	9	T ₄ N ₁ M ₁	G3	Biopsy	7
4	71/M	Clear cell RCC	4	T ₁ NoMo	G1	Radical nephrectomy	>60
5	53/M	pRCC	4	T ₁ NoMo	G2	Radical nephrectomy	>36
6	44/M	pRCC ^a , adenoma	?	T ₁ NoMo	G1	Radical nephrectomy	?
		pRCC ^a , carcinoma	?	T ₂ NoMo	G1		
7	48/M	pRCC	8	T ₂ NoMo	G2	Radical nephrectomy	>60
8	39/M	Oncocytic RCC	5	T ₁ NoMo	G1	Radical nephrectomy	>60

^aMultiple RCC.

Table 2
Summary of results obtained by karyotyping and CGH

Case no.	Tumor type	Karyotype	CGH
1	Clear-cell T1	46,XX[cp5]	No imbalances detected
	T2	46,XX[cp18]	No imbalances detected
	normal mucosa	43~47,XX,+7[cp6]/46,XX[3]	No imbalances detected
2	Clear-cell	45,XX,-3,der(8)t(3;8)(q11;p11)[2]/46,XX[7]	No imbalances detected
3	Clear-cell	47,XY,+7[3]/46,X,idem,-Y[7]/46,XY[3]/ 58~60,X,t(X;?)(q21;?)(p11)[3],-Y[3], del(1)(q22q25)[3],t(1;8)(q12;q23)[2], +del(2)(q22)[2],+del(3)(p13)×2[3],t(4;5)(p14;p13)[3], +del(5)(p15.1)[2],t(5;8)(p12;p12)[2],del(7)(p15)[3],+12, +12[2],del(13)(q14)[2],inv(14)(p12q13)[3],+16,+16[3], +t(6;17;17)(p12;p13;q12)[3],+21[2][cp3]	rev ish dim(Y)
4	Clear-cell	46,XY[cp7]	rev ish enh(5q23qter,16), dim(Y,Xp22.3,3p21pter,4q21)
5	Papillary	57,XY,+2,+3,+5,+7,+7,+12,+16,+17,+17,+18,+20[3]	rev ish enh(7,17)
6	Papillary adenoma carcinoma	48,X,-Y,+7,+7,+17[12] 47~99,X,-Y[10],t(2;3)(p25;q12)[4], +7,+7[12],-9[5],t(15;17)(q21;q24)[10],+16[10], +mar[4][cp12]	rev ish enh(Xp11p21,7,17),dim(Y) rev ish enh(7,16,17),dim(Y,Xp22.3)
7	Papillary	47,X,-Y,+12,t(17;21)(q11.2;p11.2),+20,-21[5]	rev ish enh(12,17q11.2qter,20,18p11.2), dim(Y,Xp22.3)
8	Oncocytoma	45,X,dic(Y;14)(p11;p13)[3]/46,XY[4]	No imbalances detected

one clone (3/16 metaphases) was karyotypically normal. The other two chromosome complements were related showing 47,XY,+7 (3/16 metaphases) and 47,X,-Y,+7(7/16 metaphases), respectively. A fourth clone (3/16 metaphases) was pseudotriploid with multiple structural and numerical chromosome abnormalities characteristic of advanced stages. Normal karyotype and random chromosome abnormalities were detected in case 4.

Comparative genomic hybridization results (Table 2) showed no imbalances in the two tumors from case 1. In the other cases, no concordance was observed: CGH analysis did not detect the loss of 3p in case 2 or the complex abnormalities in case 3. Contrarily, in case 4, with a normal G-banding karyotype, CGH showed gain on 5q and losses on 3p in addition to other imbalances (Table 2). Trisomy 7, which was present in normal mucosa from case 1 and in two lines from case 2 was not detected by CGH.

Cytogenetic data from the four tumors of the papillary type (cases 5–7) were in concordance with those from previous reports. All pRCC, either adenomas or carcinomas revealed gains of chromosomes 7 and 17, without limitation to size and grade. Two imbalanced translocations leading to partial trisomy of 17q were observed in cases 6 and 7. Comparative genomic hybridization results of these tumors revealed a close correlation with cytogenetic karyotypes. Moreover some unexpected changes such as loss of Xp22.3 in cases 6 and 7 were only detected by CGH. However, in case 5, the karyotype of the tumor included numerical abnormalities but CGH showed only gains on chromosomes 7 and 17 (tetrasomic in G-banded metaphases). Deviations of the CGH fluorescence ratio profiles beyond the 35% thresholds

were observed affecting chromosomes that appeared involved in trisomies or monosomies by cytogenetic analysis.

In the oncocytoma (case 8), a dicentric chromosome, dic(Y;14), was detected as the sole abnormality of the tumor and no imbalances were detected by CGH.

4. Discussion

In our study, both cytogenetic and CGH results, when taken as a whole, coincide in general with those reported in the literature [1–2,5–14]. All papillary tumors, either adenomas or carcinomas revealed gains of chromosome 7 and 17q without limitation to size and grade. Gain of chromosomes 12, 16, and 20 as well as losses of Xp and the Y chromosome were found in the carcinomas. Loss of 3p was the most common change in clear-cell RCC and gain of 5q in addition to other abnormalities was detected in 2/3 tumors with imbalances.

No relation was found between chromosomal abnormalities and tumor grade, stage, and survival. Only in patient 3, the complex G-banding karyotype of the tumor could be related to the presence of metastases and poor clinical survival (Table 1).

Our results revealed a close relation between cytogenetic and CGH data in papillary RCC. It is noteworthy that in some cases, the same regions were found to be involved using both methods. For example in case 7, G-banding revealed a t(17; 21) with gain of chromosome 17q11.2~qter, and CGH showed a gain in exactly the same region. However, some unexpected changes such as loss of Xp22.3 in cases 6 and 7 were only detected by CGH.

Loss of Xp22.3 was also detected by CGH in one clear-

cell RCC (case 4). Interestingly, all three tumors showed loss of the Y chromosome. It has been suggested that tumor suppressor genes are located in the pseudoautosomal region (PAR) of Xp and Yp and that these genes could have a role in tumorigenesis of papillary and oncocyctic renal tumors [10,20]. In our study, homozygotic loss of the PAR region in one clear cell as well as in two papillary tumors strongly support this hypothesis. According to Jiang et al. [10], losses of Xp are associated with poor prognosis in pRCC. In the present study, a relation between Xp22.3 losses and poor clinical survival was not found in the two patients with known clinical follow up (cases 4 and 7).

Four of the 10 tumors analyzed by CGH showed no imbalances. Three of them were tumors in which cytogenetic data indicated random abnormalities (T1 and T2 from case 1) or a dicentric chromosome, dic(Y;14), without net chromosome changes (oncocyctoma, case 8). A limitation of CGH is that it cannot detect balanced translocations, inversions, or dicentric chromosomes. In our study the presence of a dic (Y;14) as the sole abnormality of the tumor was not detected by CGH. The presence of dicentric chromosomes is not infrequent in oncocyctomas [8,21]. We suggest that this semi-stable chromosome alteration could precede the loss of the two chromosomes involved. In this case, it is interesting to note that losses of chromosomes Y and 14 have been frequently detected in oncocyctomas [8,14].

When comparing conventional cytogenetics and CGH results obtained in the same case, some discrepancies were observed. These discrepancies might be due to: 1) CGH analysis allows to detect gains or losses that are not identified by cytogenetic analysis; 2) chromosomal abnormalities that are present in a low number of metaphases and in tumors with heterogeneous cell populations cannot be detected by CGH; and 3) in tumors with numerical chromosome abnormalities and a quasitriploid chromosome number, CGH results only detect clearly those chromosomes that show gains and losses over or under the trisomic complement (case 5)

A discrepancy was observed in clear cell RCC, where some changes affecting small cell populations were observed by cytogenetics but not by CGH. In cytogenetic studies, the observation of a few cells displaying a given anomaly such as the loss of 3p through an imbalanced t(3;8) in two metaphases of case 2 is the criterion for acceptance of clonality. In contrast, a high percentage of cells should generally display a given anomaly in order to be detected by CGH. On the same respect, CGH results were comparable to cytogenetic results in tumors with simple chromosome abnormalities, but there were many discrepancies between cytogenetic results and CGH in tumors with several composite clones. For example, case 3 showed a very complex karyotype in a small cell subpopulation, but no abnormalities, except for the loss of the Y chromosome, were detected by CGH. This discrepancy might be due to intratumor heterogeneity.

Again, it is important to note that CGH data provide an average of imbalances: they are representative of a major proportion of the cell population under investigation. The

advantage is that the risk of analyzing only a small cell clone which may not be representative of the tumor is minimized, but there is no measure of the degree of heterogeneity within a tumor, and a subclone with additional genomic alterations related to aggressiveness may escape to analysis. CGH avoids problems of selection due to an in vitro growth advantage of certain tumor cells used for chromosome banding analysis. In case 3, CGH was unable to detect gain of chromosome 7 that appeared in 10 of 16 metaphases analyzed. According to Meloni et al. [5], cells carrying a trisomy 7 could be more susceptible to abnormal proliferation in vivo or in vitro. We suggest that in this tumor, cells with trisomy 7 did not correspond to a large cell population, and that they acquired proliferative advantage during in vitro cell culture for cytogenetic analysis. Supporting this possibility is the fact that in case 1, CGH analysis did not detect the gain of chromosome 7 that appeared as trisomic in normal renal mucosa around tumors T1 and T2. It has been confirmed that trisomy of this chromosome is present in normal kidney tissue and it is not an in vitro artifact [22], but it seems logical to think that cells with trisomy 7 are not the major population in normal renal mucosa, and acquire proliferative advantages in culture.

In summary, our results confirm that CGH provides important information, which cannot be obtained by G-banding analysis alone. However, cytogenetics detects balanced rearrangements and intratumor karyotype variability that may also have a central role in tumor development and progression.

References

- [1] Kovacs G, Fuzesi L, Emanuel A. Cytogenetics of papillary renal cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1991;3:249–55.
- [2] Kovacs G. Molecular differential pathology of renal cell tumours. *Histopathology* 1993;22:1–8.
- [3] Meloni AM, Dobbs RM, Pontes JE, Sandberg AA. Translocation (X;1) in papillary renal cell carcinoma. A new cytogenetic subtype. *Cancer Genet Cytogenet* 1993;65:1–6.
- [4] Dijkhuizen T, van den Berg E, Wilbrink M, Weterman M, Geurts van Kessel A, Störkel S, Folkers RP, Braam A, de Jong B. Distinct Xp11.2 breakpoints in two renal cell carcinomas exhibiting X;autosomal translocations. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;14:43–50.
- [5] Meloni A, Bridge J, Sandberg AA. Reviews on chromosome studies in urological tumors. I. Renal tumors. *J Urol* 1992;148:253–65.
- [6] Kovacs G. Molecular cytogenetics of renal tumors. *Adv Cancer Res* 1993;62:89–124.
- [7] Dobin SM, Harris CP, Reynolds JA, Coffield KS, Klugo RC, Peterson RF, Speights VO. Cytogenetic abnormalities in renal oncocyctic neoplasms. *Genes Chromosomes Cancer* 1992;4:25–31.
- [8] Neuhaus C, Dijkhuizen T, van den Berg E, Störkel S, Stöckle M, Mensch B, Huber C, Decker HJ. Involvement of the chromosomal region 11q13 in renal oncocyctoma: case report and literature review. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;94:95–8.
- [9] Bentz M, Bergerheim US, Li C, Joos S, Werner CA, Baudis M, Gnarr J, Merino MJ, Zbar B, Linehan WM, Lichter P. 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.
- [10] Jiang F, Richter J, Schraml P, Bubendorf L, Gasser T, Sauter G, Mihatsch MJ, Moch H. Chromosomal imbalances in papillary renal cell

- carcinoma. Genetic differences between histological subtypes. *Am. J Pathol* 1998;153:1467–73.
- [11] Moch H, Presti JC Jr, Sauter G, Buchholz N, Jordan P, Mihatsch MJ, Waldman FM. Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization are associated with clinical outcome in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1996;56:27–30.
- [12] Presti JC Jr, Moch H, Reuter VE, Cordon-Cardo C, Waldman FM. Renal cell carcinoma genetic analysis by comparative genomic hybridization and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Urol* 1996;156:281–5.
- [13] Gronwald J, Störkel S, Holtgreve-Grez H, Hadaczek P, Brinkschmidt C, Jauch A, Lubinski J, Cremer T. 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* 1997;57:481–7.
- [14] Presti JC Jr, Moch H, Reuter V, Huynh D, Waldman FM. Comparative genomic hybridization for genetic analysis of renal oncocytomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1996;17:199–204.
- [15] American Joint Committee on Cancer: Kidney. In: Behars OH, Henson DE, Hutter RVP, Myers MH, editors. *Manual for staging of cancer*. 3rd edition. Philadelphia: JB Lippincott Co, 1988, pp. 199–201.
- [16] Delahunt B, Eble J. Papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 tumors. *Mod Pathol* 1997;10:537–44.
- [17] Berrozpe G, Caballín MR, Miró R, Gelabert A, Egozcue J. Centromere splitting in bladder cancer. *Hum Genet* 1990;85:184–6.
- [18] ISCN. An international system for human cytogenetic nomenclature. Mitelman F, editor. Basel: S. Karger, 1995.
- [19] Rigola MA, Fuster C, Casadevall C, Bernués M, Caballín MR, Gelabert A, Egozcue J, Miró R. Comparative genomic hybridization analysis of transitional cell carcinomas of the renal pelvis. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;127:59–63.
- [20] Feder M, Liu Z, Apostolou S, Greenberg RE, Testa JR. Loss of chromosomes 1 and X in a renal oncocytoma: implications for a possible pseudoautosomal tumor suppressor locus. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;123:71–2.
- [21] Dal Cin P, Roskams T, De Vos R, Van Poppel H, Balzarini P, Van den Berghe H. Involvement of chromosomes 1 and 18 in renal cell tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;116:54–8.
- [22] Johansson B, Heim S, Mandahl N, Mertens F, Mitelman F. Trisomy 7 in nonneoplastic cells. *Genes Chromosomes Cancer* 1993;6:199–205.

**Comparative genomic hybridization analysis of invasive bladder tumors
with different grown patterns.**

Rigola MA, Hernando C, Fuster C, Gelabert A, Egozcue J, Miro R.

Journal of Urology (enviat).....

3.2*

COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION ANALYSIS OF INVASIVE BLADDER TUMORS WITH DIFFERENT GROWTH PATTERNS

M^a Àngels Rigola,^{1,2} Cristina Hernando,¹ Carme Fuster,¹ Antoni Gelabert,³ Josep Egozcue,^{1,2} Rosa Miró.^{1,2}

1. Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.
2. Institut de Biotecnologia i Biomedicina. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.
3. Servei d'Urologia, Hospital del Mar, Barcelona, Spain.

Runninghead: CGH analysis of bladder tumors with different growth pattern

Key words: bladder cancer, chromosome imbalances, comparative genomic hybridization

ABSTRACT

Purpose: To identify the genetic alterations that may be associated with the growth pattern of invasive bladder cancers

Materials and Methods: A total of 24 specimens of transitional cell carcinoma of the bladder with solid and mixed solid-papillary growth patterns were analyzed by Comparative Genomic Hybridization.

Results. For both groups combined, the most frequent chromosome imbalances involved gains at 20q13.3, 1q21, 17q11-q22, 8q and 10p12-p15. Losses were most frequently detected in 6q16-q22 and 5q15-q23. High level amplifications were detected in 18 different chromosome regions. When comparing genetic changes according to growth pattern, the most striking differences corresponded to gains on 1q, 11q13, 17q and 13q and losses in 11p, 11q and 17p, that were more frequent in mixed solid papillary tumors, whereas gains on 2p, 5p and losses in 13q were more frequent in solid growth pattern tumors.

Conclusions: invasive and high grade non invasive tumors may represent distinct groups of bladder cancer characterized by a high grade of genetic instability and frequent occurrence of genetic changes including +20q13, +1q21, +17q11-q22, +8q21-q22, +6p, +10p12-p15, -6q16q22, -5q15-q23, -4q; these tumors may arise de novo and not through progression of a low grade pTa precursor. On the other hand, the pattern of CGH gains seems very similar in invasive and high grade tumors irrespective of their growth pattern. These results suggest a convergent pathway in the last stages of bladder tumor development as has been suggested by conventional cytogenetic analysis.

INTRODUCTION

Transitional cell carcinoma (TCC) of the bladder comprises a heterogeneous group of tumors. Apart of the heterogeneity observed in specimens of a defined histopathologic category, an intratumoral heterogeneity also exists. Heterogeneity could explain differences in the behavior of tumors of identical classification.¹

It has been demonstrated that progression from minimally invasive to deeply invasive cancer goes along with the acquisition of genomic alterations increasing the malignant potential of cancer cells. Cytogenetic changes that are more frequent in pT2-T4 than in pT1 TCC of the bladder include gains at 3q, 5p, 7p, 18p, Xq and losses in 5q, 6q, 15q.²⁻⁴ These chromosome regions may carry genes that play a role for tumor progression.

Clinical and genetic data support the existence of multiple pathways in the genesis of invasive urothelial cancers.^{2, 5-7} Some of these invasive tumors may develop from low grade superficial papillary tumors, while most of invasive tumors are considered not to have a history of papillary superficial tumors.

On the other hand, it has been described that bladder tumors have a different biological behavior depending on their growth pattern.^{1, 5} Studies carried out in our laboratory⁸ suggested that allelic losses at 6q were associated with tumors with a solid growth pattern. In this type of tumors, allelic losses at 3p were associated with invasion. These results supported the lack of involvement of these genetic alterations in the progression of low-grade papillary bladder tumors. On the other hand, by comparative genomic hybridization

analysis, Richter et al.² demonstrated an association of +11q13 and -9q with a papillary growth pattern.

Altogether, these data suggest that the identification of changes linked to tumor progression could be problematic because genetic differences between pT1 and pT2-T4 might be due to their different growth patterns and could represent different evolutionary pathways.

To further identify chromosome imbalances related to growth pattern, we analyzed 16 solid (S) and 8 mixed solid-papillary (mSP) bladder tumors by comparative genomic hybridization.

MATERIALS AND METHODS

Patients and samples

Tumor specimens from 24 patients (20 men and 4 women) were included in this study.

Clinical and pathological data from the patients are indicated in table 1

16 tumors (cases 1-16) showed a solid growth pattern. Eight tumors (cases 17-24) showed a mixed solid- papillary growth pattern. Three tumors showed a sarcomatoid evolution in addition to a solid. (cases 8,15) and a mixed solid-papillary (case 23) growth pattern

Tumor samples were obtained at surgery. 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 the tumor, to evaluate tissue morphology, and stage. All specimens were graded according to the World Health Organization classification⁹ and staged according to the TNM system.¹⁰

CGH Analysis.

DNA was extracted from frozen tissue sections following standart methods. CGH analysis was performed according to the method described by Rigola 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, IL). 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 min. Normal metaphase spreads (Vysis, Downers Grove, IL) were denatured for 5 min at 74°C and hybridized 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.

Slides were analyzed using a Cytovision Ultra workstation (Applied Imaging, Sunderland, United Kingdom) and Quips Smart Capture Software from Vysis. The fluorescent hybridization signals and DAPI-staining patterns were captured. Ratio values above 1.25 and below 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 Red-dUTP and Green-dUTP labels were interchanged between normal and tumor cells were also performed.

RESULTS

The CGH results of the 24 tumors analyzed are shown in figure 1. One sample from stage pTa (case 1) did not reveal chromosome imbalances, and a gain at 8q24-qter was the only abnormality detected in a pT2 GIII tumor with sarcomatoid evolution and metastases at diagnosis (case 8). Gains of chromosome 19 were observed in all the tumors analyzed except cases 3, 13, 14, 15 and 16; however, since chromosome 19 and other regions of the genome are prone to hybridization variability that may result in CGH artifacts, imbalances affecting this chromosome as well as those involving chromosomes 1p34-pter, 16p and 22 were not taken into account.

On average, 12.5 alterations (range 0-28) were found per tumor: 6.6 gains (range 0 to 15), 5 losses (range 0 to 12) and 0.9 amplifications (range 0 to 4). Gains were most frequent on chromosomes 20 (70%), 1q (58%), 17q (54%), 8q (50%), 10p (46%), 3p, 6p (42%), 21 (33%), 3q, 11q (29%), 5p, 7p (25%), 2p, and 18p (21%). Loss of chromosomal material was commonly seen at 6q (42%), 5q (38%), 2q, 4q, 9p, 11p (33%), 9q (29%), Y, 11q, 18q (25%), 8p, 12q (21%). The distribution of these changes per tumor is indicated in table 2.

High level amplifications were detected in 18 different chromosome regions. All of them except 2p22-pter, 4q28-q31.2 and 14q23-q24 had been previously described in bladder tumors by CGH.³

CGH analysis allowed the delineation of minimal common regions over represented or under-represented in each of the chromosomes most frequently involved. Consensus regions of overlap could be identified as gains at 1q21, 2p22-pter, 3p23-pter, 3q28-q29, 6p23, 7p14-p15, 8q13-q21.1, 8q22, 8q24, 10p12-p15, 11q13, 17q11-q22, 20q13.3, Xp11-p12 and losses in 2q34-q35, 4q21-q22, 5q15-q23, 6q16-q22, 9p21-p22, 9q21-q22, 10q24-

q25, 11p13-pter, 11q23, 12q21-q22, 13q21-q22 and 18q11.2-qter.

We observed a general correlation between the grade/stage of the tumors and the complexity of chromosome imbalances, indicating that progressive accumulation of acquired genetic alterations is the driving force of multistep bladder TCC carcinogenesis.

When genetic changes present in solid (S) and in mixed solid-papillary (mSP) growth pattern tumors were analyzed separately, we found small differences on the averages of total number of imbalances (15 in mixed solid-papillary versus 11 in solid), and the averages of gains (9 versus 6.7) and losses (6.3 versus 4.39). These differences were not significant and they are probably due to the advanced stage-grade of most tumors with mixed S-P growth pattern (7/8 tumors). We observed that gains on 3q, 10p, 11q 12q and 17q as well as losses on 2q, 11p, 11q and 13q were more frequent in T2-T4 solid-papillary tumors than in solid tumors at the same stages. Gains of chromosome 2p was only observed in tumors with solid growth pattern. Gains on 5p and 13q were observed in a 36% of invasive solid tumors versus 14% of mSP invasive tumors. Chromosome alterations such as gains on 6p, 8q, 20q and losses on 6q and 9p can be found with similar frequencies in mSP and S invasive tumors. Loss of 9q was detected with a low frequency (14%) in mSP tumors. Gains of 20q were detected in 100% of the mSP tumors irrespective of their stage and grade.

DISCUSSION

As shown in previous reports, no particular alteration was significantly linked to advanced tumor stage. A progressive increase in the number of chromosome alterations with tumor grade and stage was evident in the majority of cases (table 2).

The genetic findings in solid and mixed solid papillary tumors were comparable regarding the average number of changes per tumor as well as the average of gains and losses. The most frequent chromosome imbalances involved gains at 20q13.3, 1q21, 17q11-q22, 8q and 10p12-p15. Losses were most frequently detected in 6q16-q22 and 5q15-q23. Except in case 2, a pT1GII tumor with a very poor outcome, none of these changes was detected in the superficially or minimally invasive low grade tumors analyzed.

In spite of the high number of imbalances observed, it is interesting to note that most of them involved losses and/or gains in different arms of the same chromosome. Thus gains at 5p, 6p, 8q, 10p, 17q and 18p as well as losses in 5q, 6q, 8p, 10q, 17p and 18q were detected as frequent chromosome changes in our series of tumors. Moreover, the simultaneous presence of 5p+ and 5q- (5p+/5q-) was detected in cases 5, 13, 16 and 20; 6p+/6q- and 10p+/10p- were detected in cases 5, 12, 13, 21 and cases 13, 20 respectively. Cases 12, 15, 16 and 20 showed 8p-/8q+ whereas 17p-/17q+ was detected in cases 7, 23 and 24. In some of these cases, the pattern of gains and losses in different arms of the same chromosome was indicative of an isochromosome; however, in other of these cases the gains and losses affected small areas of the chromosome arms, and were not indicative of an isochromosome.

Moreover, high amplification of 11q13 was frequently associated with losses at 11p and 11q (cases 5, 12 and 23). These results agree with a preferential involvement of specific

chromosome regions and suggest the presence of non-random mechanisms responsible of genomic imbalances.

Regarding individual chromosomes, gains at 8q are important in bladder as well as in other solid tumors. In the present study, we detected the existence of three minimal overlapping regions of gain in chromosome 8q (8q13-q21.1, 8q22, 8q24). High level amplifications at 8q21-q22 and 8q24 have been described in previous studies.³ These results suggest that different genes in chromosome 8q could be important in the development of bladder cancer. Noteworthy, a gain in 8q24 was detected as the sole abnormality in a pT2 GIII tumor with metastases at diagnosis (case 8). The CMYC oncogene at 8q24, is known to be amplified in several tumors¹² and has been shown to be overexpressed in bladder cancer.¹³ Gains at 20q13.3, 1q21 and 17q have been described as frequent chromosome imbalances in a series of tumors including TCC of the bladder with papillary growth pattern.⁴

In the present study, gains at 19q were observed in 19 of 24 tumors analyzed; although these imbalances have not been taken into account, it is interesting to note that amplification and over expression of cyclin E (locus at 19q13) have recently been described in TCC of the bladder as well as in other tumors.¹⁴ Unfortunately, the tumor sample was not enough to perform FISH analyses with the cyclin E probe to confirm gains and/or amplifications detected by CGH in our study.

In order to know if there are genetic changes linked to growth pattern, only invasive tumors were used for comparison. The most striking differences corresponded to gains on 1q, 11q13, 17q and 13q and losses in 11p, 11q and 17p that were more frequent in mSP tumors whereas gains on 2p, 5p and losses in 13q were more frequent in S growth pattern tumors. Losses on 13q (minimal overlapping region at 13q21q22) observed in a 43% (3/7) of

invasive mSP versus a 1% (1/11) of S tumors contrast with gains of 13q observed more frequently in S tumors (36%,4/11 S versus 14%,1/7 mSP). Gains of 1q and 17q were detected in 100% and 85% of the mSP invasive tumors with mSP versus 36% of S growth pattern tumors

Gains of 2p were exclusively seen in tumors with solid growth pattern in the present study, however similar imbalances have been reported by other authors in superficial and invasive papillary tumors.^{2, 3} The higher frequency of 11q gains in papillary carcinomas than in solid ones is in line with previous studies suggesting that 11q gains may be characteristic of papillary tumors.^{2, 3} Contrarily to the data of Richter et al.,² the frequency of chromosome 9q losses was lower in mSP than in S growth pattern tumors.

The number of alterations and the occurrence of particular changes can vary broadly in individual tumors; however a preferential order in the occurrence of chromosomal gains and losses was observed in several cases, suggesting the existence of common evolutive pathways irrespective of growth pattern For example, when comparing the changes observed in two tumors with different growth patterns such as case 12 (S) and case 20 (mSP) a striking similar pattern of gains can be seen (coincident chromosome or chromosome regions are indicated in bold):

Case12:

enh(**1q21**,3p21p24,**3q13qter**,**7,8q**,**10p12pter**,14,16q21qter,**17p11q21**,**18p,20**,Xq21qter,Y)
amp(3p24pter, **6p22pter**, 11q12q13)

Case 20:

enh(**1q21q25**,**3q27qter**,5p,**7p**,**8q21.3q22**,**10p22pter**,**17p12qter**,**18p,20q**,21q22, Xp11p14)
amp(**6p21.3p24**)

The pattern of losses in these tumors was coincident in only four chromosomes or chromosome regions:

Case12:

dim(3p12p13,**4q**,6p21qter,**8p**,9p21pter,9q12q21,**11p**,11q25,**13q21qter**,18q, Xp22.1p21.2)

Case20:

dim(2q23qter,**4**,5q,**8p12pter**,10q23qter,**11p13pter**,12q14q23,**13q14q21**,16q21qter)

A similar pattern of gains and losses was observed in other tumors (table 2) as well as in a pT1GIII tumor with solid growth pattern and very poor outcome (**case 5**). In this tumor, the CGH karyotype was: Rev ish enh(**3p21pter**,**3q29**,**6p21.3pter**,8p21q12,**10**,12p13pter,12q23qter,13,15,**16q22qter**,**17**,**20**,**21q22**),dim(2q22q33,**5q14q23**,6q,9,**11p12p15**,**11q21qter**,14q13q32,18),amp(**5p**, **8q13qter**,**11q13**). All imbalances indicated in bold coincide with those detected in cases 12 and/or 20. Moreover, case 21 showed 28 chromosome imbalances; all of them, except gain in 9q34, were coincident with those observed in cases 5, 12 and/or 20. These results agree with those of Höglund et al.⁷ who suggested a common set of imbalances in the last stages of bladder tumor development.

CONCLUSIONS

According to our results and those of other authors,^{2,3} we can conclude that invasive and high grade non invasive tumors may represent a distinct group of bladder cancer characterized by a high grade of genetic instability and frequent occurrence of genetic changes including +20q13, +1q21, +17q11-q22, +8q21-q22, +6p, +10p12-p15, -6q16q22, -5q15-q23, - 4q; these tumors may arise de novo and not through the progression of a low grade pTa precursor.

On the other hand, the pattern of CGH gains seems very similar in invasive and high grade tumors irrespective of their growth pattern. These results suggest a convergent pathway in the last stages of bladder tumor development as has been suggested by conventional cytogenetic analysis.⁷

REFERENCES

1. Schalken, J.A., Van Moorselaar, R. J. A., Bringuier, P. P., Debruyne, M. J.: Critical review of the models to study the biologic progression of bladder cancer. *Semin Surg Oncol*, **8**: 274, 1992
2. Richter, J., Beffa, L., Wagner, U., Schrami, P., Gasser, T. C., Moch, H. et al.: Patterns of chromosomes imbalances in advanced urinary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol*, **153**: 1615, 1998
3. Simon, R., Bürger, H., Semjonov, A., Hertle, L., Terpe, H-J., Böcker W.: Patterns of chromosomal imbalances in muscle invasive bladder cancer. *Int J Oncol*, **17**: 1025, 2000
4. Prat, E., Bernués, M., Caballín, M. R., Egozcue, J., Gelabert, A., Miró, R.: Detection of chromosomal imbalances in papillary bladder tumors by comparative genomic hybridization. *Urology*, **57**: 986, 2001
5. Kakizoe, T., Tobisu, K., Takai, K., Tanaka T., Kishi, K., Teshima, S.: Relationship between papillary and nodular transitional cell carcinoma in the human urinary bladder. *Cancer Res*, **48**: 2293, 1998
6. Spruck, C. H. III., Ohneseit, P. F., González-Zulueta, M., Esrig, D., Miyao, N., Tsai, Y. C. et al.: Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res*, **54**: 784, 1994
7. Höglund, M., Säll, T., Heim, S., Mitelman, F., Mandahl, N., Fadl-Elmula, I.: Identification of cytogenetic subgroups and karyotypic pathways in transitional cell carcinoma. *Cancer Res*, **61**: 8241, 2001
8. Bernués, M., Casadevall, C., Caballín, M. R., Miró, R., Ejarque, M. J., Chéchile, G. et al.: Study of allelic losses on 3p, 6q, and 17p in human urothelial cancer. *Cancer*

Genet Cytogenet, **112**: 42, 1999

9. World Health Organization: Histological typing of urinary bladder tumors, in International classification of tumors, No. 10. Geneva, World Health Organization, 1973
10. Union International Contre le Cancer: TNM Classification of Malignant tumors. Geneva, Union International Contre le Cancer, 1978
11. Rigola, M. A., Fuster, C., Casadevall, C., Bernués, M., Caballín, M. R., Gelabert, A. et al.: Comparative genomic hybridization análisis of transitional cell carcinomas of the renal pelvis. *Cancer Genet Cytogenet*, **127**: 59, 2001
12. Brison, O.: Gene amplification and tumor progression. *Biochem Biophys Acta*, **1165**: 25, 1993
13. Sardi, I., Dal Canto, M., Bartoletti, R., Guazzelli, R., Travaglini, F., Montali, E.: Molecular genetic alterations of c-myc oncogene in superficial and locally advanced bladder cancer. *Eur Urol*, **33**: 424, 1998
14. Schraml, P., Bucher, C., Bissig, H., Nocito, A., Haas, P., Wilber, K. et al.: Cyclin E overexpression and amplification in human tumours. *J Pathol*, **200**: 375, 2003

FIGURE LEGENDS

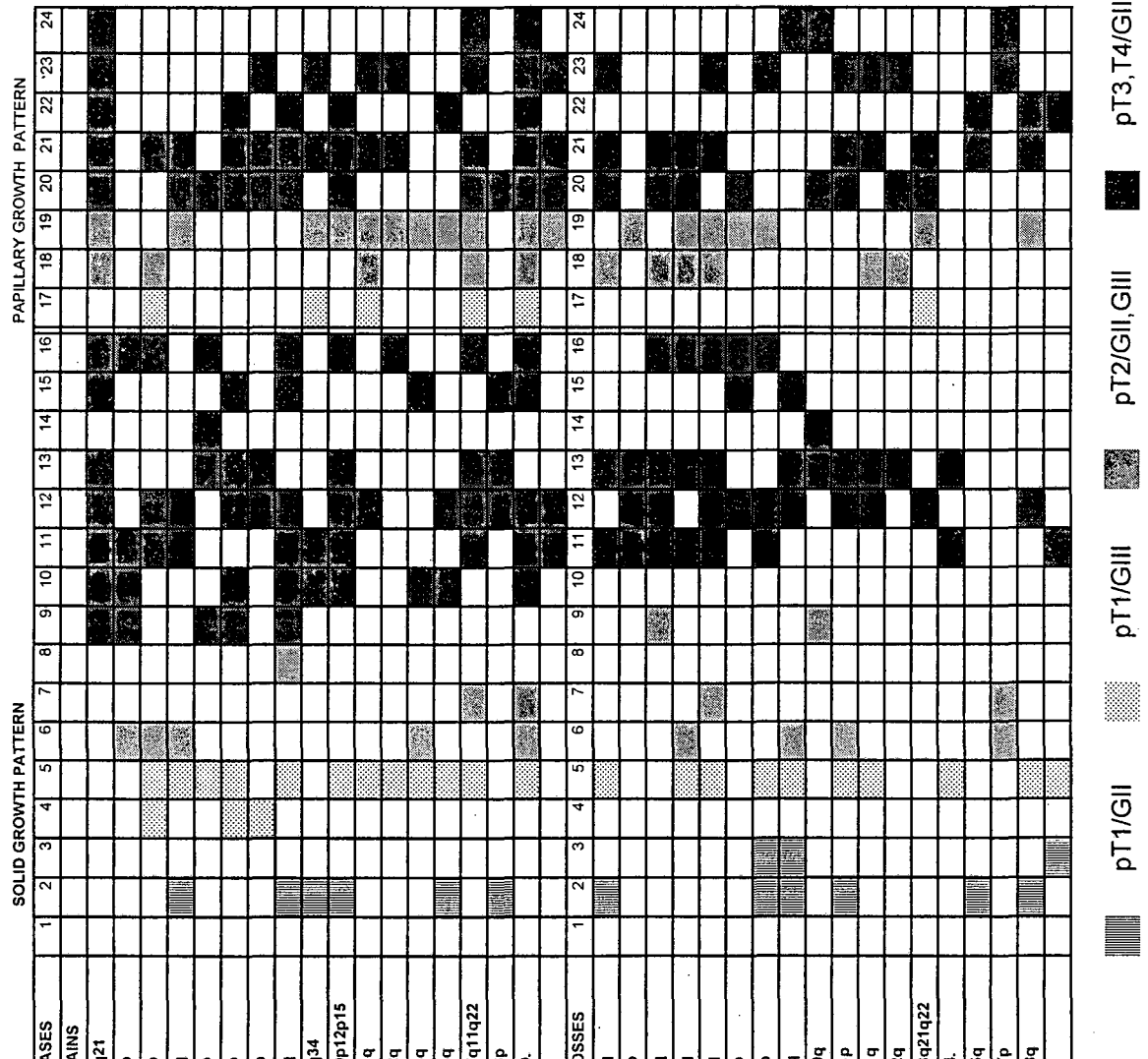
FIGURE 1. Summary of all relative DNA sequence copy number changes detected by CGH in 24 specimens of TCC of the bladder. Vertical lines on the right of the chromosome indicate gains of the corresponding chromosome regions; those on the left indicate losses. Solid bars indicate amplifications. Chromosomes 1p34-pter, 19, 16p and 22 were not analyzed.

TABLE 1. Patients data and tumor characteristics

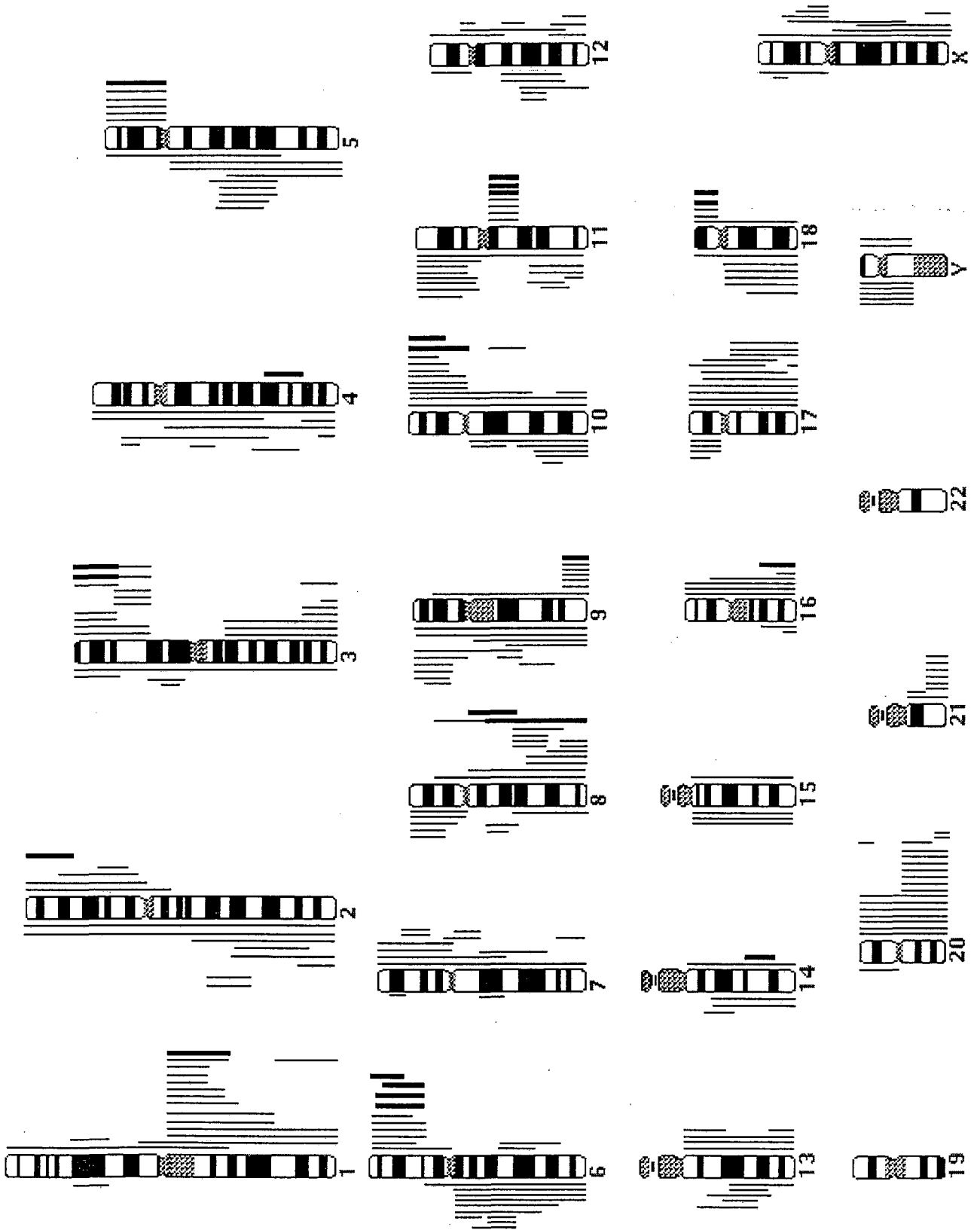
CASE	SEX/AGE	STAGE/GRADE	TREATMENT	RECURRENCE (months)	METASTASIS (months)	SURVIVAL months
1	M/61	pTa/GII	TUR, BCG, Mit.	- (84)	- (84)	>84
2	M/54	pT1/GII	TUR, BCG, Mit.	+ (8)	- (17)	17
3	M/58	pT1/GII	TUR, BCG, Mit.	- (48)	- (48)	>48
4	F/95	pT1/GIII	TUR	?	?	?
5	M/76	pT1/GIII	TUR, BCG, Mit.	+ (19)	+PUL, HEP(19)	>19
6	M/82	pT2/GIII	-	-	+at diagnosis	1(CRD)
7	F/63	pT2/GIII	Radical Cystectomy	-	- (?)	-(?)
8	M/64	pT2/GIII	Radical Cystectomy	-	+PUL, REN, OSS (?)	4
9	M/60	pT3a/GIII	Radical Cystectomy	-	- (30)	>30
10*	M/71	pT3/GIII	?	+ CIS	+ LYM peritoneal(?)	>72
11	M/81	pT3/GIII	?	-	+ (5)	5(CRD)
12	M/66	pT3b/GIII	Radical Cystectomy	-	-	< 2(CRD)
13	M/79	pT3/GIII	Radical Cystectomy	-	?	?
14	M/68	pT4/GIII	Radical Cystectomy	-	- (25)	25(CRD)
15	M/75	pT2/GIII	Radical Cystectomy	-	- (24)	24(CRD)
16	M/82	pT3b/GIII	Radical Cystectomy	-	- (48)	>48
17	M/73	pT1/GIII	TUR, BCG, Mit.	- (4)	- (4)	> 4
18	F/57	pT2/GII	Radical Cystectomy	?	?	?
19	M/66	pT2/GIII	TUR	-	-	< 4
20	M/60	pT3a/GIII	Radical Cystectomy	-	+PUL, OSS, HEP(11)	11(CRD)
21	M/74	pT3a/GIII	Radical Cystectomy	-	?	?
22	M/66	pT3/GIII	Radical Cystectomy	-	+? (42)	42(CRD)
23*	M/85	pT3/GIII	Radical Cystectomy	-	- (30)	>30
24	F/68	pT3/GIII	?	?	?	?

Abbreviations: *tumor analyzed was a recurrence of a primary tumor. TUR, transureteral resection of the tumor; BCG, immunotherapy; Mit, endocavitary chemotherapy; HEP, hepatic; LYM, lymph nodes; OSS, osseus; PUL, pulmonary; REN, renal; CRD, cancer related death.

TABLE 2. Distribution of the most frequent chromosome imbalances per tumor



 pT1/GII
  pT1/GIII
  pT2/GII, GIII
  pT3, T4/GIII



5. DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

La caracterització precisa de les regions cromosòmiques implicades en anomalies cromosòmiques constitucionals resulta de gran importància perquè aporten pistes sobre el descobriment de gens implicats en desordres clínics específics. Fins fa poc temps, els mètodes citogenètics clàssics no permetien arribar a identificar certes trisomies i monosomies parcials en les que els segments cromosòmics implicats eren petits o tenien un patró de bandes semblant. L'aplicació al diagnòstic clínic de les noves tècniques citogenètiques moleculars, especialment FISH i CGH, ha permès en els darrers anys la caracterització d'una gran part d'aquestes anomalies cromosòmiques.

1. ALTERACIONS CROMOSÒMIQUES CONSTITUCIONALS

TRISOMIES I MONOSOMIES PARCIALES

En el present estudi ens vàrem plantejar en primer lloc, aplicar la tècnica de CGH, en combinació amb FISH, per tal de caracteritzar els segments implicats en trisomies i monosomies parcials que prèviament havien estat detectades mitjançant bandes G en pacients amb malformacions congènites. Aquest estudi es va portar a terme tant a partir de limfòcits com d'amniòcits (casos 1-5; inclosos als articles 1 i 2). En tots els casos l'anomalia cromosòmica va ésser homogènia, es a dir, no es presentava mosaïcisme i es varen estudiar tant anomalies heretades com originades de novo. L'aplicació d'aquestes tècniques va permetre la caracterització completa de les alteracions cromosòmiques estudiades tal i com s'indica a la Taula 1.

Taula 1. Resultats de les anàlisis realitzades mitjançant citogenètica convencional, FISH i CGH

N	Cariotip (bandes G)	FISH	CGH	RESULTAT FINAL
1	46,X,add(Y)(q12)	ish der(Y)t(Y;15)(q12;q25)	rev ish enh(15q25)	46,X,add(Y)(q12).rev ish der(Y)t(Y;15)(q21;q25)enh(15q25)
2	46,X,add(X)(q28)	ish der(X)t(X;X)(p21;q28)	rev ish enh(Xp21)	46,X,add(X)(q28).rev ish der(X)t(X;X)(p21;q28)enh(Xp21)
3	46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;q11),del(18)(p?)	ish del(18)	rev ish dim(18p11.3pter)	46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;q11),del(18).rev ish dim(18p11.3pter)
4	46,XX,del(18)(p?)	ish del(18)	rev ish dim(18p11.3pter)	46,XX,del(18).rev ish dim(18p11.3pter)
5	46,XX,add(15)(p12)	ish dup(15)	rev ish enh(15q11q13)	46,XX,dup(15)(p12),ish dup(15)(wcp15+), rev ish enh(15q11q13)

* N pacients

Es interessant destacar que si bé la CGH ens ha permès identificar els segments cromosòmics guanyats en totes les trisomies parcials analitzades (pacients 1,2 i 5), per caracteritzar completament l'anomalia cromosòmica s'han requerit les dades obtingudes per bandes G i FISH per determinar els punts de trencament i el lloc exacte del cariotip on s'ubicaven els fragments. Conèixer aquests dos aspectes, es de gran importància ja que el segment cromosòmic addicionat pot tenir diferents repercussions fenotípiques segons es trobi en una o altra regió cromosòmica.

Les nostres observacions, com les d'altres autors, confirmen com moltes alteracions cromosòmiques constitucionals poden ésser identificades de una forma precisa en diagnòstic pre i postnatal amb la utilització conjunta de les diferents tècniques de citogenètica convencional i molecular (Nacheva et al. 1998; Daniely et al. 1999; Lapierre et al. 2000) incloent-hi delecions críptiques (Breen et al 1999).

Interpretació dels perfils de CGH a l'analitzar anomalies cromosòmiques constitucionals

La tècnica de CGH originàriament va ésser desenvolupada per l'anàlisi citogenètica de mostres tumorals. En aquest tipus de mostres, per tal d'evitar els artefactes tècnics deguts a supressió insuficient del DNA repetitiu que poden comportar interpretacions errònies (falsos positius) es varen acceptar les recomanacions proposades per Kallionemi et al. (1994) i DuManoir et al. (1995). Segons aquests autors, en l'anàlisi dels perfils obtinguts per CGH s'han d'excloure les regions centromèriques, telomèriques, les corresponents als braços curts dels cromosomes acrocèntrics, les regions 1p32---pter, 1q12, 9q12, 16q12 i els cromosomes 19 i 22 sencers. Es a dir, en relació als canvis (guanys i pèrdues) que afecten a regions telomèriques detectades en els perfils de CGH, cal actuar amb precaució donat que a vegades es pot observar reducció de les intensitats fluorescents verdes i vermelles sense existir desequilibris reals, induint per tant a errors.

Els resultats de CGH del pacient 2 no mostren només la duplicació de la regió Xp21-pter sinó que també evidència la pèrdua de la regió Xq28-qter. Si acceptéssim les recomanacions, anteriorment descrites, respectes als canvis genòmics en regions telomèriques no podríem acceptar aquest desequilibri a la regió Xqter. Però, en el nostre cas, basant-nos en els resultats obtingut per FISH i Bandes G podem acceptar com real la existència de la delecio Xq28-qter en aquest pacient (en el que no s'ha detectar mosaïcisme).

En els pacients 3 i 4, la deleció críptica de la regió 18p11.3-pter va ser confirmada mitjançant CGH tant en la mare com en el fill. Prèviament, els cariotips realitzats a dos pacients feien plantejar, la presència d'una deleció terminal que també s'evidenciava per FISH. En ambdós casos, no es va trobar cap translocació que afectés el cromosoma 18 després de ser analitzat amb una FISH amb prova de tintat pel cromosoma 18. Aquest és el quart cas a la literatura d'una monosomia 18p heretada, no associada a la presència d'una translocació desequilibrada. Com en el cas anterior, si acceptéssim les recomanacions respectes als canvis genòmics en regions telomèriques no podríem acceptar aquest desequilibri a la regió 18pter.

Tots aquests resultats suggereixen que, per el que respecta a les anomalies cromosòmiques constitucionals, la CGH pot ésser vàlida en la determinació de desequilibris que afecten a regions considerades fins ara "conflictives" com les telomèriques. Aquesta hipòtesis estaria recolzada per les observacions realitzades per Gaffari et al. (1998) en el que mostren l'utilitat de la CGH per definir un marcador supernumerari que afectava al cromosoma 19 (considerat conflictiu) i les dades de membres del nostre grup (Hernando et al. 2002) en les que es mostra com la CGH permet caracteritzar delecions pròximes a la regió crítica 16qh com la deleció del(16)(p11.2).

Contribució de la CGH al establiment de les associacions genotip-fenotip

La combinació de tècniques citogenètiques convencionals i moleculars no solament és útil per l'identificació precisa de les regions i punts de trencament implicades en reorganitzacions cromosòmiques, duplicacions o delecions presents en pacients amb malformacions congènites sinó que és molt important a l'hora d'establir les correlacions genotip-fenotip i indicar les regions cromosòmiques on es localitzen els gens responsables dels desordres clínics.

La comparació dels trets clínics presents en els nostres pacients amb casos publicats prèviament amb alteracions cromosòmiques idèntiques o similars, ha permès detectar anormalitats clíniques comunes contribuint en el establiment de les associacions genotip-fenotip corresponents.

La presència de hipotonia severa, de ronyó en ferradura, i l'asimetria facial presents en el pacient 1, són característiques clíniques comunes associades amb la trisomia 15 parcial. En la revisió bibliogràfica realitzada per Chander et al. (1997) descriuen com la major part dels casos amb una duplicació de la regió distal de 15q són deguts a translocacions desequilibrades, freqüentment derivades d'una translocació equilibrada present en un dels progenitors, generalment la mare. Només han estat descrits a la literatura uns pocs pacients amb un cariotip 46,X,der(Y)t(Y;15); essent els punts de trencament en la major part dels casos: Yq12 i 15p11. Fins ara, només un cas amb un der(Y)t(Y;15q) ha sigut publicat per sense indicar els punts de