



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**ESTUDI DE LA INESTABILITAT  
CROMOSÒMICA EN LIMFÒCITS DE SANG  
PERIFÈRICA I EN L'UROTÈLI VESICAL**

**Memòria presentada per**

Núria Pujol i Escobar

**Per optar al títol de**

Doctora en Biologia cel·lular

**Tesi realitzada sota la direcció de**

Dra. Rosa Miró Ametller

Dra. Immaculada Ponsa Arjona

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

Rosa Miró Ametller

Immaculada Ponsa Arjona

Núria Pujol Escobar

Bellaterra, desembre de 2015



*A Iñaki*

*Als meus pares*

*I al Rudy i a l'Emma*



*“Fes de la teva vida un somni ,  
i del teu somni una realitat”*

*Antoine De Saint Exupery*



*Gràcies a tots per aquesta realitat!*



**SUMARI**

<b>1. INTRODUCCIÓ</b>	<b>1</b>
<b>1.1. EL CÀNCER DE BUFETA</b>	<b>3</b>
1.1.1. Incidència dels carcinomes urotelials	4
1.1.2. Classificació TNM i grau dels tumors urotelials	5
1.1.3. Característiques moleculars del carcinoma urotelial	7
Inestabilitat cromosòmica i alteracions en el nombre de còpies	7
Mutacions de seqüència	8
Cromosoma 9	9
<i>FGFR3</i>	10
Vies de senyalització	10
Models de progressió i subtipus d'acord amb l'expressió gènica	14
Multifocalitat i característiques moleculars de l'uroteli pre-neoplàsic	16
1.1.4. Factors de risc del carcinoma urotelial	17
Ambientals	18
Genètics	27
<b>1.2. INESTABILITAT CONSTITUCIONAL</b>	<b>30</b>
1.2.1. CFS, common fragile sites	30
Expressió dels CFS i càncer	31
Característiques moleculars dels CFS	32
1.2.2. Inestabilitat cromosòmica i mosaïcisme somàtic	38
Mosaïcisme somàtic	40
<b>2. PREMISSA I OBJECTIUS</b>	<b>45</b>
PREMISSA	47
OBJECTIUS	47
<b>3. MATERIAL I MÈTODES</b>	<b>49</b>
MOSTRES BIOLÒGIQUES	51
<b>3.1. LIMFÒCITS</b>	<b>51</b>
Obtenció de les mostres	51
Cultiu cel·lular	54
Hibridació in situ fluorescent per l'anàlisi dels loci 9p21 i <i>CCND1</i>	58
<b>3.2. BUFETES</b>	<b>63</b>
Obtenció de les peces de cistectomia radical	63



---

Empremtes de teixit	66
Hibridació in situ fluorescent amb oligonucleòtids marcats	68
<b>3.3. ANÀLISI ESTADÍSTICA</b>	<b>71</b>
<b>4.RESULTATS</b>	<b>73</b>
<b>CAPÍTOL 1: INDUCCIÓ DE FRAGILITAT EN LIMFÒCITS HUMANS CULTIVATS AMB APH</b>	<b>75</b>
Discussió	81
<b>CAPÍTOL 2. ESTUDI DE VARIACIONS EN EL NOMBRE DE COPIES DELS LOCI 9P21 I CCND1 EN LIMFÒCITS HUMANS</b>	<b>85</b>
Estudi del gen <i>CCND1</i> /Centròmer 11	89
Locus 9p21/centròmer 9	96
Discussió	101
<b>CAPÍTOL 3. ESTUDI D'INESTABILITAT CROMOSÒMICA EN LA MUCOSA UROTELIAL</b>	<b>105</b>
PEÇA DE CISTECTOMIA 1	110
PEÇA DE CISTECTOMIA 2	118
Discussió	125
<b>5. DISCUSSIÓ</b>	<b>131</b>
<b>6. CONCLUSIONS</b>	<b>141</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>145</b>

**ABREVIATURES**

4-ABP	<i>4-Aminobiphenyl</i>
Acr	Acroleïna o acetaldehid
APH	<i>Aphidicolin</i>
APOBEC	<i>Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme Catalytic polipeptide-like</i>
ASR	<i>Age-Standardized Rate</i>
AT	Adenina - Timina
ATM	<i>ATM serine/threonine kinase</i>
B(a)P	Benzo- $\alpha$ -pirè
BC1	Càncer de bufeta, <i>Bladder Cancer</i>
<i>BRINP1</i>	<i>Bone morphogenetic protein/retinoic acid inducible neural-specific 1</i>
<i>DBC</i>	<i>Deleted in bladder cancer 1</i>
<i>CCND1</i>	<i>Cycline D1</i>
CDK	Quinasa depenent de ciclina
<i>CDKI</i>	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitors</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
<i>CDKN2B</i>	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B</i>
CFS	Common fragile site
CGH	Hibridació genòmica comparada
CHSB	<i>Chromosome break</i>
CHSG	<i>Chromosome gap</i>
CHTB	<i>Chromatide break</i>
CHTG	<i>Chromatide gap</i>
CIS	Carcinoma in situ
CNA	<i>Copy number alterations</i>
CNV	<i>Copy number variantion</i>
<i>CYP1A1 o P450 1A1</i>	<i>Cytochrome P450 mono-oxygenase 1A1</i>
<i>DBC1</i>	<i>Deleted in bladder cancer 1</i>
DDR	<i>DNA damage response</i>
DSB	<i>Double strand break</i>
dsDNA	<i>Double strand DNA</i>
EAU	<i>European Association of Urology</i>
<i>ERCC2</i>	<i>Excision repair cross-complementation group 2</i>

ERFS	<i>Early replicating fragile sites</i>
ETS	<i>Environmental Tobacco Smoke</i>
FADO	<i>Failure in activation of dormant origins</i>
FANCA	<i>Fanconi anaemia complementation group A</i>
FGFR3	<i>Fibroblast growth factor receptor 3</i>
FISH	Hibridació in situ fluorescent
FS	<i>Fragile site</i>
GC	Guanina - Citosina
GDB	<i>Genome Database</i>
GSH	Glutatió
GST	Glutatió S-transferasa
GWA	<i>Genome-wide analyses</i>
HDAC	<i>Histone deacetylase</i>
HRR	<i>Homologous recombination repair</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IFN- $\alpha$ o IFNA1	Interferó- $\alpha$
LINE	<i>Long Interspersed Nuclear Elements</i>
LOH	Pèrdua d'heterozigocitat
LSI	<i>Locus specific identifier</i>
Mb	Megabase
MER	<i>Medium Reiterated</i>
MIBC	<i>Muscle-invasive bladder cancer</i>
<i>mTOR</i>	<i>Mammalian TOR</i>
NAT	N-acetil transferasa
NER	<i>Nucleotid excission repair</i>
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>
NM	Nombre modal
NMIBC	<i>Non-muscle-invasive bladder cancer</i>
<i>NOTCH</i>	<i>Via NOTCH 1</i>
PAH	<i>Polycyclic aromatic hydrocarbon</i>
PBL	Limfòcits de sang perifèrica
PH	<i>Domini d'homologia amb la pleskstrin</i>
PHA	<i>Phytohemaglutinine</i>
<i>PI3K o PI3KCA</i>	Fosfatidilinositol-3-quinasa
<i>PTCH1</i>	<i>Patched 1 (Drosophila) homolog</i>
RB1	Proteïna del retinoblastoma

RER	Resposta a l'estrès replicatiu
RTK	Receptor amb activitat tirosina quinasa
RTU	Resecció transuretral
SBC/ EPICURO	<i>Spanish Bladder Cancer/ EPIdemiology of Cancer of the UROthelium</i>
SC	<i>Stem Cell</i>
SCC	<i>Squamous Cell Carcinoma</i>
SCNA	<i>Somatic Copy Number Alterations</i>
SD	Desviació típica o desviació estàndard
SH2	<i>Src homology region</i>
SHH	<i>Sonic hedgehog</i>
SNPs	<i>Single nucleotid polymorphism</i>
SSB	<i>Single strand break</i>
ssDNA	<i>Single strand of DNA</i>
ssRNA	<i>Single strand of RNA</i>
SULT	Sulfotransferasa
TACC3	<i>Transforming, acid coiled-coil containing protein</i>
TCC	<i>Transitional Cell Carcinoma</i>
THM	Trihalomentans
TNM	Tumor-nòdul-metàstasi
TSC1	<i>Tuberous Sclerosis 1</i>
TSC2	<i>Tuberous Sclerosis 2</i>
TSG	<i>Tumors supressor gene</i>
UPD	<i>Uniparental disomy</i>
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
WNT	<i>Wingless type</i>



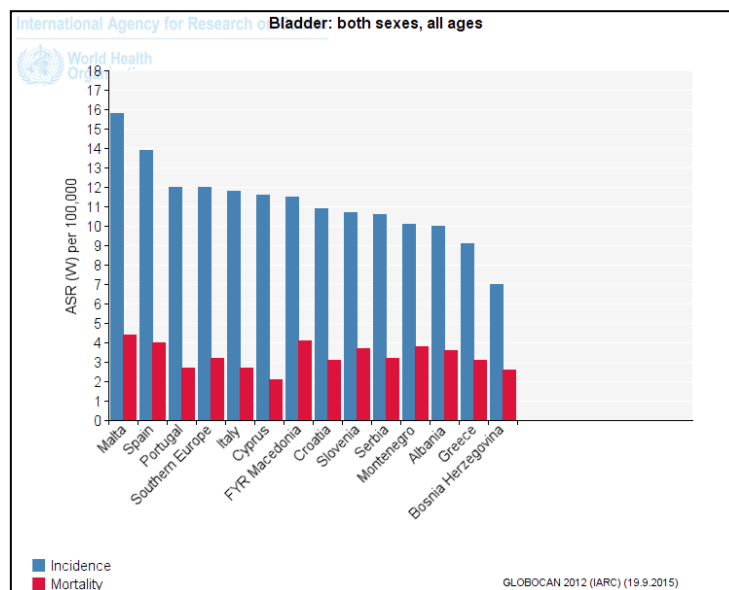
# **1. INTRODUCCIÓ**



## 1.1. EL CÀNCER DE BUFETA

Després de les malalties cardiovasculars, el càncer representa la segona causa de mort en els països desenvolupats. Al 2015, el càncer és la principal causa de mort tant en els països desenvolupats com en els països en vies de desenvolupament (Torre et al. 2015).

El càncer de bufeta és la neoplàsia més freqüent del tracte urinari i, a nivell mundial, el sisè càncer més comú en homes (Torre et al. 2015) i el dissetè en dones (Babjuk et al. 2013). El projecte GLOBOCAN 2012 (registre en forma de base de dades de la WHO, *World Health Organization*) estima ~ 430.000 nous casos per any i ~ 165.000 morts per any a tot el món (Torre et al. 2015). El risc promig de desenvolupar una neoplàsia varia entre continents i regions, no obstant, la incidència més elevada es troba al sud d'Europa (Torre et al. 2015), i concretament, segons el projecte GLOBOCAN 2012, Espanya ocupa el segon lloc (figura 1.1.1), entre Malta i Portugal (Witjes et al. 2014).



**Figura 1.1.1** Estimació de la incidència i de la taxa de mortalitat per el càncer de bufeta pels dos sexes en els països del Sud-Europa. ASR (W) (*Age-Standardized Rate*) (WHO and IARC).

El 98% dels tumors que afecten a la bufeta són d'origen epitelial (carcinomes) (Volanis et al. 2010). A més, en el moment del diagnòstic, aproximadament el 85% es troben confinats a la mucosa urotelial, per tant, no són tumors múscul infiltrants. Com a



principals factors de risc en el desenvolupament d'un carcinoma urotelial destaquen el tabac i l'exposició ocupacional (Babjuk et al. 2013).

### **1.1.1. Incidència dels carcinomes urotelials**

Les vies urinàries, és a dir, les pelvis renals, els urèters, la bufeta i la uretra, constitueixen una unitat des del punt de vista morfològic, funcional i clínic. No obstant, les neoplàsies de les vies urinàries difereixen en la seva incidència i, per tant, en la seva repercussió clínic.

Els carcinomes urotelials del tracte urinari superior (urèters i calzes renals) només representen del 5 al 10% dels carcinomes, i són més freqüents els carcinomes dels calzes renals que els ureterals. El 60% d'aquests carcinomes del tracte urinari superior són invasius en el moment del diagnòstic (Rouprêt et al. 2015; Babjuk et al. 2013).

Els carcinomes urotelials del tracte urinari inferior són els més freqüents. Aquí trobem el carcinoma uretral, el qual està considerat com un carcinoma rar ja que representa menys d'un 1% de tots els tumors urotelials (Gakis et al. 2013), i el carcinoma urotelial de bufeta o vesical. El carcinoma urotelial de bufeta o vesical és el tumor més freqüent del tracte urinari inferior i representa del 90 al 95% dels tumors que afecten a les vies urinàries (Rouprêt et al. 2015).

Des del punt de vista histològic, del 90 al 95% dels tumors de bufeta diagnosticats *de novo* als països occidentals són del tipus urotelial (Eble et al. 2004) també coneguts com carcinomes de cèl·lules transicionals o TCC (*Transitional Cell Carcinoma*). Actualment el terme TCC està en desús i es parla de carcinoma urotelial per fer referència exclusivament als tumors derivats del revestiment epitelial del sistema urinari (Humphrey 2004; Wu et al. 2009). El 5% restant, són els carcinomes no urotelials, rars o inusuals. Aquí es troba el carcinoma de cèl·lules escamoses o SCC (*Squamous Cell Carcinoma*) o carcinoma epidermoide, que representa del 2 al 5% (Dahm i Gschwend 2003; Abol-Enein et al. 2007) i el carcinoma glandular o adenocarcinoma o carcinoma mucinós que representa del 0,5 al 2% de les neoplàsies de bufeta i, per tant, constitueix el tercer tipus histològic més freqüent (Grignon et al. 1991; Eble et al. 2004; Abol-Enein et al. 2007).

## 1.1.2. Classificació TNM i grau dels tumors urotelials

L'estadi patològic del tumor és proporcionat per la classificació TNM (Tumor – Nòdul - Metàstasi). Té un valor pronòstic en la progressió i es considera una de les eines més importants a l'hora d'estratificar els pacients. Valora l'extensió anatòmica del tumor basant-se en tres components: T, extensió del tumor primari; N, absència o presència d'extensió metastàtica a nòduls limfàtics regionals; M, absència o presència de metastasi distant. El nombre de nòduls limfàtics positius també permet estratificar els pacients des del punt de vista del pronòstic. De fet, tant l'extensió extravescical com el nombre de nòduls limfàtics positius presenten un valor en la recurrència de la malaltia (Copp et al. 2006). Els components TNM van seguits d'un número que indica l'extensió de la malaltia. Al 2009 es va realitzar l'última actualització en la classificació TNM (taula 1.1.1).

**Taula 1.1.1.** Classificació TNM 2009 dels carcinomes urotelials (Witjes et al. 2014)

<b>T- Tumor primari</b>	
<b>TX</b>	No es pot valorar el tumor primari
<b>T0</b>	No hi ha evidències del tumor primari
<b>Ta</b>	Carcinoma papil·lar no invasiu
<b>TIS o CIS</b>	Carcinoma <i>in situ</i> (tumor pla)
<b>T1</b>	Tumor que envaeix el teixit connectiu subepitelial (làmina pròpia)
<b>T2</b>	Tumor que envaeix el múscul.
	T2a Tumor que envaeix el múscul superficial (meitat més interna)
	T2b Tumor que envaeix el múscul profund (meitat més externa)
<b>T3</b>	Tumor que envaeix el teixit perivesical
	T3a Microscòpicament
	T3b Macroscòpicament (massa extravescical)
<b>T4</b>	Tumor que envaeix òrgans adjacents
	T4a Tumor que envaeix la pròstata, l'úter o la vagina
	T4b Tumor que envaeix la paret pèlvica o l'abdominal
<b>N- Ganglis limfàtics regionals</b>	
<b>NX</b>	No es pot valorar.
<b>N0</b>	No hi ha metàstasi en ganglis limfàtics regionals
<b>N1</b>	Metàstasi en un únic nòdul a la pelvis
<b>N2</b>	Metàstasi en múltiples nòduls a la pelvis
<b>N3</b>	Metàstasi en els ganglis limfàtic ilíacs
<b>M- Distància de la metàstasi</b>	
<b>MX</b>	No es pot valorar
<b>M0</b>	No hi ha metàstasi
<b>M1</b>	Existeix una metàstasi distant

El grau de malignitat tumoral és un concepte basat en les característiques microscòpiques de la cèl·lula neoplàsica, nuclear i arquitectura, que pretén predir el comportament tumoral, estratificar els pacients i definir una estratègia terapèutica (Busch i Algaba 2002). La primera classificació es va realitzar en funció del grau d'anaplàsia que presenten les cèl·lules neoplàsiques en G1, G2 i G3 (Mostofi F.K. 1973) que és la classificació utilitzada en aquest treball. Posteriorment la WHO al 2004 va proposar un altre sistema de classificació histològica en graus (Hofmann et al. 2006).

En el moment del primer diagnòstic, aproximadament del 75 al 85% dels pacients presenten lesions no-múscul invasives o superficials, confinades a la mucosa (Ta, TIS o CIS) o a la submucosa (T1). Aproximadament el 70% són lesions Ta, el 20% T1 i el 10% lesions CIS (Colombel et al. 2008; Van Rhijn et al. 2012; Babjuk et al. 2013). Aquests carcinomes urotelials s'inclouen en la categoria de càncer de bufeta no múscul invasiu o NMIBC (*Non-muscle-invasive bladder cancer*) amb una elevada recurrència (50-70%) però amb un baix risc de progressió (10-15%) i amb una supervivència d'aproximadament el 90% (Babjuk et al. 2013; Knowles and Hurst 2015).

Aproximadament del 15 al 25% dels carcinomes de bufeta són múscul invasius (MIBC, *Muscle-invasive bladder cancer*) (T2-T4) en el moment del diagnòstic i estan associats a un mal pronòstic. Solen ser carcinomes d'alt grau i amb un elevat risc de progressió (Witjes et al. 2014). La taxa de supervivència als 5 anys és del 50%. En els carcinomes múscul invasius és important determinar el grau de les lesions a l'hora d'establir el pronòstic.

Per tant, des del punt de vista histopatològic, es defineix el model de dues vies, el qual proposa que els NMIBC s'originen a partir d'una hiperplàsia epitelial, mentre que els MIBC es desenvolupen a partir d'una displàsia plana i CIS. Les característiques moleculars d'aquests dos tipus de carcinomes, són molt diferents tal i com han demostrat els estudis realitzats fins el moment.

### 1.1.3. Característiques moleculars del carcinoma urotelial

De la mateixa manera que la majoria de tumors sòlids epitelials, els tumors urotelials de bufeta es caracteritzen per l'acumulació de múltiples alteracions genètiques i epigenètiques.

#### Inestabilitat cromosòmica i alteracions en el nombre de còpies

Mentre que els NMIBC presenten cariotips quasi - diploides, de l'ordre de 35 a 57 cromosomes amb poques reorganitzacions cromosòmiques i genèticament estables, els MIBC solen presentar cariotips aneuploides amb moltes alteracions cromosòmiques i genèticament inestables incloent el fenomen de la cromotripsí (Cheng et al. 2011; Morrison et al. 2014).

Pel què fa a les alteracions cromosòmiques numèriques, els principals cromosomes implicats són l' 1, 8, 9, 10, 11, 13 i 14, on la determinació d'aquestes alteracions en els NMIBC té un elevat factor predictiu de recurrència i, a més, s'està proposant que aquesta determinació sigui també utilitzada per discernir entre grups d'alt i baix risc (Cheng et al. 2011).

A nivell estructural destaquen les delecions i les pèrdues d'heterozigositat (LOH, *Loss of Heterozigosity*) que condueixen a un canvi en el nombre de còpies d'un gen, freqüentment un gen supressor de tumors. Una delecio focal freqüentment observada en el càncer de bufeta afecta a *CDKN2A* (9p21.3) (Cairns et al. 1994; Williamson et al. 1995). També s'ha observat que les delecions en 2q, 5q i 8p estan associades a un comportament agressiu (Hurst et al. 2012; Lindgren et al. 2012).

Estudis realitzats en el nostre laboratori han permès identificar diferents subgrups de tumors caracteritzats per predominança de pèrdues o de guanys. Les alteracions més freqüents en Ta i en T1 són pèrdues de 8p, 9p, 9q, i 11p, i guanys en 1q, 8q, 11q i 20q (Prat et al. 2001). A més, en el cas dels tumors T1 s'han observat diferències entre ells, com poden ser guanys en 6p i 10p, i pèrdues en 5q, 6q i 18q, més freqüents en T1G3 que en T1G2 (Prat et al. 2010). A més a més, s'ha demostrat que a mesura que els tumors progressen augmenta el nombre de desequilibris, d'amplificacions gèniques

i d'alteracions en el nombre de còpies somàtiques (SCNA, *Somatic Copy Number Alterations*) (Rigola Tor, 2008; Del Rey Azpiri, 2009.).

A més d'amplificacions en oncogens coneguts, tals com: *E2F3*, *FGFR1*, *CCND1* i *MDM2*, s'han detectat amplicons a 1q21-q24, 1q22-q23, 3p25, 8p11, 8p11-12, 11p15, 19q i 20q11, i delecions a 2q21, 2q34, 4q22, 5q12, 6p25 i 16p13 (TCGA 2014). Concretament, l'amplificació de *CCND1* present en forma de diminuts dobles té un pitjor pronòstic en tumors NIMBC (Del Rey et al. 2010).

## Mutacions de seqüència

Els càncers de bufeta (BC) seqüenciats fins al moment corresponen majoritàriament a MIBC (TCGA 2014). Aquests tumors presenten una mitjana de 7,7 mutacions per Mb dominada per transicions C:G→T:A. De forma interessant, molts dels canvis C:G→T:A es troben en citosines al costat de timines (TpC), un patró característic de les mutacions originades per la família de les citosina desaminases APOBEC (*apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like*). A més, *APOBEC3B* està sobreexpressat en BC.

De forma preferent en tumors MIBC, s'han detectat mutacions inactivadores en gens de reparació del DNA i de punts de control del cicle cel·lular, dels quals destaquen *ERCC2* (*Excision repair cross-complementation group 2*), *ATM* (ATM serine/threonine kinase) i *FANCA* (*Fanconi anaemia complementation group A*). Alteracions d'aquests gens contribuiran a la gran varietat d'alteracions cromosòmiques observades en aquests tumors urotelials (Knowles i Hurst 2015). S'han detectat també alteracions en gens implicats en la cohesió i segregació de cromàtides germanes (Guo et al. 2013).

Els gens més freqüentment alterats, ja sigui per mutació o per alteracions en el nombre de còpies, són: *CDKN2A*, *TP53*, *PIK3CA*, *CCND1*, *ERBB2*, *EGFR*, *HRAS*, *RUNX3*, *TSC1*, *PTEN* i *RB1* entre altres (Knowles i Hurst 2015).

A més, i de forma significativa, s'han detectat mutacions en 4 gens implicats en la regulació epigenètica: *MLL2*, *ARID1A*, *KDM6A* i *EP300* (TCGA 2014).

## Cromosoma 9

La monosomia 9 o les delecions de 9p o 9q es troben en més d'un 50% dels casos de càncer de bufeta de tots els graus i estadis (Knowles i Hurst 2015). Aquesta alteració és considerada un esdeveniment primerenc en la carcinogènesi de la bufeta ja que es troba tant en l'uroteli "normal" com en les lesions amb hiperplàsia dels pacients amb NMIBC (McConkey et al. 2010).

En el braç curt del cromosoma 9 s'hi localitzen gens importants, com els que codifiquen per inhibidors de les quinases dependents de ciclina (*CDKI*, *cyclin-dependent kinase inhibitors*), com per exemple *CDKN2A* i *CDKN2B* (taula 1.1.2). El gen *CDKN2A* dona lloc per *splicing* alternatiu a dues proteïnes: p14<sup>ARF</sup> que és un component crític de la via de p53, i p16<sup>INK4A</sup> que juga un paper important en la transducció de la senyal de la proteïna del retinoblastoma. El gen *CDKN2B* codifica per la proteïna p15<sup>INK4B</sup> que també té un paper en la regulació de la proteïna del retinoblastoma ja que inhibeix el complex CCND1-CDK4 (figura 1.1.2). A 9p22 es localitza l'interferó- $\alpha$  (*IFNA1*), el qual indueix l'apoptosi, i per tant, la seva inactivació contribueix a la progressió de la neoplàsia (McConkey et al. 2010).

**Taula 1.1.2.** Alguns dels gens localitzats en el cromosoma 9 implicats en la carcinogènesi de la bufeta.

Regió cromosòmica	Gen candidat
9p21	<i>CDKN2A</i>
9p21	<i>CDKN2B</i>
9p22	<i>IFNA1</i>
9q22.3	<i>PTCH1</i>
9q32-33	<i>DBC1</i>
9q34	<i>TSC1</i>
9q34.3	<i>NOTCH1</i> <sup>a</sup>

*CDKN2A*, cycline-dependent kinase inhibitor 2A; *CDKN2B*, cycline-dependent kinase inhibitor 2B; *IFNA1*, interferon alpha 1; *PTCH1*, patched 1; *DBC1*, deleted in bladder cancer 1; *TSC1*, tuberous sclerosis 1; *NOTCH1*, noth 1 (Rampias et al. 2014).

En el braç llarg del cromosoma 9 es troben els gens *PTCH1* (*patched 1 (Drosophila) homolog*), *DBC1* (*deleted in bladder cancer 1*) o també anomenat *BRINP1* (*bone morphogenetic protein/retinoic acid inducible neural-specific 1*), *TSC1* (*tuberous sclerosis 1*) i *NOTCH1*. El gen *PTCH1* està localitzat a 9q22.3, una regió que quan es troba delecionada incrementa el risc de recurrència del BC, per tant, potencial gen

supressor de tumor que actua a través de la via SHH (*Sonic Hedgehog*) (McGarvey et al. 1998; Aboukassim et al. 2003). *DBC1* és un locus localitzat en 9q on freqüentment s'observen també LOH en el BC el que també fa pensar que en aquesta regió existeix un potencial gen supressor com *BRINP1* o *DBCCR1* (Habuchi et al. 1998; Nishiyama et al. 1999). També s'han descrit mutacions en els gens *TSC1* i *TSC2* en el BC, destacant que el complex TSC1-TSC2 és regulat per PI(3)K o PI3KCA (fosfatidilinositol-3-quinasa) a través de AKT (figura 1.1.3) (Platt et al. 2009; Sjødahl et al. 2011). Finalment, també s'observa que un 18% dels tumors urotelials presenten mutacions en *NOTCH1*, localitzat a 9q34.3. Recentment s'ha determinat que té un paper supressor de tumors en el càncer de bufeta i que aquestes mutacions no són excloents amb mutacions en *FGFR3* i *RAS* (Rampias et al. 2014).

Malgrat l'elevada freqüència de LOH observada en el cromosoma 9, els estudis de seqüenciació de l'exoma no mostren una freqüència elevada de mutacions pels gens localitzats en el cromosoma 9, de manera que la recerca dels possibles gens supressors de tumors en el cromosoma 9 implicats en el BC encara continua després de més de vint anys de recerca.

## FGFR3

La proteïna *FGFR3* (*fibroblast growth factor receptor 3*) forma part d'una família de receptors amb activitat tirosina quinasa (RTK) implicats en la senyalització cel·lular. Fins a un 80% dels NMIBC Ta presenten mutacions puntuals activadores a *FGFR3* (Grivas et al. 2015; Knowles i Hurst 2015). Aquestes mutacions s'associen a tumors de baix grau i estadi, i amb un pronòstic favorable. Per tant, estan fortament associades a una baixa taxa de recurrència (Cheng et al. 2011). En T1 les mutacions a *FGFR3* són menys freqüents i en els MIBC només representa del 10-20%.

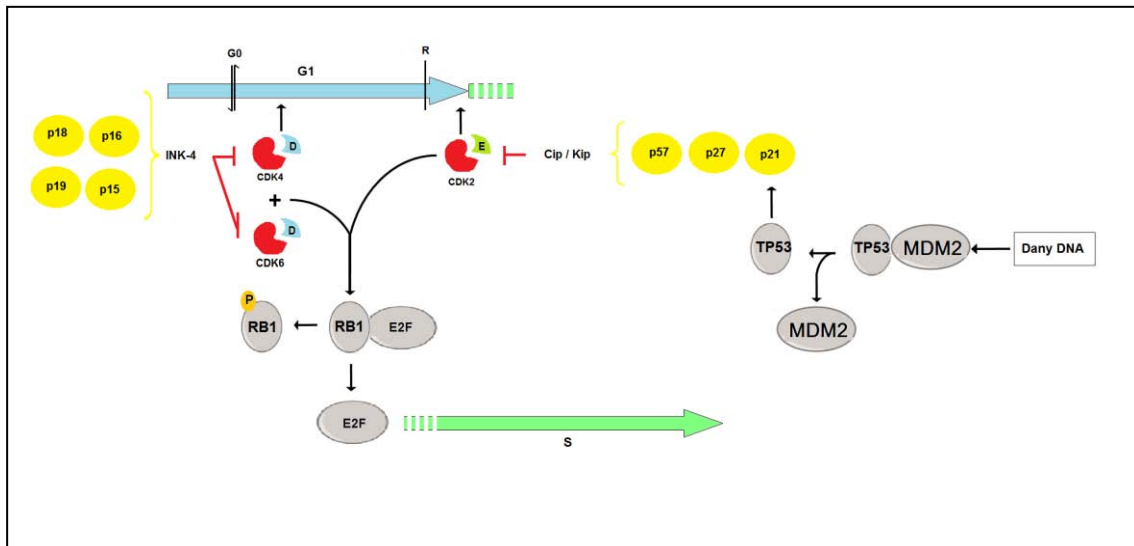
A més, s'han detectat translocacions recurrents que originen el gen de fusió *FGFR3-TACC3*, el qual es tradueix en una proteïna oncogènica fortament activada (TCGA 2014).

## Vies de senyalització

L'anàlisi integrada de les mutacions i del nombre de còpies han revelat tres vies principals freqüentment desregulades en el càncer de bufeta: regulació del cicle cel·lular (alterada en un 93% dels casos); via de senyalització PI(3)K o PI3KCA (72%);

i remodelació de la cromatina, incloent mutacions i CNAs (*copy number alterations*) en gens modificadors d'histones (89%) i en components del complex remodelador del nucleosoma SWI/SNF (64%) (TCGA 2014).

**La via de la regulació del cycle cel·lular** és una diana freqüent en la carcinogènesi com és la desregulació de la progressió per les fases G1 a S del cycle cel·lular. Aquesta transició està intervinguda per la unió de la CDK2/6-ciclina E i la CDK4-ciclina D (CDK, *cyclin-dependent kinase*) (figura 1.1.2). En aquesta línia s'ha observat que un 20% dels NMIBC presenten amplifcacions de la ciclina D (CCND, 11q13), concretament de la D1 i D3, de manera que aquesta amplifcació podria representar un mecanisme d'inactivació del punt de control de la fase G1/S.



**Figura 1.1.2.** Via de la regulació del cycle cel·lular, progressió G1/S del cycle cel·lular eucariota.

Les CDK's actuen fosforilant la proteïna del retinoblastoma (RB1), alliberant el factor de transcripció EF2 que actua a nivell nuclear estimulant la síntesi de la CDK2 i de ciclina E, necessàries per la progressió de la fase G1. Aquesta progressió també està controlada per p16 que s'encarrega d'inhibir el complex CDK4-6/ciclinaD, i per tant, EF2 no es pot alliberar i en conseqüència no es passa el punt de restricció (R). Les proteïnes TP53 i p21 també estan implicades en el control d'aquesta progressió. TP53 es troba unida a MDM2, la qual funciona com un marcador perquè TP53 es degradi. Però si existeix una lesió en el DNA, s'activen diferents enzims que ajuden a separar el complex MDM2-TP53, incrementant la concentració de TP53 que estimula la síntesi de p21, la qual s'uneix al complex CDK2-ciclinaE, inhibint la seva acció. Aquesta inhibició produeix que la cèl·lula no pugui progressar per la fase G1 i, per tant, no entra en fase S (síntesi de DNA) del cycle cel·lular.

D, ciclina D o CCND; E, ciclina E o CCNE

Paral·lelament, en els MIBC les alteracions gèniques es produeixen principalment en les proteïnes implicades en el control del cycle cel·lular. De manera que es troben pèrdues o inactivacions de *TP53*, *RB1* i *p16*, així com amplifcacions o sobreexpressions de *MDM2* i *E2F3*. *TP53* és regulada per *MDM2*, de manera que la



pèrdua de *TP53* implica la sobreexpressió de *MDM2*, de la mateixa manera que la pèrdua de *pRB* o *p16* implica sobreexpressió d'*E2F3* (figura 1.1.2). Totes aquestes alteracions s'associen a un pronòstic desfavorable.

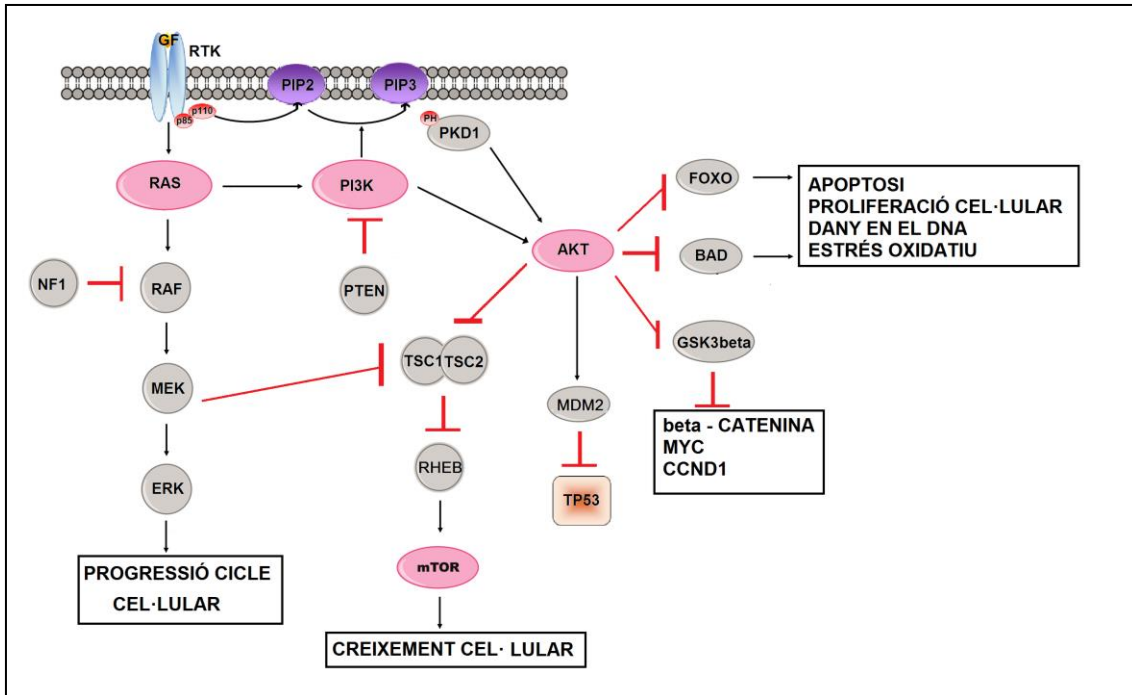
Mutacions al gen *TP53* (17p13) representen aproximadament el 60% de les alteracions genètiques en els MIBC, i és un esdeveniment primerenc (Cheng et al. 2011; Grivas et al. 2015). A més, Czerniak i col·laboradors (2000) van trobar LOH en les regions properes a aquest locus, suggerint la implicació de gens addicionals propers a *TP53* que jugarien un paper en la progressió tumoral. Les mutacions en *TP53* s'associen a un comportament invasiu, risc de recurrència alt i pronòstic desfavorable

La inactivació/pèrdua del gen *RB1* representa el 17% de les alteracions genètiques en els MIBC (Grivas et al. 2015) i és un esdeveniment tardà. Es relaciona amb tumors d'alt grau, invasius i amb disminució de la supervivència.

**La via de senyalització PI(3)K o PI3KCA** pot ser activada per diferents mecanismes tal, com s'indica a la figura 1.1.3. En un 25% dels NMIBC es troben mutacions a PI3K i menys freqüentment en els MIBC (Kompier et al. 2010). PTEN regula negativament PI3K. A més, PTEN acostuma a mostrar LOH en els MIBC, però la inactivació bial·lèlica no és habitual. L'expressió downregulada de *PTEN* en els MIBC està associada a l'alteració de *TP53* i mal pronòstic (Puzio-Kuter et al. 2009).

El fet que mutacions a *FGFR3* i *PIK3CA* concorrin en NMIBC suggereix l'activació cooperativa de les dues vies: MAPK i PI(3)K (Kompier et al. 2010; Juanpere et al. 2012).

En els NMIBC també s'observen mutacions en els oncogens *RAS* (*KRAS*, *HRAS*, *NRAS*), no obstant, si hi ha mutacions en *FGFR3* no hi ha mutacions en *RAS*, tot i que en conjunt representin més del 85% de les mutacions observades en els NMIBC, suggerint una funció similar. Les mutacions en *RAS* es presenten tant en els NMIBC com en els MIBC amb una freqüència del 13% (Grivas et al. 2015).



**Figura 1.1.3.** Via de senyalització PI(3)K o PI3KCA.

L'activació d'un receptor tirosina quinasa (RTK) com és el FGFR3 produeix un increment de la seva activitat tirosina quinasa, fosforilant altres proteïnes citosòliques, com RAS. La presència de tirosines fosforilades en el domini citoplasmàtic - quinasa de FGFR3 atrau proteïnes amb dominis SH2 (*Src homology region*), com la PI3K o PI3KCA (fosfoinositol-3-quinasa), activant la via dels fosfolípids inositols de membrana, com el PIP3 (fosfoinositol 3,4,5-trifosfat) que atrau proteïnes amb dominis PH (*plekstrin homology*) que permeten la seva unió als fosfoinositols de la membrana com: PDK1 (proteïna quinasa 1 dependent de fosfoinositols) i AKT o proteïna quinasa B (PKB). L'activació d'AKT produeix la fosforilació de diferents proteïnes cel·lulars com TSC2, la qual també pot ser fosforilada per MEK, inactivant-la. TSC1 forma un complex amb TSC2 (TSC1-TSC2) el qual regula negativament a mTOR (*mammalian TOR*), de manera que al ser fosforilada no exerceix la seva acció inhibidora sobre RHEB i, per tant, RHEB permet l'activació de mTOR i com a conseqüència, la cèl·lula creix i prolifera descontroladament. mTOR pertany a la família de les PI3K i té un paper central en el control del creixement i proliferació cel·lular. AKT també fosforila a BAD, que al ser inhibida per la fosforilació deixa de promoure l'apoptosi, facilitant la supervivència. RAS pot ser activat per altres RTK com ERBB1 (EGFR), ERBB2 (HER2) i ERBB3 (HER3) que activen principalment la PI3K, la qual genera el mediador PIP3. (adaptada de Grivas (2015) i de Knowles (2015)).

Tal i com s'ha dit, aproximadament un 25% dels NMIBC presenten mutacions activadores de *PI(3)K*, aquestes concretament es concentren a la subunitat catalítica alfa, *PIK3CA* o *p110α*. Les mutacions en *FGFR3* i en *PI3KCA* poden aparèixer a la vegada en els NMIBC suggerint una activació simultània de les dues vies, RAS-MAPK i RAS-PI3K. Les mutacions en *FGFR3* s'associen a un pronòstic favorable, tot i que s'associen a una expansió clonal (Knowles i Hurst 2015).

Mentre que les mutacions en *FGFR3* només representen del 10 al 20% en els MIBC, la sobreexpressió d'*ERBB1*, *ERBB2* i *ERBB3* es troba en alguns MIBC, així com l'amplificació i sobreexpressió d'*ERBB2* és un esdeveniment freqüent en les metàstasi.

La via de **la remodelació de la cromatina** es troba alterada en un elevat nombre de BCs. S'han descrit canvis del patró de metilació generalitzats. Un subtipus majoritari de MIBC presenta un elevat grau d'hipermetilació de seqüències promotores que està associat a l'índex de paquets de tabac fumats per any. Comparacions dels NMIBC i els MIBC han revelat diferents patrons d'hipometilació en regions fora de les illes CpG en els NMIBC i una hipermetilació generalitzada de les illes CpG en els MIBC. Mentre que la hipermetilació dels promotors està lligada a silenciament del gen, la hipometilació dins del gen està normalment associada a sobreexpressió. Estudis d'anàlisi del genoma han identificat mutacions en reguladors de la cromatina que ocorren amb una freqüència més elevada en els MIBC que en altres càncers epitelials (TCGA 2014).

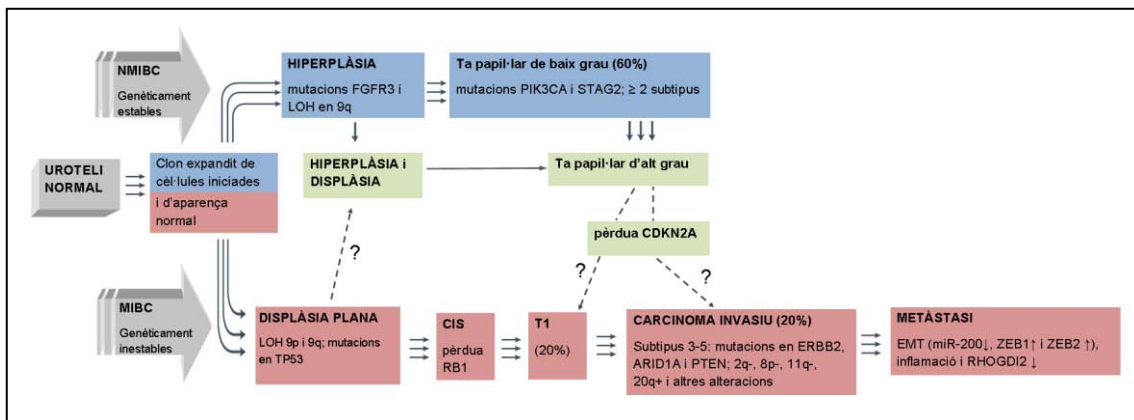
Altres vies afectades en el BC són la de **WNT** (*wingless type*) i **la del SHH** (*sonic hedgehog*). Algun dels components de la via canònica de WNT es troben alterats en el BC i s'ha suggerit una cooperació entre les vies WNT i PI3K (Ahmad et al. 2011). La importància de la via SHH en el BC s'ha demostrat en diversos estudis en els que s'ha suggerit que la progressió de CIS està potenciada per la pèrdua de senyalització SHH (Rebouissou i Héroult 2012). De forma interessant, cal destacar que *SHH*, *BMP4* i *BMP5* es troben infra-expressats en un subtipus de MIBC de tipus basal i particularment agressiu (TCGA 2014).

## **Models de progressió i subtipus d'acord amb l'expressió gènica**

S'ha considerat que els dos grans grups de BC, els MIBC i els NMIBC segueixen dues vies principals amb diferents característiques histopatològiques i moleculars (figura 1.1.4).

El desenvolupament de les alteracions histopatològicament reconeixibles de l'uroteli està precedit per l'expansió clonal de cèl·lules alterades. Els tumors papil·lars de baix grau poden aparèixer a partir d'una simple hiperplàsia o una displàsia mínima i estan caracteritzats per la pèrdua del cromosoma 9 i mutacions activadores de *FGFR3*, *PIK3CA* i *STAG2*. Aquests tumors no invasius presenten recurrències de forma freqüent i són genèticament estables. Es pensa que els carcinomes invasius (MIBC) apareixen a partir d'una displàsia plana i carcinoma *in situ* (CIS), presenten mutacions

de *TP53* a més de delecions del cromosoma 9, però no mutacions de *FGFR3*. Aquests tumors són genèticament inestables i acumulen moltes alteracions genòmiques entre les que destaquen mutacions de *PTEN*, *ARID1*, pèrdues de 2q, 8p, 11q, i guany de 20q. El descobriment d'un subtipus de tumors invasius amb mutació de *FGFR3* i pèrdua de *CDKN2A* pot suggerir una ruta per la qual tumors no invasius d'alt grau poden progressar a múscul invasius (Knowles i Hurst 2015). Gens implicats en la transició epiteli - mesènquima es trobarien implicats en el pas a tumors metastàtics.



**Figura 1.1.4.** Vies potencials de la progressió del carcinoma urotelial.

La identificació de diferents subtipus moleculars suggereix diferents subvies dins de cadascuna de les dues vies principals. En blau està representada la via dels tumors papil·lars de baix grau, els quals es poden originar a partir d'una hiperplàsia i displàsia mínima. A nivell molecular es troben LOH en 9q i mutacions inactivadores del *FGFR3*, *PIK3CA* i *STAG2*. Els tumors solen ser genèticament estables i recurrents. En color vermell està representada la via dels tumors invasius que s'originen a partir d'una displàsia plana i CIS, la qual molecularment mostra mutacions en *TP53* a més de delecions en el cromosoma 9. En aquesta via no s'observen mutacions en *FGFR3*. Els tumors invasius són genèticament inestables i solen presentar moltes alteracions genètiques. Amb fletxa discontinua es representa un possible carcinoma papil·lar Ta d'alt grau originat a partir d'una displàsia plana. El fet de trobar carcinomes invasius amb mutacions en *FGFR3* i pèrdues en *CDKN2A* podria suggerir un ruta a partir dels tumors no papil·lars d'alt grau.

*ARID1A*, *AT-rich interactive domain 1A*; *EMT*, *epithelial-mesenchymal transition*; *RHOGDI1*, *RHO-GDP dissociation inhibitor 2*; *ZEB1*, *zinc-finger E-box binding homeobox 1*.

(adaptada Knowles (2015)).

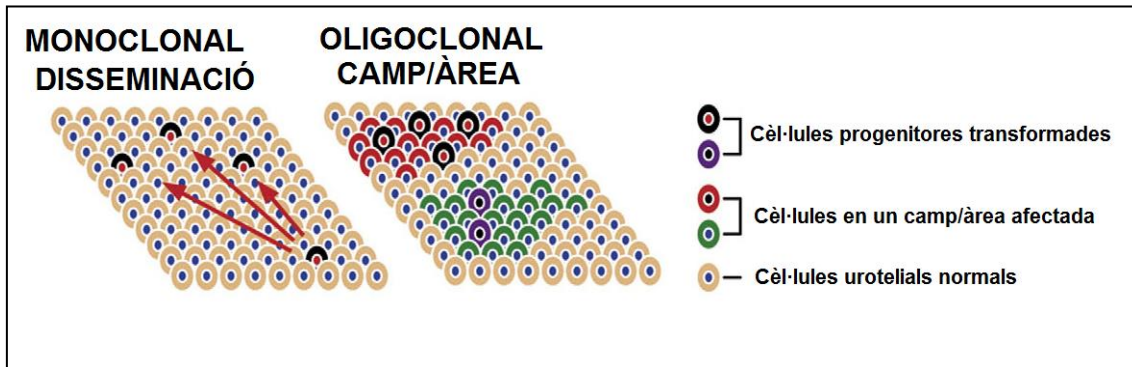
Estudis més recents basats en l'anàlisi d'expressió han evidenciat l'existència de diferents subtipus dins dels MIBC i NMIBC (Sjödahl et al. 2012; Choi et al. 2014; Damrauer et al. 2014; TCGA 2014). Aquests estudis suggereixen de 2 a 4 vies dins de cada un dels dos grups principals. Dins d'aquests subtipus destaquen el basal i el luminal que mostren similituds amb els detectats en càncer de mama.

## Multifocalitat i característiques moleculars de l'uroteli pre-neoplàsic

L'uroteli normal comprèn de tres a sis capes de cèl·lules: una capa de cèl·lules basals proliferativa i menys diferenciada que està en contacte amb la membrana basal; una o més capes de cèl·lules intermèdies, i una única capa de cèl·lules grans superficials anomenades cèl·lules en paraigua (*umbrella cells*) amb una funció especialitzada per acomodar la bufeta al fenomen de contracció i expansió. Gaisa i col·laboradors (2011) suggereixen que l'uroteli s'origina a partir de cèl·lules basals progenitores o *stem cells* (SC). El recent aïllament de cèl·lules mare BC o cèl·lules iniciadores del tumor ha permès determinar les seves característiques mostrant que corresponen a cèl·lules basals en contacte amb l'estroma (Ho et al. 2012; van der Horst et al. 2012). Estudis de llinatge cel·lular han identificat les cèl·lules basals SHH+ com a iniciadores del tumor MIBC en ratolins (Shin et al. 2014). En humans hi ha evidències de cèl·lules no basals com iniciadores de tumors més diferenciats.

La LOH del cromosoma 9 es troba en l'uroteli normal i en la hiperplàsia de pacients amb NMIBC i amb major freqüència que la mutació de *FGFR3*, indicant que la pèrdua del cromosoma 9 és un esdeveniment més primerenc que la mutació de *FGFR3* (Hartmann et al. 1999; Junker et al. 2003).

Una de les característiques dels MIBC és la multifocalitat, és a dir, el desenvolupament de diferents tumors, sincrònics i metacrònics, en el mateix pacient. Els nous models de carcinogènesi suggereixen dues teories per explicar aquesta multifocalitat observada en els tumors urotelials. La teoria monoclonal suggereix que a partir d'una cèl·lula progenitora SC transformada que prolifera i es desplaça lateralment a través de l'uroteli, ja sigui intraluminalment o bé a través d'una migració intraepitelial, es produeix una disseminació de SC transformades (concepte de disseminació). Mentre que la teoria oligoclonal suggereix que es produeix un desenvolupament en camps al voltant d'unes SC que s'han transformat independentment degut a l'acció d'uns carcinògens (concepte de camps), tal i com s'indica en la figura 1.1.5 (Cheng et al. 2011).



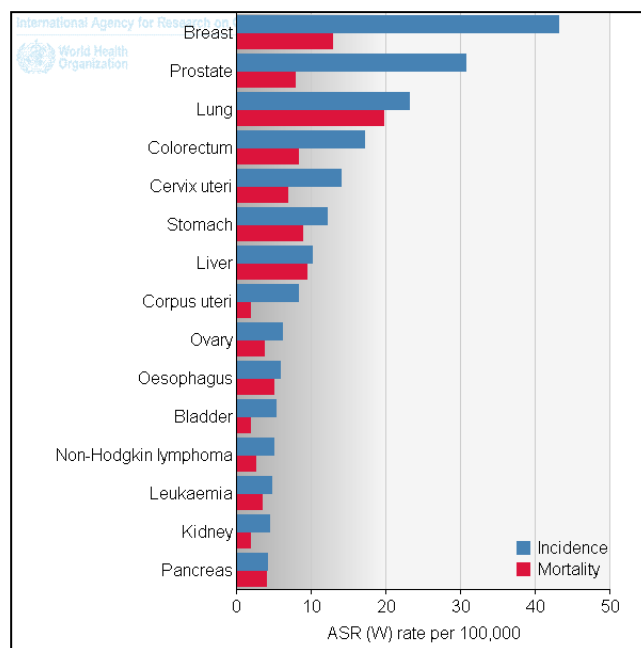
**Figura 1.1.5.** Models de multifocalitat dels carcinomes urotelials (adaptada de Cheng i col·laboradors (2011)).

No obstant, no hi ha consens quina de les dues teories és la prevalent, tot i que els estudis semblen recolzar l'origen oligoclonal dels carcinomes urotelials degut a que és freqüent trobar inestabilitat genètica en la mucosa aparentment "normal" en pacients amb BC. Això ve recolzat perquè els canvis previs a la transformació maligna, displàsia i CIS, acostumen a trobar-se distants al tumor primari invasiu.

Estudis realitzats en el nostre laboratori van detectar que hi havia una relació clonal entre diferents tumors sincrònics i que a més l'heterogeneïtat existent dins d'un mateix tumor reproduïa el comportament de tumors sincrònics independents del mateix pacient (Prat et al. 2008).

#### 1.1.4. Factors de risc del carcinoma urotelial

El BC representa l'onzena neoplàsia a tot el món, amb una incidència a nivell mundial del 3,1% (figura 1.1.6). Tal i com s'indica al principi de la introducció, és una neoplàsia freqüent en els països desenvolupats, tot i que actualment també es veu incrementada en els països en vies de desenvolupament, de manera que es pot associar a un estil de vida occidentalitzat, com representen la inactivitat física, la dieta o l'obesitat, el tabac i l'alcohol entre d'altres (Torre et al. 2015).



**Figura 1.1.6.** Incidència i mortalitat dels càncers més freqüents a nivell mundial.  
Font: GLOBOCAN 2012 (IARC) Section of Cancer Surveillance (21/9/2015)

El carcinoma vesical és una neoplàsia que es manifesta a una etapa tardana de la vida d'un individu, amb una edat igual o superior als 55 anys en el moment del diagnòstic, reflectint un període de latència llarg com a resultat d'una exposició ocupacional i ambiental a carcinògens (Kiriluk et al. 2012). A més, en els països Occidentals s'ha incrementat en un 5% la incidència del carcinoma urotelial de bufeta en els últims 20 anys, degut a l'increment de l'esperança de vida, tot i que la taxa de mortalitat pot haver-se mantingut estable, com ha passat als EUA aquests últims 30 anys (Volanis et al. 2010). No obstant, no tots els individus exposats a aquests carcinògens desenvoluparan una neoplàsia de bufeta, com tampoc afectarà igual a homes i dones, sent tres vegades superior la incidència en homes, fets que suggereixen l'existència de diferències des del punt de vista de la susceptibilitat genètica. De manera que es poden establir uns factors de risc ambientals i genètics que tindrien un impacte en la incidència de la malaltia.

## Ambientals

Durant la vida d'un individu, aquest estarà exposat a diversos factors exògens que poden anar produint canvis heretables en les cèl·lules necessaris per la seva transformació maligne (teoria *multistep* de la carcinogènesi).

## TABAC

Auerbach i Garfinkel (1989) van observar que en els individus fumadors, l'uroteli mostrava un increment del nombre de capes cel·lulars i dels nuclis amb atípia, és a dir, hiperplàsia. A més, els estrats d'aquest uroteli també incrementaven en funció del nombre de cigarrets/dia, o sigui, amb la intensitat de l'hàbit.

### Composició

El fum del tabac, tant si es mesura el fum exhalat després d'una inhalació com si es mesura el després directament de la cigarreta, conté més de 7.000 compostos químics dels quals 69 són classificats com a carcinògens en humans (Kiriluk et al. 2012; Eriksen et al. 2015). Els tres principals grups de carcinògens presents en el tabac són les amines aromàtiques, els hidrocarburs aromàtics policíclics (PAH, *polycyclic aromatic hydrocarbon*) i els aldehyds insaturats.

Les amines aromàtiques són la principal font d'exposició ocupacional però en el fum del tabac també se'n troben, com per exemple la 4-aminobifenil (4-ABP, *4-Aminobiphenyl*), la qual està associada al desenvolupament del càncer de bufeta, ja que s'ha establert una bona correlació entre els nivells d'adductes en l'hemoglobina com a conseqüència de l'exposició al 4-ABP i els nivells totals d'adductes de DNA en exfoliats de cèl·lules urotelials. Per tant, els adductes de DNA presents en l'hemoglobina poden ser considerats com un biomarcador de l'exposició de la bufeta al 4-ABP (Jiang et al. 2007).

Els PAHs es produeixen com a resultat d'una combustió o piròlisi incompleta de la matèria orgànica. Es poden trobar en forma de gas o de partícules. Tant la IARC (*International Agency for Research on Cancer*) com la USEPA (*United States Environmental Protection Agency*) han classificat els PAHs com a potencials carcinògens humans o pro-carcinògens, i per tant, implicats en la inducció de tumors en pulmó, bufeta i pell (Cohen i Johansson 1992; Dor 1999). Els PAHs són compostos molt ubics, els trobem en l'aire produït per la combustió incompleta de la fusta, dels combustibles fòssils o de les calefaccions, en el menjar i en l'aigua, en productes farmacèutics, en el sòl i sediments, i en les emissions dels processos industrials, i evidentment en el tabac. Quan s'inhala el fum del tabac, es produeix una combustió incompleta, generant elevats nivells de PAHs i aquests passen directament a l'epiteli bronquial, però també poden difondre's a través de les membranes cel·lulars i ser absorbits en el tracte intestinal o difondre's a través de la pell (WHO and IARC 2010).



Per tant, els PAHs presenten tres vies d'entrada: inhalació, difusió a través de les biomembranes i a través de la pell (Castano-Vinyals et al. 2004).

Per la bioactivació tant de les amines aromàtiques com pels PAHs es requereix una expressió local del citocrom P450 1A1 o CYP1A1 (cytochrome P450 mono-oxygenase 1A1), produint metabòlits intermedis altament reactius, que es poden unir covalentment al DNA formant adductes i produint mutacions, inicialitzant el procés tumorigènic per activació d'oncogens (Bartsch et al. 2000; WHO and IARC 2010; Bolt 2014). De manera que un cop absorbits, són metabolitzats ràpidament a uns metabòlits més solubles i reactius, tipus epòxids, fenols, dihidrodols, entre d'altres. Els mateixos PAHs poden induir l'expressió del CYP, és a dir, el seu propi metabolisme. D'aquí que molts autors considerin que el nivell d'adductes pugui ser utilitzat per quantificar el risc carcinogènic d'un compost. En una segona fase, els epòxids i fenols poden transformar-se espontàniament a fenols, o bé conjugar-se amb sulfats, amb el glutatió (GSH) o amb l'àcid glucurònic.

Els PAHs s'excreten principalment per la femta, la secreció biliar i només un 10% s'eliminen per la orina. La composició de PAHs dependrà de la matèria d'origen, no obstant, el PAH més comú en el tabac és el benzo- $\alpha$ -pirè o B(a)P. Un cop s'ha produït l'exposició als PAHs, els biomarcadors d'exposició més utilitzats són l'1-hidroxi- $\alpha$ -pirè en orina i els adductes PAH-DNA o PAH-proteïna, en sang o sèrum. Els adductes PAH-DNA presents en els limfòcits tenen una vida mitja de mesos, mentre que els adductes en PAH-proteïna dependran del tipus de proteïna. Per exemple, en l'albumina la vida mitja és al voltant de 20 dies i en l'hemoglobina de 120 dies. En nombrosos estudis s'ha trobat una bona correlació entre els nivells d'1-hidroxi- $\alpha$ -pirè i adductes PAH-DNA amb les concentracions de B(a)P, no obstant, aquesta correlació no és així en el cas dels adductes PAH-proteïnes. Castaño-Vinyals i col·laboradors (2004) no troben que els adductes en proteïnes siguin uns bons biomarcadors d'exposició al B(a)P, i confirmen que sí ho són els nivells d'1-hidroxi- $\alpha$ -pirè i adductes PAH-DNA. Segons la IARC, al 2004, els nivells de PAH en el fumador actiu es va calcular d'1 a 1,6  $\mu\text{g}$ /cigarret i en el fumador passiu en un ambient tancat, la concentració de PAHs es va calcular de 52-95 ng/cigarret.

I dins el grup dels aldehids insaturats es troba l'acroleïna o acetaldehid (Acr), que representa la forma més simple d'aldehid insaturat, present tant en el fum del tabac com en els fums de cuinar. Un cigarret conté entre 10-140  $\mu\text{g}$  d'acroleïna (Cohen et al. 1992). L'Acr també es pot generar endògenament, per oxidació dels lípids o sota

condicions d'estrès oxidatiu. L'Acr pot interaccionar amb les diferents biomolècules, com el DNA i inclús inhibir la seva reparació (Tang et al. 2011).

### **Mecanisme d'acció**

Tant els metabòlits reactius provinents del metabolisme de les amines aromàtiques com dels PAH, així com de l'acroleïna que no necessita d'una prèvia activació metabòlica, el mecanisme carcinogènic a través del qual el fum del tabac incrementaria el risc de BC seria a través de la formació d'adductes de DNA en les cèl·lules de l'uroteli. Els adductes de DNA són uns complexos físics formats entre una espècie química reactiva i la molècula del DNA (Wiencke 2002). Si no són reparats pels mecanismes per escissió de nucleòtids (NER) es generarà dany genètic, i per tant, alteració de gens com per exemple supressors de tumors, oncogens, entre d'altres, desregulant el cicle cel·lular. Els dos principals gens implicats en el mecanisme NER són el ERCC1 (*excision repair cross-complementing group 1*) i ERCC2/XPD (*excision repair cross-complementing group 2/xeroderma pigmentosum group D*), dels quals s'han descrit polimorfismes que modulen la seva capacitat reparadora.

### **Tabac i càncer de bufeta**

S'estima que el tabac és el responsable de 100 milions de morts a tot el planeta i que en el segle 21 s'arribarà a 1.000 milions de morts anuals (Eriksen et al. 2015). En el càncer de bufeta, el fum del tabac està considerat el factor de risc més ben establert (Kirkali et al. 2005), tot i que la seva correlació no és tan forta com l'observada amb els càncers respiratoris. S'estima que el tabac seria el responsable del 50% dels carcinomes de bufeta (Jiang et al. 2007; Volanis et al. 2010). El risc de càncer de bufeta s'incrementa aproximadament de 3 (Zeegers et al. 2000) a 4 (Kiriluk et al. 2012) inclús fins a vegades 6 (Torre et al. 2015) vegades més en fumadors que en no fumadors. Al tabac se li atribueixen entre el 50% (Kiriluk et al. 2012; Burger et al. 2013) i el 65% de les neoplàsies de bufeta en homes, i entre el 20% (Samanic et al. 2006) i el 30% (Kiriluk et al. 2012) en dones. També se li atribueixen el 31% de les morts per BC en homes i el 14% en dones (Torre et al. 2015). Samanic i col·laboradors (2006) publiquen que a Espanya el risc de càncer de bufeta incrementa de 3 a 7 vegades en la població fumadora i ex-fumadora respecte als no-fumadors (Samanic et al. 2006). Degut a que troben un risc encara més elevat per el BC i el tabac que en altres estudis epidemiològics conclouen, que a Espanya, aquest increment de la proporció es podria relacionar amb l'elevada prevalença del tabac entre la població masculina. Per tant, a

Espanya es considera el tabac com el factor de risc més important en el desenvolupament d'una neoplàsia de bufeta.

### **Tipus de tabac, intensitat i durada de l'hàbit**

Nombrosos estudis han valorat aquests riscos en funció del tipus de tabac, la intensitat i la durada de l'hàbit.

Pel que fa al tipus de tabac, es reporta que el risc de BC pels fumadors de tabac negre és més alt que els dels fumadors de tabac ros (Samanic et al. 2006). Malgrat tot, en un estudi previ no es va trobar cap relació entre el tipus de tabac i el risc de BC (López-Abente et al. 1991). Si s'analitzen altres tipus de tabac troben que el potencial carcinogènic dels puros i de les pipes és més baix que l'observat per les cigarretes (Pitard et al. 2001) ja que les concentracions de fum inhalat són més baixes, disminuint el risc (Kiriluk et al. 2012).

Nombrosos estudis epidemiològics han intentat relacionar la intensitat i la duració de l'hàbit. Zeegers i col·laboradors (2000) revisant estudis epidemiològics realitzats entre 1996 i el 2000, troben que el risc de càncer del tracte urinari es triplica en fumadors respecte als no fumadors, i associen aquest risc amb el nombre de cigarretes fumades per dia (intensitat de l'hàbit) i amb la durada de l'hàbit. De manera que el risc incrementava tant pels homes com per les dones que fumaven més de 20 cigarretes/dia com pels que presentaven aquest hàbit per un període superior als 20 anys. Els nivell d'adductes en sang també incrementaven en funció amb l'edat del individu, és a dir, amb la durada de l'hàbit. Posteriorment, Samanic i col·laboradors (2006) també observaven una relació positiva entre la intensitat i la duració de l'hàbit en els dos sexes.

### **Fumadors passius - exposició ambiental o ETS al fum del tabac**

Degut a la combustió incompleta del tabac, la concentració de carcinògens del tabac diluïts en l'aire és més elevada que la dels inhalats directament.

En un estudi realitzat a Massachusetts es va trobar que la concentració de 4-ABP era 5,4 vegades més elevada en els fumadors passius que en els fumadors actius (Borgerding et al. 2000). Els fumadors passius són els que inhalen involuntàriament el fum del tabac que es dilueix directament amb l'aire, per tant, es pot parlar d'una exposició ambiental al fum del tabac o ETS (*Environmental tobacco smoke*). Estudis en animals han mostrat que l'ETS pot induir adductes de DNA en les cèl·lules de la

bufeta, i en humans, incrementar els nivells d'adductes en l'hemoglobina deguts al 4-ABP i de la mutageneïtat urinària en no fumadors, suggerint que l'ETS juga un paper en el desenvolupament del càncer de bufeta entre no fumadors. No obstant, els estudis realitzats fins ara no han aportat un resultat conclouent del paper de l'ETS en el desenvolupament del càncer de bufeta, tal i com sí succeeix amb els fumadors passius i el càncer de pulmó on la relació és evident (Jiang et al. 2007). Jiang i col·laboradors (2007) troben una relació dosi - depenent entre l'ETS i el risc de càncer de bufeta en dones no fumadores. De manera que les dones exposades a l'ETS presentaven una concentració d'adductes en l'hemoglobina degut al 4-ABP nou vegades superior que les dones no exposades. Concloent que el 74% dels càncers de bufeta en dones no fumadores poden ser atribuïts a l'ETS. Aquesta associació és més forta durant l'infància suggerint una susceptibilitat major als efectes carcinogènics durant aquest període.

La relació entre una exposició a l'ETS i el risc de càncer de bufeta en homes no es troba. En diversos estudis epidemiològics s'indica que les dones fumadores presenten un risc més elevat de càncer de pulmó (Mollerup et al. 1999) en comparació amb els homes. Una explicació d'aquestes diferències entre gèneres en la susceptibilitat als carcinògens del tabac vindria donada pels nivells d'expressió de CYP1A1 o citocrom P450 1A1. Aquest enzim inclou diversos membres de monooxigenases implicats en la reacció d'activació o fase I del metabolisme PAHs, en el qual es formen diol-epòxids altament reactius que s'uneixen al DNA. La fase II del metabolisme PAHs és la fase de detoxificació mitjançant una reacció de conjugació. De manera que els nivells d'adductes de DNA s'han correlacionat amb el nivell d'activitat enzimàtica i per tant, amb els nivells d'expressió del mRNA de CYP1A1. Per tant, el nivell d'adductes de DNA pot ser considerat com un factor de risc alhora de desenvolupar una neoplàsia de pulmó. Els adductes de DNA relacionats amb el tabac són considerats uns marcadors moleculars d'exposició, suggerint que la diferència entre gèneres és deguda a un factor genètic de susceptibilitat en el metabolisme dels carcinògens del tabac.

No obstant, i degut a les polítiques antitabac, la taxa de mortalitat del BC ha disminuït molt en els darrers anys, i aquesta disminució en els països occidentals s'associa a aquestes polítiques de prevenció antitabac (Torre et al. 2015). Després de deixar l'hàbit s'estima que el risc disminueix un 30%, tot i que no s'arriba al mateix nivell que un no-fumador fins 20 anys després d'haver abandonat l'hàbit (Kiriluk et al. 2012).

De la mateixa manera que el tabac incrementa el risc de recurrència i progressió del BC, també incrementa la severitat en els MIBC (Jiang et al. 2012). Els pacients fumadors que decideixen abandonar l'hàbit presenten un millor pronòstic. Per tant, una de les recomanacions que s'hauria de realitzar a tots els fumadors amb un diagnòstic de NMIBC seria abandonar aquest hàbit (Babjuk et al. 2013).

## **EXPOSICIÓ OCUPACIONAL**

L'exposició ocupacional seria la responsable del 10 al 20% dels BCs, representant el segon factor de risc més important en el desenvolupament d'un carcinoma de bufeta (Kirkali et al. 2005; Volanis et al. 2010; Babjuk et al. 2013). Dos anys d'exposició són suficients per incrementar el risc, no obstant, el període de latència entre l'exposició i la manifestació clínica de símptomes es calcula de 30 a 50 anys, indicant un efecte de dosi acumulatiu del carcinogen a llarg dels anys (Volanis et al. 2010; Letašiová et al. 2012).

La causa més important d'exposició ocupacional relacionada amb el BC són les amines aromàtiques i la via d'entrada es produeix a través de la pell (Bolt 2014). Diversos estudis epidemiològics han demostrat un increment relatiu del risc de desenvolupar un BC en determinats grups ocupacionals, com són els destinats a la producció de pintures, tints, metalls i productes derivats del petroli (Burger et al. 2013).

Malgrat tot, l'exposició ambiental és difícil d'establir i pocs carcinògens ocupacionals han estat identificats. Recentment, la IARC ha classificat la ortho-toluidina i la cloroanilina (MOCA) com a carcinògens.

## **INGESTA**

Com succeeix en altres neoplàsies també en el BC s'ha intentat establir una relació entre la ingesta i el càncer.

Pel que fa a la ingesta d'aliments, s'ha considerat que aquests poden jugar un paper en la carcinogènesi de la bufeta, ja que els carcinògens dels aliments són excretats per l'orina. Fins al moment, no s'ha trobat cap relació beneficiosa entre el consum de fruita i verdura, i negativa amb el consum de carn envers el BC (Burger et al. 2013).

Degut a la relació inversament proporcional identificada entre les hores d'exposició solar i la mortalitat per càncer, s'ha postulat un efecte beneficiós de la vitamina D, ja que dietes riques en vitamina D i calci es trobaven inversament correlacionades amb el risc de càncer colorectal. Semblaria ser que els estudis realitzats fins al moment confereixen a la vitamina D un paper protector en contra del desenvolupament d'una neoplàsia de bufeta (Kiriluk et al. 2012).

S'ha intentat establir associacions entre la ingesta de determinats líquids i el risc de BC. Pel que fa a la ingesta de cafeïna, es va trobar una lleugera associació entre el consum de cafè i el risc de BC, tot i que també es va trobar que aquest consum de cafè anava molt lligat amb el consum de tabac, tot i ser independent de la durada de l'hàbit. De manera que en els no fumadors el risc era només lleugerament més elevat (Villanueva et al. 2009).

Pel que fa a la quantitat de líquid ingerit, Kadlubar i col·laboradors (1991) ja va observar que en l'uroteli dels gossos existia una relació entre la freqüència micció i la formació d'adductes de DNA, suggerint que com més líquid s'ingeria, més es diluïen els carcinògens presents en la orina, i per tant, menys temps estaven en contacte amb l'uroteli, disminuint el temps d'exposició. Tot i que en estudis posteriors no s'ha trobat una relació entre la ingesta d'aigua i la protecció envers el BC, en un estudi realitzat a Espanya troben que la quantitat d'aigua ingerida és inversament proporcional al risc de BC, independentment de l'estat de fumador (Michaud et al. 2007). No obstant, la ingesta excessiva de fluids també podria incrementar el risc de BC degut a la presència de contaminants o potencials carcinògens com són la presència de nitrats i nitrits que podrien provenir de les explotacions agrícoles o dels escorxadors, o a la presència de productes clorats utilitzats per la desinfecció de l'aigua, o a la presència d'arsènic.

Els nitrits i nitrats són potencials carcinògens, no obstant, la seva associació amb el BC és controvertida (Kiriluk et al. 2012).

Pel que fa a la desinfecció de l'aigua de consum, la cloració de l'aigua amb productes desinfectants s'ha reportat tenir un paper mutagènic en els assaigs. Tot i que no hi ha suficients evidències, segons Villanueva i col·laboradors (2007), una elevada ingesta d'aigua de l'aixeta incrementaria el risc de BC degut a un increment en l'exposició als trihalomentans (THM) (Villanueva et al. 2009). Contràriament, al mateix any, es publica que la ingesta d'aigua és inversament associada amb el risc de BC (Michaud et al.

2007). En un estudi posterior s'observà un increment significatiu del risc de BC en funció de la dosi i del temps d'exposició als THM (Costet et al. 2011).

Als anys 60 es va observar que nivells elevats d'arsènic en l'aigua dels pous es relacionava amb una malaltia vascular greu endèmica del sud de Taiwan juntament amb l'aparició de múltiples càncers, incloent-hi el BC. En un estudi realitzat per determinar l'exposició a l'arsènic i establir el seu risc carcinogènic, es va trobar una associació entre el risc de càncer de bufeta en aquesta població del sud de Taiwan i les lesions de tipus cromosòmic (Liou et al. 1999). Per tant, s'ha demostrat una relació entre una exposició elevada a l'arsènic, per sobre de 300-500 µg/L (Letašiová et al. 2012) i el risc de BC, tot i que es desconeix el seu mecanisme d'acció. No obstant, concentracions inferiors semblarien no incrementar el risc, tot i que en un estudi troben un efecte sinèrgic del tabac i de la dieta a concentracions baixes d'arsènic en l'aigua de consum (Kurttio et al. 1999).

## **CONDICIONS MÈDIQUES**

### **Infeccions**

En els països en vies de desenvolupament, com per exemple l'Àfrica occidental, s'observa una incidència molt elevada del BC. Concretament a Egipte s'estima una incidència de 8.923 (10,6% o 13,1/100.000) nous casos per any (WHO 2014). Aquesta elevada incidència s'associa a la infecció crònica pel trematode *Schistosoma haematobium*, l'esquistosomiasi, que després de la malària, causa la infecció més greu en l'home. L'esquistosomiasi s'associa a un tipus histològic concret de carcinoma de bufeta, el carcinoma de cèl·lules escamoses (SCC). Sembla ser que la irritació i inflamació contínua de l'uroteli produïda pels ous del trematode, incrementaria l'estrès oxidatiu de les cèl·lules urotelials que juntament amb l'exposició a agents carcinogènics tindrien un paper promotor de la tumorigènesi en el punt de la inflamació (Rosin et al. 1994; Mostafa et al. 1999).

### **Irritació o inflamació crònica**

Degut a que l'esquistosomiasi és una infecció rara en els països desenvolupats i el SCC representa el segon tipus histològic més freqüent de tumors en la bufeta (del 2 al 5%), semblaria ser que l'etiologia del SCC en el món desenvolupat estaria relacionada amb la irritació crònica de la bufeta (Dahm i Gschwend 2003; Abol-Enein et al. 2007).

Aquesta hipòtesi vindria recolzada pel fet que el 10% dels pacients amb lesions medul·lars amb un catèter de més de 10 anys per drenar l'orina presentaven SCC (Abol-Enein et al. 2007). Sembla ser que la irritació de la mucosa vesical produïda o per un desordre inflamatori crònic de la bufeta, o per la presència de càlculs, o per cistitis cròniques o la presència de diverticles serien els responsables del SCC.

## **Genètics**

Tot i que per exemple el tabac incrementa el risc de BC, no tots els individus fumadors desenvoluparan una neoplàsia. En poblacions amb taxes elevades de tabaquisme, com són els homes autòctons de la Polinèsia, incloent els nadius hawaians i els Maoris de Nova Zelanda, s'observen baixes taxes de BC (Kirkali et al. 2005). Això suggereix diferències en el metabolisme dels carcinògens i per tant, una susceptibilitat genètica associada als polimorfismes dels gens de reparació del DNA i de detoxificació. A més, en el BC també s'observa agregació o recurrència familiar, inclús amb membres diagnosticats a una edat jove, el que fa suggerir una predisposició genètica (Eble et al. 2004).

## **GÈNERE**

La incidència de BC és superior en homes que en dones, amb una proporció home:dona ~ 4:1 (Fajkovic et al. 2011). La freqüència varia entre països, sent més elevada en els països desenvolupats, concretament al sud d'Europa, amb una proporció home:dona de 8,2:1 a Espanya (Babjuk et al. 2013; Samanic et al. 2006). Aquesta elevada incidència observada en homes a Espanya s'atribueix principalment a l'elevada prevalença del consum de tabac entre la població masculina. Tot i que es troben diferències en quan a la incidència de BC entre països, en general les dones presenten una incidència més baixa de BC, no obstant, quan es diagnostica la malaltia, aquesta es troba en un estadi més avançat, amb més recurrència i progressió, i amb una taxa de mortalitat més elevada que en els homes i, per tant, amb un pronòstic més desfavorable (Fajkovic et al. 2011).

Es calcula que el període de latència del BC és d'aproximadament 30 anys, de manera que la diferència observada entre gèneres es podria atribuir per una banda a



l'hàbit del tabac, que fins als anys 50 o 60 era un hàbit purament masculí, i d'altra banda a una menor exposició als carcinògens ocupacionals per part de les dones (Burger et al. 2013).

Tot i que no es coneix si les hormones o els factors anatòmics juguen algun paper, actualment la incidència ha disminuït en homes i ha augmentat en dones, reflectint d'alguna manera l'equiparació en quan al consum de tabac i l'exposició ocupacional.

## **SUSCEPTIBILITAT GENÈTICA INDIVIDUAL**

Nombrosos estudis han intentat determinar sense èxit una correlació entre el BC, el tabac i els polimorfismes en els gens glutatió S-transferasa (*GST*), citocrom P450 (*CYP*), sulfottransferasa (*SULT*) i N-acetil transferasa (*NAT*).

En models animals, s'ha observat que el benzo- $\alpha$ -pirè (B(a)P) indueix l'expressió urotelial de *CYP1A1* així com en pacients afectats per esquistosomiasi també s'observa un increment de l'expressió de *CYP2E1*. A més, aquesta expressió es produeix a una concentració determinada de B(a)P, no obstant, aquest increment no es produeix pel 4-ABP o 2-naftilamina. A més, sembla ser que el B(a)P potenciaria l'acció de les amines aromàtiques (Bolt 2014). De manera que per la bioactivació dels PAHs com de les amines aromàtiques es requereix una expressió i modulació local del citocrom P450 o *CYP1A1*. Aquesta activació local es produeix a nivell de la capa més superficial de l'uroteli, les *umbrella cells* o cèl·lules en paraigua. En cada micció, es produeix una exfoliació d'aquesta capa més superficial de la mucosa urotelial, de manera que quan s'avalua l'expressió del *CYP1A1* en les cèl·lules d'exfoliació s'observa una expressió significativament incrementada en fumadors respecte no fumadors (Dörrenhaus et al. 2007).

## **PREDISPOSICIÓ GENÈTICA AL CÀNCER DE BUFETA**

A diferència del carcinoma renal i de pròstata, on s'ha definit una entitat hereditària, el carcinoma urotelial no presenta una forma familiar, tot i existir agregació o recurrència familiar (famílies amb diversos membres afectats) i membres diagnosticats a una edat jove, el que fa suggerir un component genètic (Eble et al. 2004). Al 1996 es va descriure l'única alteració cromosòmica constitucional associada al carcinoma urotelial

present en la línia germinal, la translocació t(5;20)(p15;q11) (Aben et al. 2001; Mueller et al. 2008). No obstant, aquesta alteració no ha estat confirmada en estudis posteriors (Aben et al. 2001; Aben et al. 2006).

Pocs són els estudis epidemiològics adreçats a determinar el risc relatiu de patir càncer de bufeta associat a una història familiar, ja que una elevada agregació familiar no prova l'existència d'un mecanisme genètic.

La majoria dels estudis realitzats publiquen que s'incrementa el risc en famílies amb història familiar de BC (Kramer et al. 1991; Goldgar et al. 1994; Dong i Hemminki 2001; Aben et al. 2002; Murta-Nascimento et al. 2007). Inclús Dong i Hemminki (2001) suggereixen un mecanisme recessiu o lligat al cromosoma X implicat en l'herència del risc. De manera que els gens lligats al cromosoma X podrien ajudar a explicar l'elevada incidència mundial del càncer de bufeta en el sexe masculí. Aben i col·laboradors (2002) apunten que caldria considerar el carcinoma urotelial hereditari com una nova entitat. Només Kiemenev i col·laboradors (1997) troben un lleuger increment entre familiars de pacients amb BC.

Partint del fet que els bessons monozigòtics són genèticament idèntics, els estudis de concordança entre bessons permeten determinar la implicació dels factors genètics en l'origen del BC. En un estudi es va trobar que la concordança entre bessons era més gran entre bessons monozigòtics que entre bessons dizigòtics, i pel càncer de bufeta van trobar una contribució del 31% dels gens heretats i un 69% és la contribució dels factors ambientals no compartits (O'Brien 2000). Tot i que els factors ambientals i somàtics són els principals implicats en els casos esporàdics de càncer, del 60 al 90% dels principals tipus de càncer poden ser explicats pels factors ambientals (Dong i Hemminki 2001). A més, aquests mateixos autors troben que els factors genètics podrien tenir un paper en l'heretabilitat del càncer de bufeta, tot i no ser estadísticament significatiu.

En resum, en el carcinoma urotelial és rar trobar una alteració constitucional associada, i a més, la presència de més d'un membre d'una mateixa família afecta es podria explicar degut al fet de compartir un mateix ambient. La raó per la qual es produeix un increment del risc entre membres d'una mateixa família no està clar, de manera que la contribució del component genètic en el carcinoma urotelial no és concloent. A més els estudis de concordança entre bessons determinen que els

factors ambientals no compartits són els principals responsables i a més, el carcinoma urotelial no segueix un patró Mendelià de transmissió sinó tot el contrari, el seu desenvolupament sembla que depèn dels factors ambientals. A més, no existeix cap desordre genètic que incrementi la predisposició al càncer de bufeta.

## 1.2. INESTABILITAT CONSTITUCIONAL

La inestabilitat genòmica és una característica inherent de la gran majoria de les cèl·lules tumorals, i a més aquesta inestabilitat permet/dirigeix la progressió tumoral (Hanahan i Weinberg 2011). En aquest sentit, s'ha suggerit que la inestabilitat constitucional pot ser un factor predisposant al càncer. Aquest concepte es veu reforçat per l'existència de síndromes d'inestabilitat cromosòmica que predisposen a diferents tipus de càncer. Entre aquestes síndromes es troben l'anèmia de Fanconi, la síndrome de Bloom, la síndrome de Werner, la síndrome de Seckel entre d'altres.

Shao i col·laboradors (2004) suggereixen que la inestabilitat present en la cèl·lula tumoral també està present d'una forma similar en els diferents tipus cel·lulars d'un mateix individu, sent la inestabilitat genòmica una característica constitutiva de l'individu.

Per tant, es pot analitzar la inestabilitat genòmica constitucional en un teixit de fàcil accés, com els limfòcits de sang perifèrica, per tal de determinar la susceptibilitat individual al càncer. I la inestabilitat genòmica es pot manifestar a través de l'expressió dels llocs cromosòmics fràgils o FS (*fragile sites*).

### 1.2.1. CFS, common fragile sites

Els FS es defineixen citogenèticament com regions del genoma humà que presenten una predisposició especial per expressar-se com trencaments o *gaps* o constriccions en cromosomes metafàsics quan s'inhibeix parcialment la replicació del DNA, sota condicions d'estrès replicatiu (Glover et al. 1984).

Els 13 FS clonats fins a dia d'avui han mostrat ser regions genòmiques pobres en gens, riques en seqüències AT, en seqüències LINE (*Long Interspersed Nuclear*

*Elements*) i MER (*Medium Reiterated*), les quals manifesten també, una alta flexibilitat (Jiang et al. 2009).

Els FS es classifiquen en funció de l'agent inductor i de la seva freqüència en la població en dos tipus, rars i comuns (taula 1.2.1).

**Taula 1.2.1.** Classificació dels FS segons Lukusa i Fryns al 2008

Classes	Agent inductor	Nombre de loci	Seqüència
<b>FS rars</b>		31	
Sensibles al folat	Estrès timidilat	24	(CGG) <sub>n</sub>
Insensibles al folat	Distamycin-A	5	Repeticions riques AT
	Bromodeoxiuridina	2	Repeticions riques AT
<b>FS comuns</b>		88	
	APH	77	Riques AT
	5-azacitidina	4	
	Bromodeoxiuridina	7	Riques AT

APH, aphidicolin

Els FS comuns o CFS (*common fragile sites*) constitueixen el grup més nombrós i estan presents en tots els individus d'una població si bé presenten diferències en la freqüència de trencaments (sovint referenciada com expressió del lloc fràgil). En cultius amb afidicolina (APH) s'observa que els fràgils s'expressen normalment amb una freqüència del 2 al 5% de les metafases analitzades (Mrasek et al. 2010; Debatisse et al. 2012). A diferència dels FS rars, no són originats per una expansió de nucleòtids, per tant, són considerats com un component normal de l'estructura dels cromosomes.

Fins al moment, només 77 dels 88 CFS es troben llistats en el *Genome Data Browser* (GDB). Mrasek i col·laboradors (2010) demostren que tant els FS rars com els comuns són induïts per APH i que després d'analitzar vint-i-cinc mil metafases reporten 230 loci susceptibles de ser induïts per APH. Segons aquests autors, el nombre exacte de CFS depèn de l'agent inductor, del tipus cel·lular i el mètode d'anàlisi.

## Expressió dels CFS i càncer

Yunis i Soreng (1984) van ser els primers en correlacionar l'expressió dels FS i el càncer, a l'observar que els llocs fràgils estaven físicament a prop d'oncogens i que eren regions propenses a patir reorganitzacions cromosòmiques.

Encara no s'ha establert una implicació directa dels CFS i el càncer, tot i que s'ha observat que constitueixen les principals dianes del dany en el DNA induït per oncogens en lesions preneoplàsiques. S'ha vist que estan implicats en les reorganitzacions cromosòmiques més freqüents en el càncer, en delecions de gens supressors de tumors així com en els intercanvis entre cromàtides germanes. També són punts calents (*hot spots*) per amplifícacions gèniques i integració de virus (Ma et al. 2012).

Si els CFS s'expressen sota condicions d'estrès replicatiu, la inestabilitat cromosòmica en aquests loci podria precedir la inestabilitat en altres regions del genoma, suggerint una contribució dels CFS en l'evolució del procés tumoral. Concretament la inestabilitat dels CFS es relaciona amb els estadis inicials de la transformació maligne (Franchitto 2013).

Referent a la seva contribució a la predisposició al càncer, diversos estudis han mostrat un augment de l'expressió de CFS en limfòcits de sang perifèrica de pacients afectats de diferents tipus de tumors: càncer de mama i cèrvix (Paz y Miño et al. 1997), càncer de mama (Ceçener et al. 1998), càncer de mama i còlon (Balci et al. 1999), de càncer de còlon (Tunca et al. 2000), de càncer de pulmó de cèl·lules petites (Karadağ et al. 2002), de càncer de pulmó de cèl·lules no petites (Tunca et al. 2002), càncer de mama, d'ovari i de pulmó de cèl·lules no petites (Dhillon et al. 2003). Tots aquests estudis suggereixen que un augment d'expressió dels CFS en limfòcits de sang perifèrica podria ser un marcador de susceptibilitat a patir càncer.

## **Característiques moleculars dels CFS**

Mentre que els CFS són regions inestables en les cèl·lules tumorals, en les cèl·lules normals somàtiques i germinals es mantenen estables.

En cèl·lules normals es pot induir l'expressió dels CFS a baixes concentracions d'APH, la qual genera una situació d'estrès replicatiu parcial degut a la inhibició de les DNA polimerases  $\alpha$ ,  $\delta$ , i  $\epsilon$  (Glover et al. 1984). La demostració que l'APH desacobla les DNA polimerases del complex helicasa - topoisomerasa ha portat als investigadors a postular un model segons el qual els CFS són regions del genoma de replicació lenta al llarg de les quals les helicases treballen desacoblades de les DNA polimerases (Debatisse et al. 2012). No obstant, la sensibilitat dels CFS a l'estrès replicatiu no és

degut a un únic mecanisme, sinó que es creu que és degut a una sèrie de característiques moleculars o a una combinació d'aquestes les que potencien la sensibilitat dels CFS a l'estrès replicatiu i permeten la seva expressió o inestabilitat (Franchitto 2013).

### **Seqüència consens i estructura secundària**

Tot i que els anàlisis realitzats fins a dia d'avui encara no han identificat una seqüència consens pels CFS, s'ha vist que alguns corresponen a seqüències amb una composició rica en repeticions AT (minisatèl·lits) i altament flexibles (Lukusa i Fryns 2008). Si aquestes regions presenten una longitud de més de 200 bp, com que el DNA es troba desenrotllat (ssDNA, *single strand DNA*) durant la replicació, aquestes seqüències riques en AT tenen molta tendència a formar estructures secundàries altament estables (Thys et al. 2015). De manera que aquestes estructures podrien impedir la progressió de la forqueta de replicació, contribuint a la expressió o inestabilitat dels CFS.

### **Proteïnes implicades en el manteniment de l'estabilitat dels CFS**

Si la forqueta de replicació s'ha estancat és necessari que algun mecanisme cel·lular en restableixi el funcionament perquè el cycle cel·lular pugui progressar. En el reconeixement i resolució de les estructures secundàries intervenen endonucleases, helicases, i topoisomereses. El paper d'aquestes proteïnes pot ser essencial per mantenir l'estabilitat dels llocs fràgils.

En les síndromes de Werner o de Bloom, la deficiència de les helicases WRN o BLM respectivament, es tradueix amb un increment en l'expressió dels FS en cromosomes metafàsics, inclús en una situació sense estrès replicatiu (Pirzio et al. 2008; Pellicioli i Muzi-Falconi 2013). A part d'aquestes proteïnes, també s'ha vist la intervenció de les proteïnes de reparació del DNA en el manteniment dels CFS.

En la síndrome de Seckel, les mutacions de la quinasa ATR també es tradueixen en un increment en l'expressió dels CFS (Casper et al. 2004). A més, les proteïnes regulades per ATR com CHK1, BRCA1, Claspin, FANCD2, HUS1 i SMC1 també s'ha vist que estan involucrades en el manteniment de l'estabilitat dels CFS. Per exemple,

la pèrdua de FANCD2 en l'anèmia de Fanconi també es tradueix en un increment en l'expressió dels CFS després del tractament amb APH (Howlett i Taniguchi 2005).

D'altra banda, els trencaments de doble cadena (DSB, *double strand break*) activen la proteïna ATM. No obstant, aquesta activació és dependent d'ATR, via CHK1. Per tant, les proteïnes implicades en la reparació del DNA, ja sigui per recombinació homòloga (HRR, *homologous recombination repair*) com Rad51 o per unió d'extremos no homòlegs (NHEJ, *non-homologous end joining*) com DNA-PK, Lligasa IV i XLF, també es troben implicades en el manteniment dels FS. Això suggereix que sota estrès replicatiu parcial en aquests loci també es podrien generar DSB o reparacions il·legítimes. Per altra banda, si només es perd la proteïna ATM no es tradueix en un increment de la inestabilitat en aquests loci (Ozeri-Galai et al. 2008). Per tant, la proteïna ATR seria la principal responsable del manteniment dels CFS, tot i que encara no està clar el mecanisme exacte.

Si bé les proteïnes abans esmentades serien responsables de mantenir l'estabilitat dels llocs fràgils, altres proteïnes estarien implicades en la seva expressió o inestabilitat. Entre aquestes cal destacar: les DNA topoisomerases, ja que poden desacoblar la DNA polimerasa del complex helicasa - topoisomerasa (Arlt i Glover 2010). També quan la forqueta de replicació es troba pertorbada, les topoisomerases poden resoldre les col·lisions que es produeixen entre els complexos replicatiu i transcripcional (Helmrich et al. 2011). Finalment, s'ha observat que les topoisomerases reconeixen les estructures secundàries estables que es formen en el FS localitzat en l'oncogen *RET*, iniciant el trencament del DNA (Dillon et al. 2013).

Aquesta gran varietat de proteïnes implicades en l'estabilitat - inestabilitat dels CFS suggereix que el seu manteniment és un mecanisme complex que involucra diferents processos cel·lulars (Thys et al. 2015).

### **Pertorbació de la forqueta de replicació**

En estudis *in vitro* analitzant el patró de replicació al llarg del FRA16D s'ha observat que la forqueta de replicació s'atura a prop de les seqüències riques en AT i que en presència de la helicasa WRN, la qual resol les estructures secundàries de DNA estables, s'alleuja l'estancament de la forqueta de replicació en aquestes seqüències (Shah et al. 2010). A més, també en aquest FRA16D s'ha vist que es produeixen

trencaments en les regions riques en AT, inclús en absència d'estrès replicatiu (Zhang i Freudenreich 2007). Aquests estudis demostren que, com a resultat de la formació d'estructures secundàries, aquestes seqüències riques en AT són difícils de replicar donant lloc a l'aturada de la forqueta de replicació i trencaments en el DNA.

En estudis *in vivo* sobre el FRA16C també s'observa un endarreriment de la forqueta de replicació en les regions adjacents a les seqüències AT; addicionalment, la cèl·lula, en condicions normals, respon activant orígens de replicació que normalment es troben inactius. Ara bé, sota condicions d'estrès replicatiu, no es produeix aquesta activació addicional dels orígens de replicació. Per tant, en condicions d'estrès replicatiu, degut a la inhabilitat per activar els orígens inactius juntament amb la perturbació de la forqueta es produeix una inestabilitat i una replicació incompleta dels CFS (Ozeri-Galai et al. 2014).

### **Escassetat d'orígens de replicació**

Alguns CFS contenen una llarga regió en la que l'origen de replicació és ineficient. En estudis realitzats en el FRA3B en limfòcits s'observa que en el nucli d'aquest locus hi ha escassetat d'orígens de replicació, concretament s'identifiquen quatre potencials orígens de replicació, i a més, presenten una activació ineficient (Palakodeti et al. 2010). Per tant, semblaria que l'escassetat d'orígens jugaria un paper en la inestabilitat dels CFS. No obstant, en estudis sobre el FRA3B i el FRA16B en fibroblasts no s'observa una escassetat en orígens de replicació, sinó que s'observa una distribució uniforme dels orígens de replicació, suggerint l'existència d'un altre mecanisme implicat en l'expressió/inestabilitat d'aquests CFS (Le Tallec et al. 2011).

### **Replicació tardana**

En estudis realitzats en cèl·lules no tractades s'observa que els FRA3B i FRA16D són loci de replicació tardana, és a dir, són regions del genoma on la replicació s'inicia molt tard en la fase S. I en presència d'APH, els CFS es poden mantenir sense replicar inclús en la fase G2 del cicle cel·lular (Ozeri-Galai et al. 2014). Tot i així, Wang i col·laboradors (1999) ja van observar que el FRA3B presentava una replicació asincrònica i que només l'al·lel que es replicava més tard era el que presentava inestabilitat.

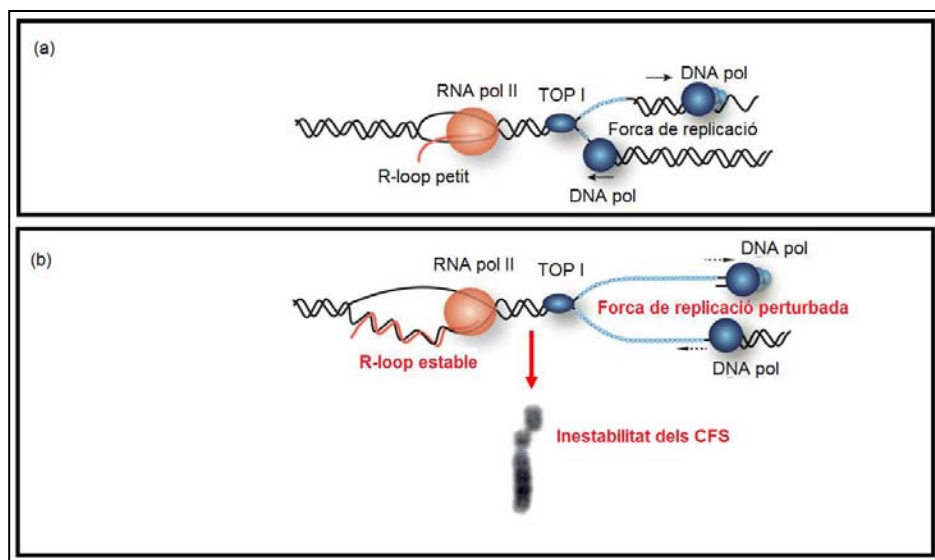


Existeixen, però, altres fràgils on la replicació s'inicia de forma primerenca, els ERFS (*early replicating fragile sites*) es localitzen pròxims als orígens de replicació i a gens transcripcionalment actius, i presenten seqüències riques en GC. La seva inducció no es dona per d'APH. Semblaria ser que la seva inestabilitat/expressió seria produïda per l'elevada densitat d'orígens de replicació actius, esgotant els nucleòtids i per tant, incrementat la probabilitat que la forqueta s'estanqui (Barlow et al. 2013).

### Colocalització amb gens humans grans

Molts CFS es colocalitzen amb els gens humans més grans, on s'especula que la transcripció pot interferir en la replicació de la fase S del cicle cel·lular següent.

En un estudi recent de cinc CFS localitzats en gens humans grans suggereixen que degut a que aquests gens presenten una replicació tardana i mostren regions riques en AT, característiques similars als CFS, la transcripció contribuiria a l'expressió dels CFS ja que es produïrien col·lisions entre el complex transcripcional i la forqueta de replicació (figura 1.2.1), i que sota condicions d'estrès replicatiu, es formarien estructures híbrides d'ssDNA-ssRNA, R-loops, promoguent la inestabilitat dels CFS.



**Figura 1.2.1.** Representació esquemàtica de col·lisió entre les maquineries de replicació i transcripció en el gen *FHIT* humà de 1,5 Mb (cr. 3). Si el gen no s'expressa, no es produeix cap col·lisió entre les maquineries de replicació i transcripció. (a) Si el gen s'expressa, degut a la seva grandària, la cèl·lula arriba a la següent fase S del cicle cel·lular amb la maquinària de transcripció encara activa, de manera que es troben les dues polimerases, la replicativa i la de transcripció. Ara bé, la maquinària de replicació pot resoldre la col·lisió. (b) Sota condicions d'estrès replicatiu, es pertorba la forqueta de replicació, on la velocitat també es troba disminuïda, generant-se estructures secundàries estables formades entre ssDNA-ssRNA (R-loops), facilitant l'expressió dels CFS (adaptada de Helmrich (2011)).

De manera que és probable que els R-loops modulin l'expressió dels CFS, ja que la RNasa I, la qual degrada específicament els R-loops, és capaç de suprimir la inestabilitat en aquests grans gens (Helmrich et al. 2011).

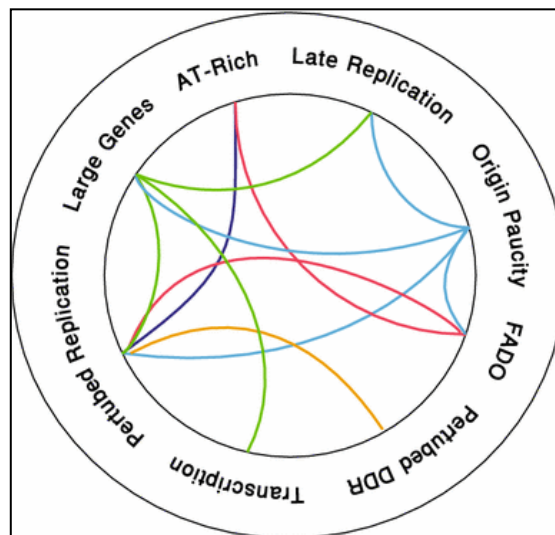
No obstant, en un estudi realitzat posteriorment no troben que els punts de tall dels CFS es localitzin principalment en els grans gens, suggerint una localització casual (Le Tallec et al. 2013). A més, observen que l'expressió dels CFS varia entre els diferents teixits (Le Tallec et al. 2011). Per exemple, mentre que el FRA3B i el FRA16D estan molt freqüentment representats en limfòcits, en fibroblats es troben poc representats, i al contrari, mentre que els FS 3q13.1 i 1p31.1 es troben freqüentment representats en fibroblasts, aquests mateixos FS es troben poc representats en limfòcits (Debatisse et al. 2012). Aquestes diferències en funció del teixit suggereix la intervenció de mecanismes epigenètics que modulen la inestabilitat dels CFS.

### **Característiques epigenètiques dels CFS**

En la compactació de la cromatina, la majoria dels nucleosomes no es troben en posicions fixes sinó que es troben repartits de forma atzarosa. En un estudi sobre la posició dels nucleosomes en els dos punts principals de trencament del FRA3B, s'observa que aquests es troben en unes posicions fixes, nucleosomes en fase (*phased nucleosomes*). No obstant, quan analitzen aquestes seqüències *in vitro* resulta que a prop hi ha elements Alu parcials. Els elements Alu humans s'associen amb nucleosomes en fase (Howard 1995) sent probablement aquests elements Alu els responsables del posicionament dels nucleosomes (Mulvihill i Wang 2004).

Altres estudis han mostrat que els CFS es caracteritzen per una hipoacetilació d'histones. Jiang i col·laboradors (2009) reporten que en cinc de sis CFS estudiats, les histones es troben hipoacetilades en comparació a la mitjana del genoma, suggerint una estructura de la cromatina més condensada. A més, el tractament amb un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC, *histone deacetylase*) disminueix l'expressió del lloc fràgil. Aquests resultats, juntament amb el fet que la cromatina condensada impedeix una reparació eficient del DNA, donen suport al paper de la condensació de la cromatina en l'expressió dels CFS (Cann i Dellaire 2011). No obstant, aquesta compactació de la cromatina no s'observa en tots els CFS.

En resum, si es té en compte totes les dades, es podria concloure que no existeix un únic mecanisme molecular que expliqui la inestabilitat dels CFS. No obstant, Ozeri-Galai i col·laboradors (2014) suggereixen que els CFS presenten una alta sensibilitat a l'estrès replicatiu i una incapacitat d'activar orígens de replicació addicionals sota l'acció d'aquest estrès replicatiu. Addicionalment, presentarien una sèrie de característiques subjacents o secundàries, que anirien des dels que presenten orígens de replicació ineficients fins els que presenten unes regions riques en AT que formen estructures secundàries que impedeixen la progressió de la forqueta de replicació, tal i com s'observa en la línia vermella de la figura 1.2.2. Les diferències en l'expressió dels CFS en funció del teixit es poden atribuir a una estructura nucleosomal i de la cromatina específica.



**Figura 1.2.2.** Representació esquemàtica de les característiques moleculars dels CFS. En el cercle més extern es troben representades les principals característiques observades en els diferents estudis realitzats fins a dia d'avui en els CFS. Les línies de color enllacen les característiques que conjuntament contribueixen en l'expressió dels CFS.

*FADO*, failure in activation of dormant origins; *DDR*, DNA damage response (Ozeri-Galai i col·laboradors (2014))

## 1.2.2. Inestabilitat cromosòmica i mosaïcisme somàtic

Tal i com s'ha indicat al principi d'aquest apartat, una de les característiques de les cèl·lules tumorals és la seva incapacitat per mantenir l'estabilitat del seu genoma. Aquesta incapacitat, inestabilitat genòmica, es pot manifestar en forma de múltiples alteracions cromosòmiques numèriques i estructurals.

Diversos autors han proposat que es pot detectar la presència d'instabilitat cromosòmica en limfòcits de pacients afectats de càncer i que a més aquesta instabilitat podria ser el reflex de la trobada en el tumor. Aquesta proposta està recolzada pel fet que en estudis previs realitzats en diferents tipus de neoplàsies es troba que les alteracions presents en els limfòcits de sang perifèrica són similars a les presents en el teixit tumoral (Pathak et al. 1991; Dave et al. 1993; Dotan et al. 2000). La presència d'instabilitat genòmica s'ha detectat tant en lesions de cèrvix premalignes com en limfòcits de sang perifèrica de les mateixes pacients (Udumudi et al. 1998). A més, diferents estudis han mostrat que en pacients afectats de càncer de còlon, càncer de pulmó o càncer renal, les alteracions detectades en limfòcits coincideixen amb les trobades en els respectius tumors (Pathak et al. 1991; Dave et al. 1993; Dotan et al. 2000). Alteracions afectant en concret al cromosoma 9 s'han descrit en limfòcits i tumors en pacients afectats de càncer de pulmó (Zhu et al. 2002). Més recentment, Shao i col·laboradors (2004) troben que les delecions en 9p i més concretament en 9p21, i les translocacions en el cromosoma 11 són molt més elevades en pacients amb BC que en individus controls, 20% i 43% respectivament. Només troben alteracions estructurals i cap alteració numèrica en aquets dos cromosomes.

Tots aquests estudis suggereixen que la instabilitat genètica en diferents tipus cel·lulars del mateix individu pot ser similar i que per tant, l'estratègia d'estudiar limfòcits de sang perifèrica podria contribuir a determinar una susceptibilitat individual al càncer. A més, i segons aquests autors, les alteracions detectades en limfòcits podrien distribuir-se de forma no a l'atzar per altres llocs del genoma, el que podria reflectir la susceptibilitat de determinats loci al dany induït per carcinògens (Stein et al. 2002; Zhu et al. 2002; Shao et al. 2004). Per altra banda, i d'acord amb Bonassi i col·laboradors (2000), la instabilitat genòmica és una característica constitutiva de l'individu i no estaria afectada per agents externs tals i com tabac, beguda, entre d'altres, ni tampoc estaria relacionada amb l'estadi tumoral.

En els estudis abans esmentats, es trobava que la incidència d'alteracions cromosòmiques en limfòcits de sang perifèrica de pacients era superior a la trobada en individus control. En un estudi recent realitzat per la SBC/EPICURO (*Spanish Bladder Cancer/Epidemiology of Cancer of the urothelium*) mitjançant GWA (*Genome-wide analysis*) en individus amb BC utilitzant DNA obtingut de mucosa bucal i sang perifèrica, detecten anomalies clonals en mosaic en els autosomes en un 1,7% dels individus estudiats, una freqüència més elevada de la esperada. Tot i que el

mosaïcisme somàtic està implicat en diversos càncers, en aquest estudi no es troba una diferència significativa en la freqüència d'alteracions cromosòmiques entre casos i controls (Rodríguez-Santiago et al. 2010). Segons aquests autors, la elevada freqüència de cèl·lules amb alteracions detectades i la seva presència en individus control, suggereix que aquest tipus de mosaïcisme és un fenomen generalitzat del genoma humà. Proposen que el mosaïcisme somàtic hauria de considerar-se com una expansió del repertori de variabilitat genètica interindividual, que en alguns casos estaria relacionat amb malalties genètiques conegudes i que en altres podria contribuir a la modificació de malalties hereditàries o a la predisposició multifactorial de malalties comuns de base genètica i d'inici a l'edat adulta.

## **Mosaïcisme somàtic**

Clàssicament, el mosaïcisme somàtic es defineix com la presència de dos o més poblacions de cèl·lules genèticament diferents en un individu resultant d'un aconeteixement post-zigòtic durant el desenvolupament (Youssoufian i Pyeritz 2002; Notini et al. 2008).

Error en la duplicació cromosòmica i la posterior transmissió a les cèl·lules filles pot conduir a l'aneuploidia, al guany i pèrdua de cromosomes o de segments cromosòmics, i esdeveniments recíprocs de guanys i pèrdues que apareixen com a pèrdua d'heterozigotisme neutra o disomia uniparental adquirida (UPD, *uniparental disomy*). El mosaïcisme somàtic ha estat establert com una causa d'avortaments, defectes en el naixement, retard del desenvolupament i càncer (Hsu et al. 1992; Menten et al. 2006; Lu et al. 2008; Tuna et al. 2009; Heim i Mitelman 2009; Conlin et al. 2010; Solomon et al. 2011). Degut a que el mosaïcisme pot ser benigne, o pot conduir a diversos fenotips clínics, no hi ha una estimació acurada de la seva freqüència (Hsu et al. 1992; Menten et al. 2006; Lu et al. 2008; Conlin et al. 2010).

La forma més freqüent de mosaïcisme detectada a partir del cariotip en el diagnòstic pre i perinatal, inclou l'aneuploidia trobada en un ~ 50% dels embrions pre-implantacionals, en l' 1% de les mostres de vellositat coriòniques, del 0,2 al 0,3% dels líquids amniòtics, i en un 0,1% dels nounats (Hsu et al. 1992; Crandall 1996). En neurones diferenciades s'ha trobat un promig d'aneuploidies entre un 1,25% i un 1,45% per cromosoma (del 30 al 35% en conjunt) amb una freqüència potser més

baixa que en altres tipus de cèl·lules del cervell (Rehen 2005; Yurov et al. 2007). La monosomia adquirida del cromosoma X és un tipus de mosaïcisme observat en dones i associat amb l'edat (Guttenbach i Koschorz 1995).

Fins al moment, la majoria de mutacions somàtiques s'han descrit en relació a patologies conegudes i amb reconegut efecte fenotípic encara que si es compara amb els defectes constitucionals, les anormalitats en mosaic poden resultar en fenotips més entermedis tal i com s'observa per la neurofibromatosi tipus 1 (MIM 162200) i la trisomia 21 (MIM 190685). Per altra banda, és possible que els canvis somàtics no tinguin efectes fenotípics i puguin passar desapercebuts en individus aparentment sans (Ainsworth et al. 1997; Gottlieb et al. 2001; Papavassiliou i York 2009).

En rares ocasions, la tendència a desenvolupar anomalies cromosòmiques és heretable i condueix a alteracions fenotípiques múltiples, incloent la predisposició al càncer, tal i com es reporta en les famílies amb mutacions en els gens *BUB1B* i *CEP57* (Frio et al. 2010; Snape et al. 2011). Dos grups d'investigadors han identificat mosaïcisme somàtic per mutacions dels gens *IDH1* i *IDH2* com responsables de la malaltia d'Ollier i la síndrome de Maffucci (Amary et al. 2011; Pansuriya et al. 2011). Un altre grup ha caracteritzat el mosaïcisme somàtic d'una mutació d'*HRAS* en un individu amb càncer urotelial i nevus epidermal (Hafner et al. 2011). El mosaïcisme somàtic pot contribuir a diversos fenotips depenent del temps, del teixit involucrat, de la localització genòmica de la mutació, i del percentatge de cèl·lules afectades (Youssofian i Pyeritz 2002; Machiela i Chanock 2013; Biesecker i Spinner 2013).

A partir d'un estudi en bessons, s'ha suggerit que la detecció de variants estructurals somàtiques en sang incrementa amb l'edat i que poden estar relacionades amb una reducció de la clonalitat cel·lular en sang (Forsberg et al. 2012). D'acord amb els recents descobriments, Jacobs i col·laboradors (2012) proposen una definició més àmplia del mosaïcisme somàtic. Aquests autors defineixen les anomalies cromosòmiques en mosaic com la presència de cariotips normals juntament amb alteracions cromosòmiques, variacions en el nombre de còpies (CNVs) i pèrdues d'heterozigositat en subpoblacions diferents i detectables de cèl·lules, independentment de l'origen clonal o durant el desenvolupament de les subpoblacions.

Fins ara no era possible detectar la taxa de mosaïcisme somàtic implicant desequilibris genòmics en forma de CNVs. Es disposava d'evidències en bessons monozigòtics i teixits diferenciats però no hi havia informació sobre la seva incidència en poblacions

humanes (Piotrowski et al. 2008; Heim i Mitelman 2009). El desenvolupament de les tècniques de microarrays ha permès detectar mosaïcisme per desequilibris cromosòmics en mostres clíniques utilitzades en diagnòstics de rutina (Scott et al. 2010). Aquestes tecnologies han permès estimar que la freqüència de CNV post-zigòtiques s'aproxima al 5%. (Rodríguez-Santiago et al. 2010). Donat que el mosaïcisme somàtic pot resultar en un fenotip entermedi o inusual, els canvis somàtics en mosaic poden no tenir un efecte fenotípic aparent a més de no ser detectats pels mètodes d'alta resolució. De manera que la freqüència i rellevància del mosaïcisme en les poblacions humanes està probablement subestimada.

Piotrowski i col·laboradors (2008) reporten l'existència de mosaïcisme somàtic en les CNVs de cèl·lules humanes normals, i que inclús aquestes variacions estructurals s'han identificat entre bessons monozigòtics. A més, Rodríguez-Santiago i col·laboradors (2010) suggereixen que aquest mosaïcisme somàtic es produiria durant una fase primerenca del desenvolupament embrionari, però també reporten que aquest mosaïcisme estructural es troba tant en pacients amb BC com també en els controls sans d'edat avançada i representa l'1,7% de les variacions clonals en mosaic detectades en els autosomes, suggerint una elevada freqüència d'aquest mosaïcisme en la població adulta lliure de càncer.

Un altre aspecte és que la freqüència de CNVs varia en funció de l'edat i del tipus cel·lular (Piotrowski et al. 2008). En un estudi realitzat per Jacobs i col·laboradors (2012) observen que la freqüència d'aquest mosaïcisme incrementa significativament amb l'edat, i està dèbilment associat a gènere masculí i risc de tumors, en concret de pulmó i renals. Forsberg i col·laboradors (2012) estudiant DNA de leucòcits, van detectar mosaïcisme de CNVs relacionats amb l'edat entre parelles de bessons monozigòtics i en un 3,4% dels individus amb edats superiors als 60 anys. Aquest estudi no va trobar mosaïcisme en individus amb edats per sota dels 55 anys. En aquest estudi suggereixen que aquest increment clonal de cèl·lules alterades que s'observa amb l'edat en individus d'edat avançada es podria atribuir o bé a un increment en la taxa de mutacions somàtiques o bé a una disminució de la capacitat de mantenir la integritat del genoma.

Aquest mosaïcisme somàtic es considera un esdeveniment atzarós sense cap efecte fenotípic en la cèl·lula o clons de cèl·lules que la presenten. Ara bé, aquesta variació

podria afectar a un gen supressor de tumor o oncògen, resultant en una proliferació cel·lular descontrolada.





## **2. PREMISSE I OBJECTIUS**



## PREMISSA

Els llocs cromosòmics fràgils (CFS) són regions del genoma caracteritzades per la seva inestabilitat sota condicions d'estrès replicatiu, l'estudi de la seva expressió tant en pacients amb càncer com en individus control es pot considerar com un indicatiu d'inestabilitat genòmica.

La inestabilitat dels llocs fràgils es pot traduir en delecions o alteracions afectant la seva regió. De la mateixa manera, l'estrès replicatiu sota el qual s'expressen els CFS pot induir alteracions en el lloc fràgil o altres regions del genoma que podrien estar relacionades amb les que s'observen en els tumors.

El càncer de bufeta es pot considerar un model per l'estudi d'inestabilitat genòmica donada l'elevada freqüència de recidives i la multifocalitat o presència de tumors sincrònics i metacrònics en aquest òrgan.

## OBJECTIUS

1. Estudiar l'expressió de CFS en limfòcits de sang perifèrica d'una sèrie de pacients afectats de càncer de bufeta i comparar-la amb una sèrie de controls aparellats per edat i hàbit fumador.
2. Analitzar si les condicions d'estrès replicatiu sota les quals s'expressen els llocs fràgils indueixen alteracions dels loci 9p21 i *CCND1* en pacients i comparar-ho amb controls.
3. Analitzar la presència d'aneuploidies afectant als cromosomes 1, 7, 8, 9, 11 i 17 en el tumor i en la resta de l'uroteli vesical aparentment normal del mateix pacient.



### **3. MATERIAL I MÈTODES**



## **MOSTRES BIOLÒGIQUES**

Les mostres biològiques amb que s'ha realitzat aquest estudi són limfòcits humans i dues peces de bufeta humana sencera.

Els limfòcits humans van ser induïts amb APH per estudiar la inestabilitat cromosòmica constitucional així com les alteracions genètiques en determinats loci. Les característiques dels individus analitzats s'indiquen en la taula 3.1.1.

Les peces de cistectomia radical es va biopsiar en diferents punts per realitzar un mapa citogenètic molecular. Les característiques clíniques dels dos individus s'indiquen en la taula 3.2.1.

### **3.1. LIMFÒCITS**

Els limfòcits de sang perifèrica total van ser proporcionats per la xarxa SBC/EPICURO (*Spanish Bladder Cancer/ EPIdemiology of Cancer of the UROthelium*). La SBC/EPICURO és una xarxa multidisciplinària i multicèntrica per l'estudi del càncer de bufeta que comprèn tres àrees: epidemiològica, clínica i molecular. Aquesta xarxa estudia tant les causes d'exposició ambiental i genètiques del càncer de bufeta així com els factors pronòstic implicats en l'evolució de la malaltia. Entre el 1998 i el 2001, la xarxa SBC/EPICURO va recollir diferents tipus de mostres biològiques de 2.626 individus (controls i pacients) provinents de 18 hospitals de l'Estat espanyol. Aquests hospitals es localitzen a Astúries, Tenerife, Vallès Occidental/Bages, Alacant i Barcelona.

#### **Obtenció de les mostres**

Es van recollir 40 mL de sang perifèrica per venipunció en un tub estèril amb citrat sòdic com a anticoagulant. Per obtenir els limfòcits i procedir a la seva congelació, la sang se centrifuga per gradient de densitat i es fracciona la capa leucoplaquetària del plasma/sèrum i dels eritròcits. S'aspira i es renta amb PBS, i es resuspèn en medi de congelació. Es guarda en un criotub en nitrogen líquid fins el moment de la seva utilització.



**Taula 3.1.1.** Dades clíniques dels individus analitzats proporcionats per la xarxa SBC/EPICURO.

CAS	Tipus	Gènere	Edat	Fumador	Durada (anys)	Paquets/any	Estadi	Grau	Historial previ de càncer	Tipus de neoplàsia maligne	Edat del diagnòstic	Història familiar de càncer	Tipus de neoplàsia maligne
1	Pacient	Dona	71	Mai	0	0	T2	G3	SI	Úter	60	NO	NO
2	Pacient	Home	72	Ex-fumador	52	26	T4	G3	SI	Colon	67	SI	Mama en dones
3	Pacient	Dona	73	Mai	0	0	Ta	Benigne	NO	NO	0	SI	Colon, intestí prim incloent el duodè
5	Control	Dona	70	Mai	0	0			NO	NO	0	SI	Tràquea, bronquis i pulmó.
6	Pacient	Home	65	Actual	50	150	T1	G3	NO	NO	0	SI	Estómac
7	Pacient	Dona	74	Mai	0	0	Ta	G2	NO	NO	0	NO	NO
10	Pacient	Home	70	Ex-fumador	30,5	15,25	Ta	G2	SI	En altres llocs no especificats	34	NO	NO
11	Control	Home	71	Ex-fumador	43	43			NO	NO	0	SI	Tràquea, bronquis i pulmó.
12	Control	Dona	69	Mai	0	0			NO	NO	0	NO	NO
13	Control	Home	65	Fumador	49	49			NO	NO	0	NO	NO
15	Control	Home	71	Ex-fumador	47	47			NO	NO	0	NO	NO
19	Pacient	Dona	71	Mai	0	0	Ta	G1	SI	Pell	68	SI	Tràquea, bronquis i pulmó.
23	Control	Home	49	Ex-fumador	24	12			NO	NO	0	NO	NO
24	Pacient	Home	68	Ex-fumador	25	3,75	Ta	G1	SI	Pròstata	65	NO	NO
25	Control	Home	68	Ex-fumador	34,5	51,75			NO	NO	0	NO	NO
29	Control	Home	73	Fumador	59	88,5			NO	NO	0	NO	NO
31	Pacient	Home	67	Ex-fumador	31	23,25	?	?	SI	Mama	51	SI	Intestí prim incloent duodè i pròstata
34	Pacient	Dona	73	Mai	0	0	Ta	G1	SI	Limfomes	51	SI	Tràquea, bronquis i pulmó.
35	Pacient	Home	78	Ex-fumador	20	20	Ta	G1	NO	NO	0	SI	Intestí prim incloent el duodè

36	Pacient	Dona	66	?	?	?	?	?						
37	Pacient	Home	68	Fumador	54	216	Ta	G2	SI	Tràquea, bronquis i pulmó	66	SI	Tràquea, bronquis i pulmó.	
38	Pacient	Home	56	Fumador	34	34	Ta	G2	NO	NO	0	NO	NO	
39	Pacient	Home	56	Fumador	35	35	Ta	G1	SI	Ossos i cartílag articular	46	NO	NO	
41	Pacient	Home	71	Ex-fumador	46	69	Ta	G2	SI	Faringe	66	NO	NO	
42	Pacient	Home	69	Ex-fumador	35	35	Ta	G2	NO	NO	0	SI	?	
45	Pacient	Home	72	Mai	0	0	Ta	G2	NO	NO	0	SI	?	
46	Pacient	Home	69	Fumador	51	51	T4	G3	NO	NO	0	NO	NO	
47	Pacient	Home	80	Ex-fumador	?	?	T2	G3	SI	Estómac	73	SI	Estómac i leucèmia	
48	Pacient	Home	70	Ex-fumador	49	85,75	Ta	G1	NO	NO	0	SI	Laringe	
50	Control	Home	77	Ex-fumador	41	184,5			NO	NO	0	NO	NO	
51	Pacient	Dona	64	Fumador	34	34	T2	G3	SI	Mama	50	NO	NO	
52	Pacient	Dona	54	Fumador	28	56	Ta	G1	SI	Mieloma múltiple i neoimmunoproliferatiu	50	SI	Colon i cervell.	
54	Pacient	Dona	73	Mai	0	0	T1	G3	NO	NO	0	SI	Estómac	
55	Control	Home	70	Mai	0	0			NO	NO	0	SI	Fetge i ductes biliar intrahepàtics	
56	Control	Home	67	Ex-fumador	18	54			NO	NO	0	NO	NO	
57	Control	Home	67	Ex-fumador	18,3	27,45			NO	NO	0	NO	NO	
59	Control	Home	56	Fumador	31	38,75			NO	NO	0	NO	NO	

## Cultiu cel·lular

Per l'anàlisi de la fragilitat cromosòmica es va avaluar l'expressió de les lesions cromosòmiques. Aquestes lesions s'expressen sota unes condicions determinades de cultiu on s'inhibeix parcialment la replicació i la reparació del DNA (Durkin i Glover 2007). En sang, els limfòcits es troben en estat quiescent, és a dir, aturats en la fase  $G_0$  del cicle cel·lular. *In vitro* podem estimular l'entrada dels limfòcits T al cicle cel·lular sota l'acció de determinats mitògens, com la fitohemaglutinina (PHA, *phytohemaglutinine*). De manera que aquestes cèl·lules poden reincorporar-se al cicle cel·lular i proliferar. Aquesta proliferació *in vitro* presenta dos pics màxims de divisions mitòtiques, a les 72 h i a les 96 h. S'aprofita el pic màxim de 72 h per afegir la APH, retardant la replicació i fent visibles les lesions citogenètiques. Finalment s'extreu el cultiu a les 96 h.

## Reactius i solucions

- ✓ Afidicolina (C<sub>20</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub>) liofilitzada (APH, Sigma Aldrich)
- ✓ Carnoy:
  - Àcid acètic glacial (Merck)
  - Metanol (Merck)
  - En proporció 3 metanol/1 acètic (volum/volum)
- ✓ Dimetil sulfòxid (DMSO, Sigma Aldrich)
- ✓ Fitohemaglutinina (PHA, Gibco®)
- ✓ Heparina sòdica al 1% (Rovi)
- ✓ H<sub>2</sub>O tridesil·lada o H<sub>2</sub>O miliQ
- ✓ KaryoMax Colcemid líquid (C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>5</sub>; 10 mL; 10 µg/mL) (Gibco®)
- ✓ KCl 0,075M
- ✓ L-glutamina 200 mM (Gibco®)
- ✓ Medi de cultiu RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640/ *Glutamine*/ HEPES (Gibco®)
- ✓ Metanol al 70% (100 mL)
  - 70 mL de Metanol (Merck)
  - 30 mL H<sub>2</sub>O MiliQ
- ✓ Penicil·lina (100 U.I./mL)/Estreptomicina(0,1 mg/mL) (Gibco®)
- ✓ Sèrum Fetal Boví (FCS, Gibco®)
- ✓ Solució Leishman:
  - Colorant Leishman (BDH/GURR)
  - Tampó Leishman (BDH/GURR)

En proporció: 1 colorant/4 tampó (volum/volum)

#### Preparació del medi de cultiu

1. Es complementen en condicions estèrils 100 mL de medi de cultiu RPMI-1640/*Glutamine*/ 25mM de HEPES amb:
  - 20mL sèrum fetal boví (FCS, *fetal calf serum*) inactivat mitjançant calor a 57 °C durant 30 min.
  - 2 mL penicil·lina/estreptomicina
  - 1mL d'heparina sòdica
  - 2 mL L-glutamina a 200 mM
2. S'homogeneïtza i es fan alíquotes en tubs cònics estèrils de 10 mL. Es conserven a -20 °C.

#### Preparació de les alíquotes de fitohemaglutinina i L-glutamina

3. Es preparen alíquotes de 50 µL de L-glutamina a 200 mM, i de 120 µL de fitohemaglutinina. Tots els vials es guarden congelats a -20 °C.

La fitohemaglutinina és un extracte vegetal que estimula els limfòcits de mamífers *in vitro*. Degut a què és un extracte no es pot conèixer la seva concentració exacte. No obstant, el fabricant aconsella utilitzar 1-2mL de fitohemaglutinina per 100 mL de medi de cultiu.)

#### Preparació de la solució estoc d'APH 2 mM

4. Es resuspèn 1 mg d'APH (liofilitzada) en 1.450 µL de DMSO a una concentració de 2 mM.
5. S'homogeneïtza i s'alíquota en un tub Eppendorf d' 1,5 mL. Es conserva a -20 °C.

#### Pretractament de la mostra i sembra dels limfòcits congelats

6. Per cada cultiu de limfòcits és necessari descongelar dues alíquotes de medi RPMI-1640/ *Glutamine*/ HEPES. Una per pre-tractar els limfòcits congelats i l'altra, que s'utilitzarà pel cultiu, es complementa amb 50 µL de L-glutamina 200 mM i 120 µL de fitohemaglutinina.

7. Es descongela amb molta cura el criotub de limfòcits utilitzant 1,5 mL de medi RPMI-1640/ *Glutamine*/ HEPES. Es recull tot el volum i es transfereix al tub que conté la resta de medi de cultiu.
8. Se centrifuga durant 8 min a 600xg.
9. Es decanta el sobrenedant i es resuspèn el botó cel·lular en 1 mL de medi RPMI-1640/ *Glutamine*/ HEPES complementat.
10. S'afegeix la resta de medi RPMI-1640/ *Glutamine*/ HEPES complementat i s'incuba a 37 °C durant 96 h al 5% de CO<sub>2</sub>. És convenient deixar els tubs inclinats, agitant-los suaument cada 24 h per tal que les cèl·lules no precipitin i el repartiment dels nutrients sigui el més homogeni possible.

#### Inducció de fragilitat

11. A les 72 h de cultiu s'afegeix APH a una concentració final de 0,2 µM.
12. 30 min abans de l'extracció s'afegeix colcemid a una concentració final de 0,1 g/mL (figura 3.1).

#### Extracció del cultiu

13. Se centrifuguen els tubs a 600xg durant 6 min.
14. Es decanta el sobrenedant.
15. Es resuspèn el botó amb una solució hipotònica de KCl 0,075 M. Aquest tractament osmòtic es realitza amb cura, gota a gota, fins assolir un volum aproximat de 7 mL. Es deixa actuar 15 min a 37 °C.
16. Es prefixa la mostra afegint 3 gotes de carnoy/tub de sembra i s'homogeneïtza.
17. Se centrifuga a 600 g durant 6 min.
18. Es decanta el sobrenedant.
19. Es realitzen un o dos rentats més amb carnoy fresc resuspenent el botó amb l'ajuda del vòrtex. És recomanable no realitzar més de dos rentats ja que no partim d'una mostra de sang total.
20. Després de cada rentat se centrifuga la mostra a 600xg durant 6 min, es decanta el sobrenedant i es resuspèn el botó amb un volum similar de carnoy. En aquest punt, la mostra es pot conservar a -20 °C.
21. Finalment, es resuspèn el botó amb carnoy fresc, acabat de preparar. El volum final serà variable, entre 0,5-1 mL, en funció del botó obtingut.

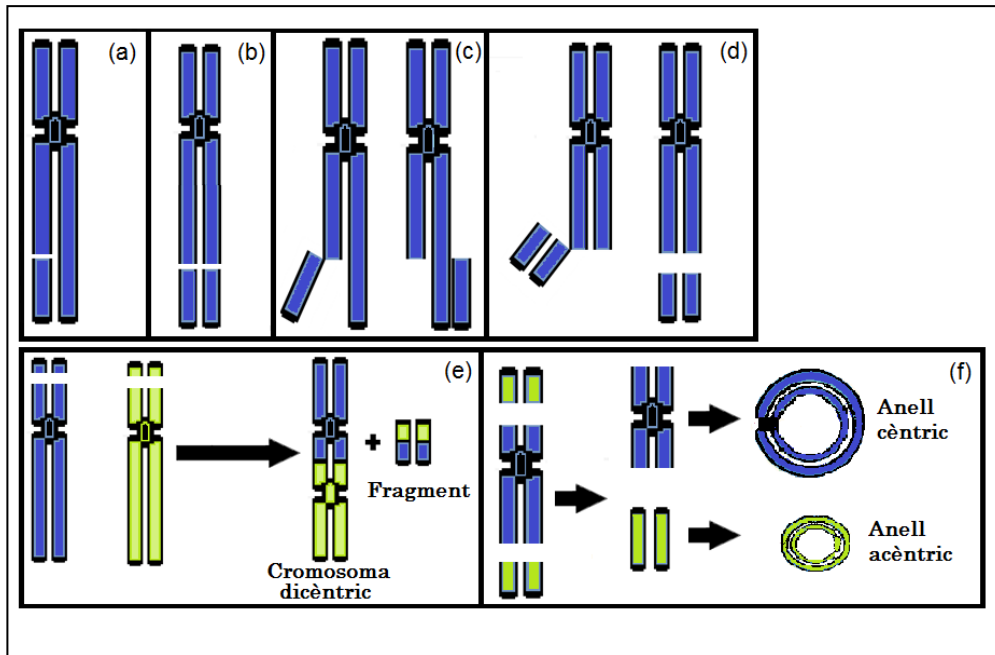
### Extensió i tinció uniforme

22. Els portaobjectes submergits en metanol al 70% a  $-20^{\circ}\text{C}$  es netegen per tal d'eliminar les restes de greix i les possibles brosses.
23. Es realitza l'extensió sobre el portaobjectes, deixant caure de 2 a 3 gotes des d'una certa alçada.
24. Un cop el material s'ha assecat, es tenyeix uniformement amb el colorant Leishman durant 6 min.

### Criteri d'anàlisi de les lesions cromosòmiques

La mostra codificada i tenyida uniformement es rastreja amb l'objectiu de 10 augments (100 x) amb un microscopi de camp clar, Nikon Eclipse 90i acoblat a una càmera digital. S'analitzen un mínim de 45 metafases per mostra. Les metafases seleccionades havien de complir els requisits següents: que fossin completes, amb poques superposicions, ben tenyides i amb cromosomes de mida mitjana, no molt llargs, ja que el longitud del cromosoma influeix en la freqüència d'expressió dels FS per metafase (Mrasek et al. 2010). Un cop seleccionades es van capturar amb l'objectiu de 100 augments (1000 x) utilitzant el programa *Ikaros Systems* (Metasystems).

Les lesions cromosòmiques es van classificar com a *gaps* o lesions acromàtiques i trencaments, de cromàtide o de cromosoma. (figura 3.1.1). De manera que es va comptabilitzar una lesió tipus gap o acromàtica quan el trencament de la cromàtide o del braç cromosòmic presentava una amplada de lesió menor a l'amplada de la cromàtide o del braç cromosòmic corresponent (figura 3.1.1a i 3.1.1b). Sovint en les lesions de tipus *gap* es pot observar un filament que uneix els dos extrems trencats i que confirma la lesió acromàtica. Es va comptabilitzar una lesió de tipus trencament de braç cromosòmic o de cromàtide quan l'amplada de la lesió era superior a l'amplada del braç cromosòmic o de la cromàtide corresponent (figura 3.1.1c i 3.1.1d). Sovint amb la tècnica de tinció uniforme també es van poder detectar altres figures com cromosomes en anell, cromosomes dicèntrics i fragments. Els cromosomes dicèntrics i en anell (figura 3.1.1e i 3.1.1f, respectivament) es formen degut a un doble trencament de les dues cromàtides i els fragments generats es poden unir o no.



**Figura 3.1.1.** Representació dels diferents tipus de lesions cromosòmiques observades per tinció uniforme: a) *gap* de cromàtide; b) *gap* de cromosoma; c) trencament de cromàtide; d) trencament de cromosoma; e) formació d'un cromosoma dicèntric amb un fragment acèntric; f) formació d'un cromosoma en anell amb o sense centròmer.

## Hibridació in situ fluorescent per l'anàlisi dels loci 9p21 i *CCND1*

La hibridació in situ fluorescent (FISH) és un tècnica de citogenètica molecular que permet analitzar determinades seqüències del genoma mitjançant la hibridació amb sondes específiques marcades amb un fluorocrom (figura 3.1.2). Es pot utilitzar en nuclis interfàsics i/o metafases i per tant, és una tècnica molt versàtil que es pot aplicar tant en investigació com en diagnòstic clínic (Fan 2002).

En funció del que es vulgui analitzar, s'utilitzaran unes sondes o unes altres. La FISH és un mètode sensible i específic que proporciona informació precisa de la localització física de les seqüències de DNA. També permet la identificació d'alteracions numèriques (aneuploïdies) i/o estructurals (Fan 2002).

Per valorar els loci 9p21 i *CCND1*, i els seus centròmers s'han utilitzat les sondes comercials (Vysis Inc., Downers Grove, IL):

- LSI *Cyclin D1* (11q13) *SpectrumOrange* / CEP 11 *SpectrumGreen*. És una sonda dual color de DNA de seqüència única que permet avaluar el nombre de còpies del gen *CCND1* i el nombre de còpies del centròmer del cromosoma 11.

- LSI *CDKN2A SpectrumOrange/CEP 9 SpectrumGreen*. És també una sonda dual color de seqüència única que conté els marcadors: D9S1749, D9S1747, p16(INK4B), p14(ARF), D9S1748, p15(INK4B) i D9S1752. També permet avaluar el nombre de còpies del locus *CDKN2A* i del centròmer del cromosoma 9.

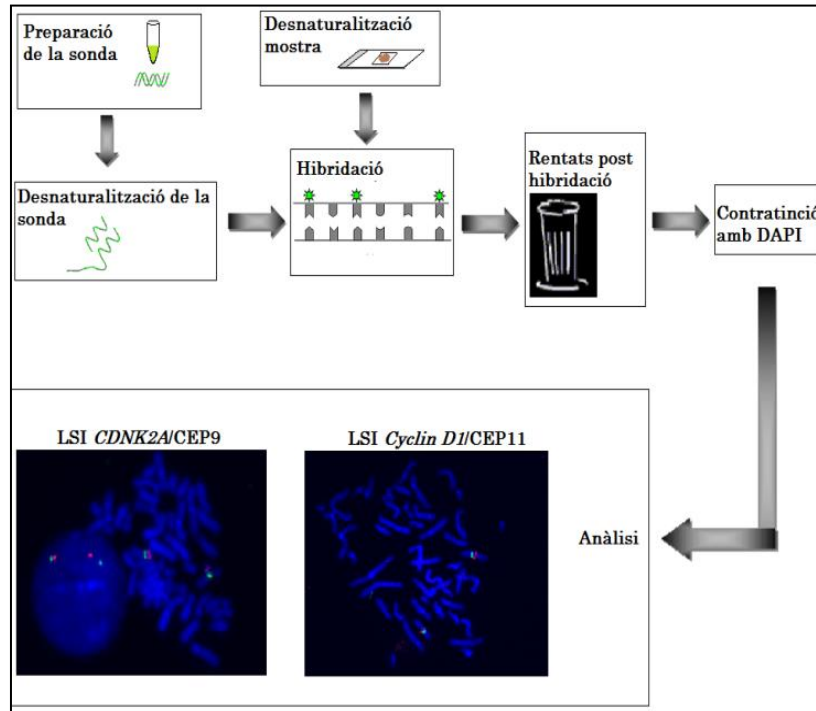


Figura 3.1.2. Esquema dels diferents passos del protocol FISH

### Reactius i solucions

- ✓ DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindol) liofilitzat (Sigma Aldrich) es resuspèn en 1 mL H<sub>2</sub>O MiliQ obtenint una concentració d'1 mg/mL. Es realitza una dilució seqüencial 1/10 i 1/40, en H<sub>2</sub>O MiliQ. D'aquesta última dilució es barregen:
  - 50 µL de la dilució 1/40
  - 50 µL H<sub>2</sub>O MiliQ
  - 990 µL antifade (vectashield) $V_{FINAL} = 1 \text{ mL}$  a una concentració de 125 ng/mL. Aquesta és la dilució de treball que es fa servir en totes les tècniques on s'utilitzi el DAPI.
- ✓ Etanol 70% (100 mL)
  - 30 mL H<sub>2</sub>O MiliQ
  - 70 mL Etanol 100% (Merck)
- ✓ Etanol 85% (100 mL)
  - 15 mL H<sub>2</sub>O MiliQ
  - 85 mL Etanol 100% (Merck)



- ✓ Etanol Absolut 100% (Merck)
- ✓ Formamida 70% / 2 x SSC (pH 7,0-7,5; 50 mL)
  - 35 mL formamida (Riedel-de Häen)
  - 5 mL 20 x SSC
  - 10 mL H<sub>2</sub>O miliQ
- ✓ Formaldehid 1% en PBS / MgCl<sub>2</sub> 50 mM (50 mL)
  - 2,50 mL MgCl<sub>2</sub> 1M
  - 1,50 mL Formaldehid (Panreac)
  - enrasar amb PBS fins a 50 mL
- ✓ HCl 1 M (Merck)
- ✓ LSI *CCND1* (11q13) SpectrumOrange/ CEP11 SpectrumGreen (Abbott Molecular)
- ✓ LSI *CDKN2A* SpectrumOrange/CEP9 SpectrumGreen (Abbott Molecular)
- ✓ Pepsina a 50 µg/mL en HCl 10 mM (50 mL)
  - 25 µL de pepsina (100 mg/mL) (Sigma Aldrich)
  - 49,5 mL d'H<sub>2</sub>O miliQ
  - 0,5 mL d'HCl 1 M (Merck)
- ✓ PBS 10 x (*Phosphate-Buffered Saline*; pH 7,0; 1 L)
  - 8,00 g NaCl
  - 0,20 g HCl (Merck)
  - 1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - 0,20 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - enrasar amb H<sub>2</sub>O miliQ fins a 1 L
- ✓ PBS 1 x (pH 7; 500mL)
  - 50 mL PBS 10x
  - 450 mL H<sub>2</sub>O MiliQ
- ✓ 0,4 x SSC / 0,3% NP-40 (pH 7; 1 L)
  - 20 mL 20 x SSC
  - 3 mL NP-40
  - enrasar amb H<sub>2</sub>O MiliQ fins a 1 L
- ✓ 2 x SSC (pH 7,0; 1 L)
  - 100 mL 20 x SSC
  - enrasar amb H<sub>2</sub>O MiliQ fins a 1 L
- ✓ 2 x SSC / 0,1% NP-40 (pH 7; 1 L)
  - 100 mL 20 x SSC
  - 1 mL NP-40
  - enrasar amb H<sub>2</sub>O MiliQ fins a 1 L

- ✓ 20 x SSC (pH 5,3: 1 L)
  - 175,32 g NaCl
  - 88,22 g Citrat Sòdic
  - enrasar amb H<sub>2</sub>O MiliQ fins a 1 L
- ✓ Vectashield o solució antiesvaïment

#### Tractament Pre-hibridació

1. Els portaobjectes submergits en metanol al 70% a – 20°C es netegen per tal d'eliminar les restes de greix i les possibles brosses
2. Es realitza l'extensió deixant caure 1-2 gotes i es delimita amb un llapis de diamant l'àrea on tenim la mostra.
3. S'envelleix la mostra en 2 x SSC a 37 °C durant 30 min.
4. Es renta en PBS 1x durant 5 min.
5. Es deshidrata en una sèrie d'etanols al 70%, 85% i 100% a T<sup>a</sup> ambient durant 1 min cadascun.
6. Es desproteïnitza en una solució de pepsina a 37 °C durant 3 min.
7. Es renta dues vegades en 2 x SSC a T<sup>a</sup> ambient durant 5 min.

#### Post-fixació

(Aquest pas serveix per conservar al màxim la morfologia cel·lular)

8. Es fixa la mostra durant 10 min en formaldehid a l'1%.
9. Es renta dues vegades en PBS 1x durant 5 min.
10. Es deshidrata en una sèrie d'etanols al 70%, 85% i 100% successivament, a T<sup>a</sup> ambient, durant 1 min cadascun.
11. Es deixen assecar a T<sup>a</sup> ambient.

#### Hibridació

12. Es barregen 2 µL de sonda amb 8 µL de tampó d'hibridació.
13. Es desnaturalitza la mostra en formamida al 70% a 72 °C durant 5 min.
14. Es deshidrata la mostra en una sèrie d'etanols freds (-20°C) al 70%, 85% i 100% durant 2 min cadascun.
15. Es desnaturalitza la sonda durant 5 min a 72 °C.  
Aquest pas es fa alhora dels 2 últims minuts de deshidratació de la mostra al etanol 100%. Així es disposarà del temps necessari perquè s'evapori l'etanol

dels portaobjectes. Aquest pas es realitza a sobre d'una placa calefactora a 37 °C.

16. Es col·loca la sonda sobre l'àrea delimitada on tenim la mostra.
17. Es cobreix amb un cobreobjectes de 20 x 20 mm evitant que quedin bombolles. (Si es formessin bombolles es realitzarà una mica de pressió guiant aquestes bombolles cap a un extrem del cobreobjectes per tal d'eliminar-les).
18. Se segellen els marges del cobreobjectes amb goma aràbiga (per tal d'evitar l'evaporació de la sonda).
19. Es col·loquen els portaobjectes en una cambra humida, prèviament temperada a 37 °C.
20. Es col·loca la cambra humida dins una estufa a 37 °C tota la nit.

#### Rentats post-hibridació

21. Es retira la goma aràbiga i el cobreobjectes amb l'ajuda d'unes pinces.
22. Es renta en 0,4 x SSC/ 0,3% NP40 a 73 °C durant 2 min.
23. Es renta en 2 x SSC/ 0,1% NP40 durant 2 min a T<sup>a</sup> ambient.
24. Es deshidrata en una sèrie d'etanols freds (-20 °C) 70% ,85% i 100% durant 1 min cadascun.
25. S'afegeix la contratinció: 12 µL de DAPI a 125 ng/mL
26. Es col·loca un nou cobreobjectes de 24 x 32 mm vigilant que no quedin bombolles.

#### Criteri d'anàlisi dels senyals

Per l'anàlisi dels loci 9p21 i *CCND1* s'ha utilitzat el microscopi de fluorescència Nikon Eclipse 90i equipat amb els filtres FITC (Ref. 310B-SPGR) (*Spectrum Green*), Orange (Ref. 310B-SPOR) (*Spectrum Orange*) i DAPI (Ref. 310B-DAPI) acoblats a una càmera digital.

Amb l'objectiu de 10 augments (100 x) i la contratinció de DAPI, s'escaneja la mostra per avaluar la distribució cel·lular. S'analitzen un mínim de 200 nuclis, sense superposicions i amb el contorn nuclear intacte. En els casos que ha estat possible, també s'han analitzat metafases. Les imatges s'analitzen i es capturen utilitzant el programa *Isis Imaging System* (Metasystems).

La sonda LSI *Cyclin D1* (11q13) *SpectrumOrange* /CEP 11 *SpectrumGreen* és una sonda dual de DNA que mesura aproximadament 300 kb i que permet avaluar el nombre de còpies del gen *CCND1* per una banda i per l'altra, el nombre de còpies del centròmer del cromosoma 11. La sonda LSI *CDKN2A* *SpectrumOrange*/CEP 9 *SpectrumGreen* és també una sonda dual que mesura aproximadament 222 kb i que conté els marcadors: D9S1749, D9S1747, p16(INK4B), p14(ARF), D9S1748, p15(INK4B) i D9S1752. Aquesta també permet avaluar el nombre de còpies del locus *CDKN2A* i del centròmer del cromosoma 9.

### **3.2. BUFETES**

Les dues peces de cistoprostatectomia radical van ser proporcionades per la Corporació Sanitària Parc Taulí de Sabadell-UDIAT Centre Diagnòstic. Les dades clíniques dels dos pacients es troben resumides en la taula 3.2.1

Per establir el grau i estadi de cada pacient es va utilitzar el sistema WHO (*World Health Organization*) 2003 i el sistema de classificació TNM 2009.

#### **Obtenció de les peces de cistectomia radical**

La bufeta 1 provenia d'un pacient masculí de 56 anys. Fumador fins als 49 anys. Al febrer del 2008 se li van practicar RTUs (resecció transuretrals) a l'atzar, les quals van diagnosticar un carcinoma urotelial papil·lar amb àrees de diferenciació glandular, d'alt grau histològic amb infiltració a múscul llis, T2G3 (WHO 2003). Degut a la infiltració a múscul, al maig del mateix any es procedeix a la extirpació quirúrgica total de la bufeta i de la pròstata (cistoprostatectomia radical). Després de la cistoprostatectomia es van realitzar, entre d'altres, cinc seccions histològiques del tumor que el van identificar com un carcinoma urotelial pur papil·lar d'alt grau que infiltra focalment al teixit connectiu subepitelial. L'estadiatge oncològic de la peça correspon a T1G3 (WHO 2003). També s'observen extenses àrees de carcinoma urotelial in situ (CIS) peritumoral i en paret posterior. Les vesícules seminals no presentaven infiltració neoplàsica, i els ganglis limfàtics no presentaven evidència de metàstasi.

La bufeta 2 provenia també d'un pacient masculí de 64 anys. Al març de 2008 se li van practicar RTUs a l'atzar que van diagnosticar un carcinoma urotelial amb diferenciació escamosa, d'alt grau histològic amb infiltració a múscul, T2G3 (WHO 2003). Degut a la infiltració a múscul, al juny del mateix any es procedeix a l'extirpació quirúrgica total de la bufeta i de la pròstata (cistoprostatectomia radical). Després de la cistoprostatectomia radical, també es van realitzar entre d'altres, set seccions histològiques del tumor sense evidència de neoplàsia residual. Les vesícules seminals no presentaven infiltració neoplàsica, i els ganglis limfàtics no presentaven evidència de metàstasi.

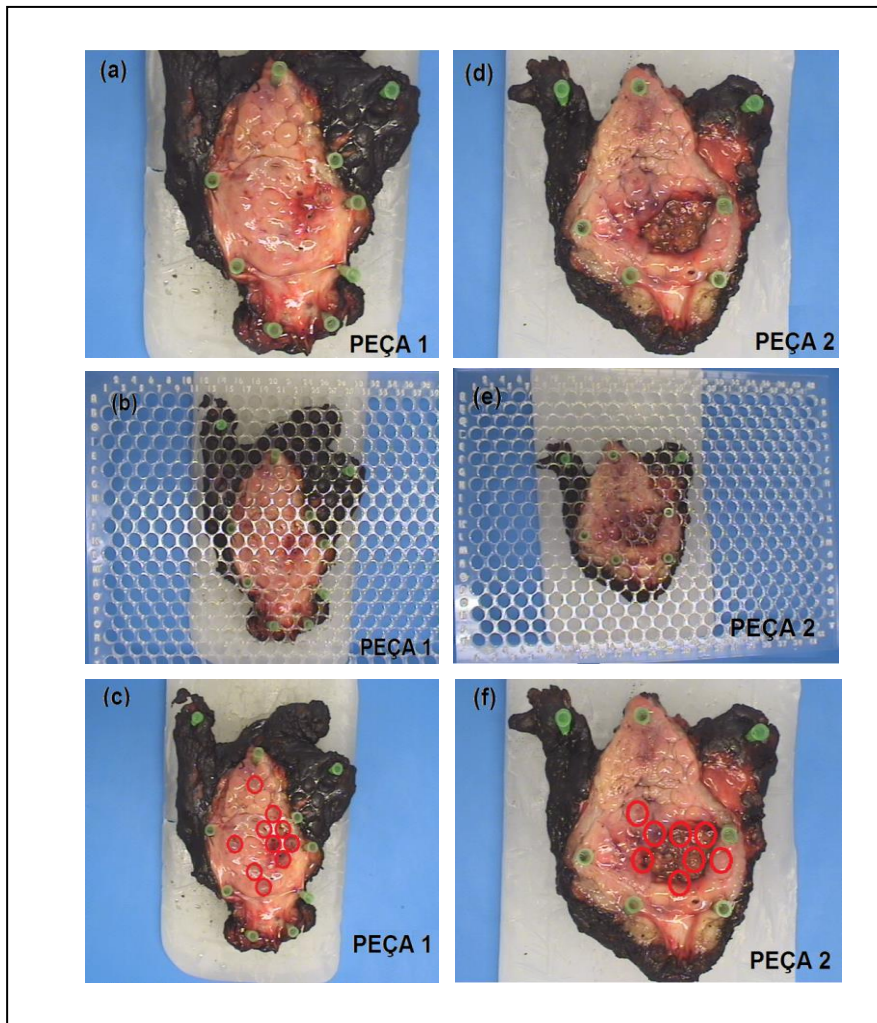
**Taula 3.2.** Dades clíniques dels dos pacients cistoprostatectomitzats

	<b>PACIENT 1</b>	<b>PACIENT 2</b>
<b>Edat (anys)</b>	56	64
<b>Sexe</b>	Maculí	Maculí
<b>Fumador</b>	Ex - fumador	Ex - fumador
<b>Enòlic</b>	No	Ex - enòlic
<b>Estadi oncològic en les primeres RTUs</b>	T2G3	T2G3
<b>Estadi oncològic després de la cistoprostatectomia</b>	T1G3	Sense evidència de neoplàsia residual
<b>Vesícules seminals</b>	Lliures de infiltració neoplàsica	Lliures de infiltració neoplàsica
<b>Ganglis limfàtics</b>	Sense evidència de metàstasi	Sense evidència de metàstasi
<b>Recidiva</b>	Si	No

RTU, resecció transuretral

En els dos casos, un cop s'ha realitzat la anàlisi histopatològica de la peça de cistectomia, es va procedir a l'obtenció de les diferents mostres. La peça de cistectomia oberta a través de la paret anterior en forma d' Y invertida s'enganxa sobre un bloc de parafina amb l'ajuda d'unes agulles d'extracció estèrils. La selecció de les mostres no es va realitzar a l'atzar, de manera que es va dissenyar un suport de metacrilat per tal de localitzar totes les biòpsies realitzades en les dues peces. Aquest suport contenia 270 posicions alternades amb 18 files (A-R) i 30 columnes (1-30).

Posteriorment, aquest suport es va col·locar sobre la bufeta oberta per tal de determinar el punt exacte d'extracció de les diferents mostres (figura 3.2.3).



**Figura 3.2.1.** Imatge de les dues peces de cistectomia radial corresponents al pacient 1 a la dreta (a, b i c) i al pacient 2 a l'esquerra (d, e i f). En les imatges (b) i (e) es pot observar el suport de metacrilat a sobre de la peça de cistectomia, i en les imatges (c) i (f) la localització exacte de les biòpsies realitzades en cadascuna de les peces.

L'extracció de les diferents mostres es va realitzar amb el *Biopsy Punch*, Stiefel®. Aquest sistema permet que les tres capes cel·lulars de l'uroteli fins la capa muscular estiguin representades en les diferents mostres.

La identificació de les biòpsies es realitza de forma diferent per les dues peces de cistectomia. De manera que per les biòpsies provinents de la peça de cistectomia 1 s'identifiquen primer amb el número de la columna i seguidament amb la lletra de la fila. De forma inversa, les biòpsies provinents de la peça de cistectomia 2 s'identifiquen primer amb la lletra de la fila i seguidament amb el nombre de la columna al qual

pertany la mostra. Immediatament després de l'obtenció de les mostres, s'introdueixen en un criotub prèviament identificat en funció de la localització de la biòpsia i es congelen en nitrogen líquid (-176°C) fins la realització de la empremta.

## Empremtes de teixit

Per elaborar el mapa citogenètic molecular a partir de les peces provinents de dues cistectomies radicals humanes s'ha utilitzat la tècnica de les empremtes de teixit. Els tumors sòlids, especialment els epitelials, són difícils de fer créixer *in vitro* i obtenir metafases per un estudi citogenètic. Les empremtes de teixit (*touch o tissue imprints*) permeten un anàlisi directa de les alteracions presents en el teixit d'estudi sense la necessitat de realitzar un cultiu primari (Nadal et al. 2005).

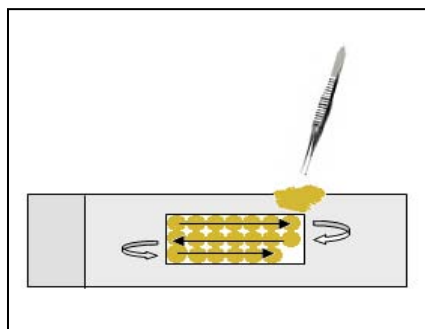
## Reactius i solucions

- ✓ Etanol Absolut 100% (Merck)
- ✓ Etanol 85%
  - 85 mL etanol absolut (Merck)
  - 15 mL d'H<sub>2</sub>O miliQ
- ✓ Etanol 70%
  - 70 mL d'etanol absolut (Merck)
  - 30 mL d'H<sub>2</sub>O miliQ
- ✓ Formaldehid 1% en PBS/ MgCl<sub>2</sub> (50 mL)
  - 2,50 mL MgCl<sub>2</sub> 1 M
  - 1,50 mL formaldehid al 37% (Panreac)
  - 5 mL PBS 10 x
  - enrasar fins a 50 mL amb H<sub>2</sub>O miliQ
- ✓ MgCl<sub>2</sub> 1M (100 mL)
  - 20,33 g de MgCl<sub>2</sub>
  - 100 mL H<sub>2</sub>O miliQ
- ✓ Pepsina 10 µg/mL en HCl 10 mM (50 mL)
  - 5 µL de pepsina (100 mg/mL) (Sigma Aldrich)
  - 50 mL HCl 1 M
- ✓ PBS 1 x (500 mL; pH 7,00)
  - 50 mL PBS 10 x
  - 450 mL H<sub>2</sub>O miliQ
- ✓ PBS 1 x / MgCl<sub>2</sub> 1 M (50mL)

- 2,5 mL MgCl<sub>2</sub> 1M
- enrasar amb PBS 1x fins a 50 mL
- ✓ PBS 10 x (*Phosphate-Buffered Saline*; pH 7,0; 1 L))
  - 8,00 g NaCl
  - 0,20 g HCl (Merck)
  - 1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - 0,20 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - enrasar amb H<sub>2</sub>O miliQ fins a 1 L

### Preparació de la mostra

1. Es netegen els portaobjectes per tal d'eliminar les restes de greix i les possibles brosses.
2. Les mostres de tumor i de les diferents regions de la bufeta es treuen del nitrogen líquid i es mantenen en neu carbònica per tal de preservar el teixit intacte.  
(És convenient que aquest pas no duri massa estona ja que el teixit, tot i estar en neu carbònica, es troba a una temperatura més alta que en nitrogen líquid. Per tal de no malmetre la mostra es realitzaran diferents empremtes a la vegada).
3. Es delimita amb el llapis de diamant la zona sobre el portaobjectes on es realitza l'empremta.
4. Amb unes pinces estèrils, s'agafa la mostra i es pressiona suaument sobre el portaobjectes. Se seguirà una direccionalitat en el moment de realitzar l'empremta de teixit, de manera que s'anirà seguint una línia recta fins arribar al marge de l'àrea delimitada. Un cop s'hagi arribat al marge, es seguirà per sota, també en línia recta i així successivament, realitzant diferents files, fins a recobrir tota l'àrea delimitada pel llapis de diamant (figura 3.2.2).



**Figura 3.2.2.** Realització de les empremtes sobre un portaobjectes



### Fixació de la mostra

5. Es fixa la mostra amb calor sec a 65 °C durant 15 hores.

Existeixen diferents protocols de fixació. El més utilitzat consisteix en recobrir la zona empremtada amb una dilució de formaldehid a l'1% en PBS/ MgCl<sub>2</sub> i es deixa actuar durant 10 min. La fixació utilitzant formaldehid no va funcionar en bufeta. Es va intentar combinar la fixació amb formaldehid 1% en PBS/ MgCl<sub>2</sub> durant 10 min combinat amb calor sec (65 °C) durant 45 min i tampoc va funcionar. Es descriu que les bufetes poden presentar greix en tots els nivells (Jameson 2008) i probablement és degut a aquest que quan es miraven les empremtes acabades de fer, s'observava com una capa que recobria tota l'àrea empremtada. De manera que es va optar per fixar la mostra utilitzant el mètode de calor sec.

### Rentats post fixació

6. Es desproteïnitza amb una solució de pepsina 10 µg/mL durant 5 min a 37 °C.
7. Es renta amb PBS 1 x durant 5 min en agitació.
8. Es renta amb PBS 1 x / MgCl<sub>2</sub> durant 5 min.
9. Es renten els portaobjectes amb PBS 1 x durant 5 min, en agitació.
10. Es torna a rentar amb PBS 1 x / MgCl<sub>2</sub> durant 5 min.
11. Es fixa amb formaldehid 1% en PBS/ MgCl<sub>2</sub> durant 10 min.
12. Es renta durant 5 min en PBS 1 x.
13. Es deshidrata en una sèrie d'etanols (70%-85%-100%) durant 3 min cadascun, a T<sup>a</sup> ambient.
14. S'asseca a T<sup>a</sup> ambient.
15. És convenient observar al microscopi invertit les empremtes per saber si la preparació està neta i tenim la suficient concentració de nuclis per a realitzar la tècnica d'hibridació *in situ* fluorescent amb oligonucleòtids.

## **Hibridació in situ fluorescent amb oligonucleòtids marcats**

Les empremtes de teixit permeten analitzar un gran nombre de cèl·lules o nuclis interfàsics que mantenen la seva morfologia i integritat, ja que no provenen d'una secció de teixit. Aquests dos criteris permeten aplicar la tècnica de FISH per avaluar els tumors i la mucosa vesical.

Els oligonucleòtids utilitzats en aquesta tècnica van ser proporcionats pel Dr. Joan Aurich d'One Cell Systems (Cambridge, MA).

### Reactius i solucions

- ✓ DAPI (*4'-6-diamidino-2-phenylindol*) 125 ng/mL (descriu a la secció 3.1.3 apartat B) (Sigma Aldrich)
- ✓ Etanol Absolut 100% (Merck)
- ✓ Etanol 90% (100 mL)
  - 90 mL etanol absolut (Merck)
  - 10 mL H<sub>2</sub>O miliQ
- ✓ Etanol 80% (100 mL)
  - 80 mL etanol absolut (Merck)
  - 20 mL H<sub>2</sub>O miliQ
- ✓ Etanol 70% (100 mL)
  - 70 mL etanol absolut (Merck)
  - 30 mL H<sub>2</sub>O miliQ
- ✓ Formamida 70% (50 mL)
  - 35 mL formamida (Riedel-de Hën)
  - 5 mL 20 x SSC
  - 10 mL H<sub>2</sub>O miliQ
- ✓ Oligo FISH Probes 2 color kit for chr. 1q12 red (ex418/em467) i 11 green (ex580/em599) analyte specific reagent. (One Cell Systems, Inc.)
- ✓ Oligo FISH Probes 2 color kit for chr. 1q12 aqua (ex418/em467) i 11 red (ex580/em599) analyte specific reagent. (One Cell Systems, Inc.)
- ✓ Oligo FISH Probes 2 color kit for chr. 9q12 aqua (ex418/em467) DY415 i 17 red (ex580/em599) DY590 analyte specific reagent (One Cell Systems, Inc.)
- ✓ Oligo FISH Probes 2 color kit for chr. 7 green (ex418/em467) and 8 red (ex580/em599) analyte specific reagent. (One Cell Systems, Inc.)
- ✓ Oligo FISH Probes 2 color kit for chr. 7 aqua (ex418/em467) and 8 red (ex580/em599) analyte specific reagent. (One Cell Systems, Inc.)
- ✓ 0,2 x SSC/ 0,3% NP-40 (50 mL)
  - 0,5 mL 20 x SSC
  - 150 µL NP-40
  - 49,35 mL H<sub>2</sub>O miliQ
- ✓ 2 x SSC (pH 7,00; 1 L)
  - 100 mL 20 x SSC

- 900 mL H<sub>2</sub>O miliQ
- ✓ 20 x SSC (pH 5,3; 1 L)
- 175,32 g NaCl
- 88,22 g Citrat Sòdic
- enrasar amb H<sub>2</sub>O MiliQ fins a 1 L

### Hibridació

1. Es preparen les barreges dels oligonucleòtids. Cada mix contindrà:
  - 0,5 µL d'oligonucleòtid
  - 0,5 µL de tampó
2. Es desnaturalitzen els portaobjectes durant 2 min en formamida al 70 % a 72 °C.
3. Es deshidraten en una sèrie d'etanols a 4 °C: 70 %, 80 %, 90 % i 100 % durant 2 min cadascun.
4. Es deixen assecar els portaobjectes.
5. S'afegeix la mix sobre l'àrea delimitada i es cobreix amb un cobreobjectes.
6. S'hibrida durant 5 min en una cambra humida a 37 °C.

### Rentats post hibridació

7. Es renta en 2 x SSC durant 5 min en agitació a T<sup>a</sup> ambient.
8. Es fa un rentat amb 0,2 x SSC/ 0,3% NP-40 durant 2 min a 50 °C.
9. Es torna a fer un tercer rentat en 2 x SSC a T<sup>a</sup> ambient durant 3 - 5 min.

### Contratinció

10. S'afegeix 10 µL de DAPI a una concentració de 125 ng/mL.
11. Es cobreix amb un cobreobjectes de 24 x 24 mm.

### Criteri d'anàlisi

Les cèl·lules van ser seleccionades en funció dels criteris morfològics utilitzant la tinció de DAPI. Els limfòcits, que es poden identificar clarament, van ser descartats. Per l'anàlisi s'ha utilitzat el microscopi de fluorescència Nikon Eclipse 90i equipat amb els filtres FITC (*Spectrum Green*), Red (*Spectrum Red*), Aqua (*Spectrum Aqua*) i DAPI acoblats a una càmera digital.

Amb l'objectiu de 10 augments (100 x) i la contraindicació de DAPI, s'escaneja la mostra per avaluar la distribució cel·lular. S'analitzen un mínim de 200 nuclis intactes, sense superposicions i amb el contorn nuclear intacte.

Les imatges es van analitzar i capturar amb un microscopi de fluorescència associat al programa Isis Imaging System (Metasystems).

#### Nota del mètode emprat

Van sorgir problemes alhora de visualitzar el senyal verd del *kit 1 Red/11 Green* i també del *kit 8 Red/ 7 Green*. Es va intentar disminuir la temperatura de rentat de 50 °C a 48 °C però només s'aconseguia incrementar la intensitat del senyal *Red* i a més, es trobava hibridació inespecífica. Es va canviar el color del marcatge, de manera que el *kit 1/11* es va marcar: el cromosoma 1 amb *Aqua* i el cromosoma 11 amb *Red*. El *kit 8/7*: es va marcar el cromosoma 7 amb *Aqua* i el 8 en *Red*. D'aquesta manera es va resoldre el problema del marcatge del fluorocrom *Green*.

### **3.3. ANÀLISI ESTADÍSTICA**

Es va emprar el test no paramètric de la suma de rangs de Wilcoxon per determinar si existien diferències en les freqüències de lesions cromosòmiques així com en els diferents tipus de lesions observades, entre el grup de pacients amb càncer de bufeta i el grup control. Degut a la distribució normal, segons el test de Shapiro-Wilk, dels trencaments de cromàtide per cèl·lula (Chtb/cel) en els dos grups, es va aplicar el test paramètric t-Student. Es va aplicar el test exacte de Fisher per l'anàlisi d'una possible relació de l'hàbit tabàquic o dels antecedents familiars en funció del grup. També es va avaluar mitjançant la suma de rangs de Wilcoxon i/o el test de la t-Student, si l'hàbit de fumador o els antecedents familiars tenien alguna influència en l'expressió de les lesions independentment del grup. Diferències  $P < 0,05$  es van acceptar com estadísticament significatives.

Per l'anàlisi les alteracions en el gen *CCDN1* es va utilitzar el test no paramètric de la suma de rangs de Wilcoxon. Es va aplicar el test exacte de Fisher per l'anàlisi d'una possible relació de l'hàbit tabàquic i dels antecedents familiars. Posteriorment es va aplicar la suma de rangs de Wilcoxon per tal d'avaluar si l'hàbit de fumador o els antecedents familiars tenien alguna influència en les alteracions en el gen *CCDN1*, en

funció del grup o independentment del grup. Diferències  $P < 0,05$  es van acceptar com estadísticament significatives.

Per l'anàlisi de les alteracions en el locus 9p21es va aplicar el test no paramètric de la suma de rangs de Wilcoxon, i per les variables que es distribuïen normalment segons el test de Shapiro- Wilk, el test paramètric t-Student. També es va aplicar la suma de rangs de Wilcoxon per determinar si l'hàbit de fumador o els antecedents familiars tenien alguna influència en les alteracions del locus 9p21 independentment del grup. Diferències  $P < 0,05$  es van acceptar com estadísticament significatives.

Per l'anàlisi estadística s'ha utilitzat el programa SAS/STAT®.

## **4.RESULTATS**



# **RESULTATS**

**Capítol 1: Inducció de fragilitat en limfòcits humans cultivats amb  
APH**





Per tal d'estudiar l'expressió dels CFS (*common fragile sites*) com a indicador d'instabilitat cromosòmica constitucional i la seva possible relació amb predisposició al càncer, es va portar a terme un estudi en pacients afectats de càncer de bufeta i individus control.

En aquest capítol es descriuen els resultats obtinguts a partir de cultius de limfòcits de sang perifèrica (PBL, *peripheral blood lymphocyte*) de 58 mostres procedents de l'estudi SBC/EPICURO. Com a inductor de la fragilitat es va utilitzar afidicolina (APH) que és un inhibidor de les subunitats  $\alpha$ ,  $\delta$  i  $\epsilon$  de la DNA polimerasa i que a una concentració determinada inhibeix parcialment la replicació del DNA (Glover et al. 1984), permetent l'expressió dels CFS com a *gaps* o trencaments en cromosomes metafàsics.

Es va avaluar l'expressió d'aquests CFS en limfòcits de sang perifèrica a partir d'un grup inicial de 58 individus, entre pacients i controls. En tots els casos, l'estat de l'individu no es va desvetllar fins l'anàlisi estadística final.

El rendiment del cultiu dels limfòcits no va ser l'esperat. Partint que es va utilitzar com anticoagulant el citrat trisòdic en l'extracció de la sang i que els limfòcits obtinguts van ser congelats en nitrogen líquid, aquests dos esdeveniments van repercutir negativament en el cultiu, comportant que només un 44,83% de les mostres cultivades creïessin adequadament per poder realitzar una l'anàlisi mínima de 45 metafases per mostra.

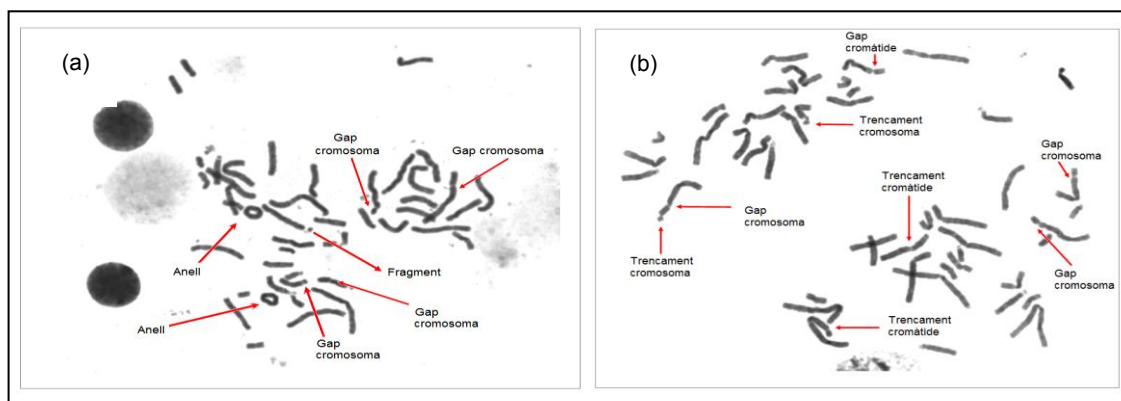
De manera que l'anàlisi de la fragilitat va ser efectiva en 26 dels 58 casos de limfòcits cultivats, proporcionant un rendiment dels cultius per l'obtenció de metafases del 44,83% (taula 4.1.1). Dels 26 casos estudiats, 9 corresponen a població control i 17 a pacients.

**Taula 4.1.1** Rendiment dels cultius de limfòcits per l'obtenció de metafases.

	> 45 metafases	< 45 metafases	Sense metafases	Contaminació	Total
Casos	26 (44,83%)	6 (10,43%)	18 (31,03%)	8 (13,79%)	58

Es va analitzar un total de 1.451 lesions en 477 metafases provinents dels individus control i 3.283 lesions en 899 metafases provinents dels pacients. En els dos grups es van detectar els diferents tipus de lesions esperades tal i com s'observa en la figura 4.1.1. En dos pacients (casos 1 i 37) es van detectar cromosomes en anell. El nombre promig de lesions per cèl·lula en el grup control va ser  $3,03 \pm 0,28$  (taula 4.1.2) amb un rang de

1,98 a 4,70 lesions/cèl·lula, i en el grup de pacients el nombre promig de lesions per cèl·lula va ser de  $3,64 \pm 0,45$  (taula 4.1.3) amb un rang de 1,15 a 7,56.



**Figura 4.1.1.** Imatge de dues metafases corresponents a dos individus diferents. Les fletxes vermelles senyalen les lesions de cromosoma i de cromàtide detectades en les metafases analitzades. Tot i que les alteracions més freqüents són els trencaments i els gaps, en un pacient (pacient n°37) es varen detectar dos cromosomes en anell tal i com es mostra a la imatge (a).

**Taula 4.1.2.** Lesions cromosòmiques en el grup d'individus control.

CONTROLS									
Individu	n° cèl	n° cèl danyades	Chtg/ cèl	Chsg/ cèl	Chtb/ cèl	Chsb/ cèl	Total lloc fràgils	Lesions/ cèl	Lesions/cèl danyada
5	54	48	0,83	2,00	0,24	1,63	254	4,70	5,29
11	54	45	0,43	0,67	0,22	0,98	124	2,30	2,75
12	51	47	0,88	0,65	0,57	1,22	169	3,31	3,59
13	50	35	0,14	0,52	0,36	0,96	99	1,98	2,83
15	53	45	0,85	1,11	0,25	1,60	202	3,81	4,48
23	55	45	0,42	0,47	0,45	1,31	146	2,65	3,24
25	51	40	0,49	0,76	0,31	1,43	153	3,00	3,83
29	60	55	0,70	0,78	0,35	1,28	187	3,12	3,40
59	49	39	0,27	0,57	0,43	1,12	117	2,39	3,00
Total	477	399					1451		
Promig	53,00	44,33	0,55	0,84	0,35*	1,28	161,22	3,03	3,60 <sup>a</sup>
± SD	±1,10	±1,94	±0,09	±0,16	±0,04	±0,08	±16,03	±0,28	±0,27
Mediana	53,5	45	0,63	0,66	0,30	1,26	157,5	2,98	3,415

\* P < 0,05 respecte pacients (taula 4.1.3)

n° cèl, nombre de cèl·lules analitzades; Chtg, gap de cromàtide; Chsg, gap de cromosoma; Chtb, trencament de cromàtide; Chsb, trencament de cromosoma; SD, desviació estàndard.

Taula 4.1.3. Lesions cromosòmiques en el grup de pacients.

PACIENTS									
Individu	n° cèl	n° cèl danyades	Chtg/ cèl	Chsg/ cèl	Chtb/ cèl	Chsb/ cèl	Total lloc fràgils	Lesions/ cèl	Lesions/cèl danyada
1	54	50	0,80	1,89	0,85	3,37	373	6,91	7,46
2	51	48	1,49	2,47	0,90	1,61	330	6,47	6,88
3	60	53	1,07	0,92	0,60	1,53	247	4,12	4,66
6	53	51	0,89	1,74	0,66	2,08	284	5,36	5,57
7	50	49	1,68	1,80	1,18	2,90	378	7,56	7,71
19	52	39	0,62	0,71	0,12	0,96	125	2,40	3,20
24	50	43	0,52	0,58	0,32	0,88	115	2,30	2,67
31	73	68	0,67	0,78	0,25	1,29	218	2,99	3,21
34	46	35	0,57	0,33	0,70	0,76	108	2,35	3,09
35	52	49	0,62	0,52	0,77	1,10	156	3,00	3,18
36	47	31	0,17	0,30	0,23	0,45	54	1,15	1,74
37	48	42	0,56	0,44	0,42	1,65	147	3,06	3,50
38	54	53	0,54	1,09	0,48	2,00	222	4,11	4,19
45	46	44	0,91	0,89	0,43	1,02	150	3,26	3,41
46	55	48	0,78	0,62	0,55	0,47	133	2,42	2,77
48	56	48	0,27	1,16	0,48	0,84	154	2,75	3,21
54	52	38	0,31	0,48	0,21	0,71	89	1,71	2,34
Total	899	789					3283		
Promig	52,88	46,41	0,73	0,98	0,54*	1,39	193,12	3,64	4,05
± SD	±1,54	±2,04	±0,09	±0,15	±0,07	±0,19	±23,99	±0,45	±0,44
Mediana	52	48	0,615	0,781	0,482	1,097	154	3	3,21

\*  $P < 0,05$  respecte controls (taula 4.1.2)

n° cèl, número de cèl·lules analitzades; Chtg, gap de cromàtide; Chsg, gap de cromosoma; Chtb, trencament de cromàtide; Chsb, trencament de cromosoma; SD, desviació estàndard

Per determinar si hi havia una expressió de CFS preferencial en pacients respecte als controls, es van comparar les lesions per cèl·lula i les lesions per cèl·lula danyada entre els dos grups utilitzant el test no paramètric de la suma de rangs de Wilcoxon. L'anàlisi estadística no va trobar diferències significatives entre el grup de pacients amb càncer de bufeta i el grup control, tant si s'analitzava el nombre de lesions per cèl·lula ( $P > 0,05$ ) com el nombre de lesions per cèl·lula danyada ( $P > 0,05$ ).

Per tal de realitzar una anàlisi més acurada, es va analitzar si un determinat tipus de lesió era significativament més freqüent en el grup de pacients respecte al grup control. En aquesta ocasió es van aplicar dos tests diferents, la suma de rangs de Wilcoxon i la t-Student. El tractament estadístic dels diferents tipus de lesió per cèl·lula va trobar que els

trencaments de cromàtide presentaven diferències estadísticament significatives entre els dos grups ( $P < 0,05$ ).

Posteriorment es va avaluar si l'hàbit tabàquic tenia alguna influència en l'expressió de la fragilitat cromosòmica en funció del grup. Es va aplicar el test exacte de Fisher per aquesta anàlisi, la qual no va trobar cap relació significativa entre l'hàbit del tabac i l'expressió dels CFS entre pacients i controls ( $P > 0,05$ ). També es va avaluar si el fet de fumar tenia alguna influència en l'expressió de les lesions i dels diferents tipus de lesions independentment del grup. En aquest cas es va aplicar tant el test no paramètric de la suma de rangs de Wilcoxon com el test paramètric de la t-Student. No es van trobar diferències significatives per cap de les variables estudiades ( $P > 0,05$ ) (taula 4.1.4).

**Taula.4.1.4.** Anàlisi de les diferents variables en funció de l'estat de fumador.

	Lesions/cèl	Lesions/cèl danyada	Chsb/cèl	Chtg/cèl	Chsg/cèl	Chtb/cèl
P	0.1473	0,2696	0,9337	0,0924	0,5225	0,3804

cèl, cèl·lula; Chtg, gap de cromàtide; Chsg, gap cromosoma; Chtb, trencament de cromàtide; Chsb, trencament de cromosoma

Finalment, es va voler comparar si el fet de presentar antecedents familiars de càncer tenia alguna influència en el fet de pertànyer a un determinat grup. Novament, es va aplicar el test exacte de Fisher el qual va trobar una relació significativa entre el fet de presentar antecedents familiars de càncer i pertànyer al grup de pacients amb BC ( $P < 0,05$ ). Degut a la relació entre la variable antecedents familiars de càncer i el pertànyer al grup de pacients, es va voler comparar si existien diferències entre les lesions per cèl·lula, les lesions per cèl·lula danyada i els diferents tipus de lesions estudiades per cèl·lula en funció dels antecedents familiars. Es van aplicar la suma de rangs de Wilcoxon per les variables de distribució no normal i la t-Student per les variables de distribució normal (Chsb/cèl i Chtg/cèl) (taula 4.1.5). No es van trobar diferències estadísticament significatives ( $P > 0,05$ ).

**Taula.4.1.5.** Anàlisi de les diferents variables en funció dels antecedents familiars.

	Lesions/cèl	Lesions/cèl danyada	Chsb/cèl	Chtg/cèl	Chsg/cèl	Chtb/cèl
P	0.8833	0,7992	0,2758	0,7979	0,8938	0,7283

cèl, cèl·lula; Chtg, gap de cromàtide; Chsg, gap de cromosoma; Chtb, trencament de cromàtide; Chsb, trencament de cromosoma

## Discussió

En aquest estudi no s'observa un increment en l'expressió dels CFS en el grup de pacients amb càncer de bufeta respecte al grup control. El número promig de lesions per cèl·lula en el grup control va ser  $3,03 \pm 0,28$  amb un rang de 1,98 a 4,70 lesions/cèl·lula, i en el grup de pacients el número promig de lesions per cèl·lula va ser de  $3,64 \pm 0,45$  amb un rang de 1,15 a 7,56.

Els nostres resultats contrasten amb estudis previs que havien reportat increments relatius en l'expressió dels CFS en pacients afectats de càncer respecte a un grup control, inclús si es comparava amb els parents de primer grau (Paz y Miño et al. 1997; Ceçener et al. 1998; Balci, Ekmekci i Cetin 1999; Tunca et al. 2000; Karadağ et al. 2002; Tunca et al. 2002; Dhillon et al. 2003). Tots aquests estudis suggerien que un augment d'expressió dels CFS en limfòcits de sang perifèrica podria ser un marcador de susceptibilitat a patir càncer.

Per altra banda els resultats obtinguts en el present estudi, semblarien recolzar la idea d'alguns investigadors contraris a què els CFS serien un indicador d'inestabilitat constitucional ja que són unes regions que es troben en tots els individus com a part normal de l'estructura dels cromosomes i la seva expressió citogenètica varia d'un individu a un altre per sobre d'un 30%, dependent del cultiu cel·lular i de l'expressió individual, i a més, es troben altament conservats en l'evolució eucariota (Lukusa i Fryns 2008).

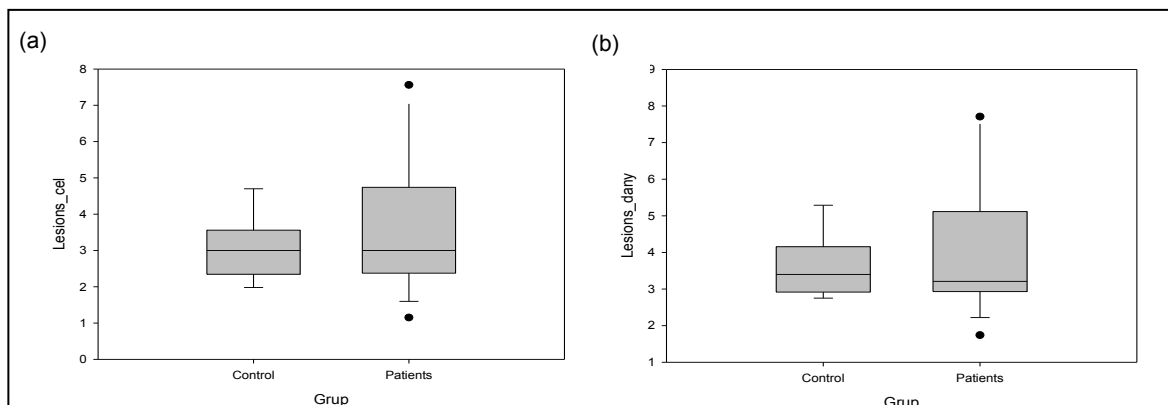
Malgrat no trobar diferències entre pacients i controls, Marlhens i col·laboradors (1986) van reportar que la taxa de trencaments cromosòmics en limfòcits d'individus control era dependent de l'edat, de manera que la fragilitat incrementava en funció l'edat. Segons aquests autors, les lesions eren més freqüents en controls amb un promig d'edat de 75 anys que en controls amb un promig d'edat de 29 anys. Posteriorment, es va publicar que existia una correlació entre l'edat i la freqüència en l'expressió dels CFS en individus sans, considerant individus d'edat avançada els que presenten una edat superior als 60 anys (Güven et al. 1999). En el present estudi, els individus control presenten un promig d'edat de  $65,77 \pm 2,68$ , per tant, podria ser que el fet d'haver analitzat la fragilitat en un grup control amb una edat avançada fos la causa de no haver observat diferències en

l'expressió dels CFS respecte el grup de pacients (amb un promig d'edat de  $69,76 \pm 1,17$ ).

De forma interessant cal destacar que en el present estudi, quan es va realitzar l'anàlisi estadística dels diferents tipus de lesions, es van trobar diferències significatives pels trencaments de cromàtide per cèl·lula entre els dos grups. Per tant, l'únic indicador d'instabilitat cromosòmica constitucional que es detecta en aquest estudi en limfòcits provinents de pacients afectats de carcinoma de bufeta són els trencaments de cromàtide. Aquestes lesions estan associades a trencaments del DNA que persisteixen en la fase S i no poden ser reparats per recombinació homòloga (Fridlich et al. 2015).

En el grup de pacients, les medianes de les lesions per cèl·lula (3,00) i de les lesions per cèl·lula danyada (3,21) són relativament inferiors al valor promig de les lesions (3,64 i 4,05, respectivament) suggerint la presència de valors extrems en el grup de pacients (figura 4.1.2). De manera que tot i que no s'ha observat una fragilitat relativament superior en el grup de pacients sí que es troben valors extrems alts. Ribas i col·laboradors (1999) van descriure valors de fragilitat elevats (4,50 i 5,40) en dos pacients afectats de múltiples tumors primaris però no tan extrems com en els observats en aquest estudi.. En base a aquests resultats, es podria concloure que dins del grup de pacients afectats de càncer de bufeta existiria un subgrup, format pels pacients 1, 2, 6 i 7, que presenten una fragilitat més elevada, per sobre de 5 lesions per cèl·lula. Cal remarcar que un d'aquests pacients presenta també cromosomes en anell i expressa una fragilitat molt superior a la fragilitat més alta observada en el grup control (6,91 *versus* 4,70, respectivament).

De totes maneres i per tal de confirmar de l'existència d'un subgrup de pacients de càncer de bufeta que manifestarien una fragilitat més elevada seria necessari realitzar una anàlisi en una mostra més gran d'individus.



**Figura 4.1.2.** Tendència central de les lesions per cèl·lula (a) i de les lesions per cèl·lula danyada (b) en els dos grups.

Respecte a l'efecte del tabac, no s'han trobat diferències estadísticament significatives entre l'hàbit de fumar en els dos grups i la freqüència de lesions cromosòmiques. Si s'analitza l'hàbit de fumar independentment del grup al qual pertany l'individu, tampoc es troben diferències en quan a l'expressió dels CFS així com tampoc pels diferents tipus de lesions observades.

Degut a que l'expressió citogenètica dels CFS varia d'un individu a un altre (Lukusa i Fryns 2008), aquesta variació es podria considerar com un factor predictiu del risc de càncer (Tunca et al. 2002). De manera que si es revisen els estudis epidemiològics realitzats sobre limfòcits d'individus sans on es reporta que l'increment relatiu de la freqüència d'alteracions cromosòmiques és un factor predisposant al càncer (Hagmar et al. 1994; Liou et al. 1999; Bonassi et al. 1995; Bonassi et al. 2008), s'observa que aquest valor predictiu és independent dels factors endògens (edat, gènere, nacionalitat, entre d'altres) i també dels factors exògens (carcinògens ocupacionals). Bonassi i col·laboradors (2000) determinen que el valor predictiu de la freqüència d'alteracions cromosòmiques no es veu alterat per l'estil de vida, és a dir, per l'exposició a carcinògens ni pel tabac. De manera que tot i que el tabac és un agent carcinogènic i un factor de risc important en moltes neoplàsies, inclosa també la de bufeta (Kirkali et al. 2005) aquest semblaria no tenir cap efecte entre els nivells de lesions observades en limfòcits de sang perifèrica i el càncer.

Tot i que no es troben diferències en l'expressió dels CFS induïts per APH en funció de l'hàbit del tabac, sí que es troben diferències estadísticament significatives entre els antecedents familiars i el pertànyer a un grup o altre. De manera que el tractament estadístic semblaria suggerir que el fet que un individu presenti uns antecedents familiars



de càncer és un factor predisposant a pertànyer al grup de pacients, indicant que l'expressió dels CFS és un reflex d'una inestabilitat genètica heretada, la qual és una característica constitutiva de l'individu i no es veu alterada pels factors exògens (estil de vida) (Shao et al. 2004).

**En resum**, els nostres resultats indiquen que, al contrari d'altres estudis, no hi ha diferències entre pacients i controls en quant a l'expressió dels CFS. Únicament s'ha observat que els trencaments de cromàtide són significativament superiors en els pacients i per altra banda, hi ha un subgrup dins d'aquests amb una expressió de fragilitat alta i/o la presència d'alteracions cromosòmiques en mosaic.

L'expressió dels CFS és independent de l'hàbit fumador per la qual cosa, els nostres resultats descartarien en principi un efecte dels carcinògens del tabac en l'expressió dels CFS en limfòcits de sang perifèrica. Finalment, i donat que en la nostra sèrie tant els pacients com els controls presentaven una edat avançada podríem confirmar que l'envelliment podria tenir un efecte sobre la pèrdua d'integritat del genoma.

# **RESULTATS**

**Capítol 2. Estudi de variacions en el nombre de còpies dels loci  
9p21 i *CCND1* en limfòcits humans**



Una característica dels CFS és que la seva inestabilitat es pot manifestar en forma de delecions o reorganitzacions en el lloc fràgil. Aquestes alteracions correspondrien a les detectades en càncer on, a diferència de les cèl·lules normals, aquests llocs són inestables. La nostra hipòtesi és que sota condicions experimentals d'estrès replicatiu podríem observar alteracions en limfòcits semblants a les que es presenten en cèl·lules tumorals.

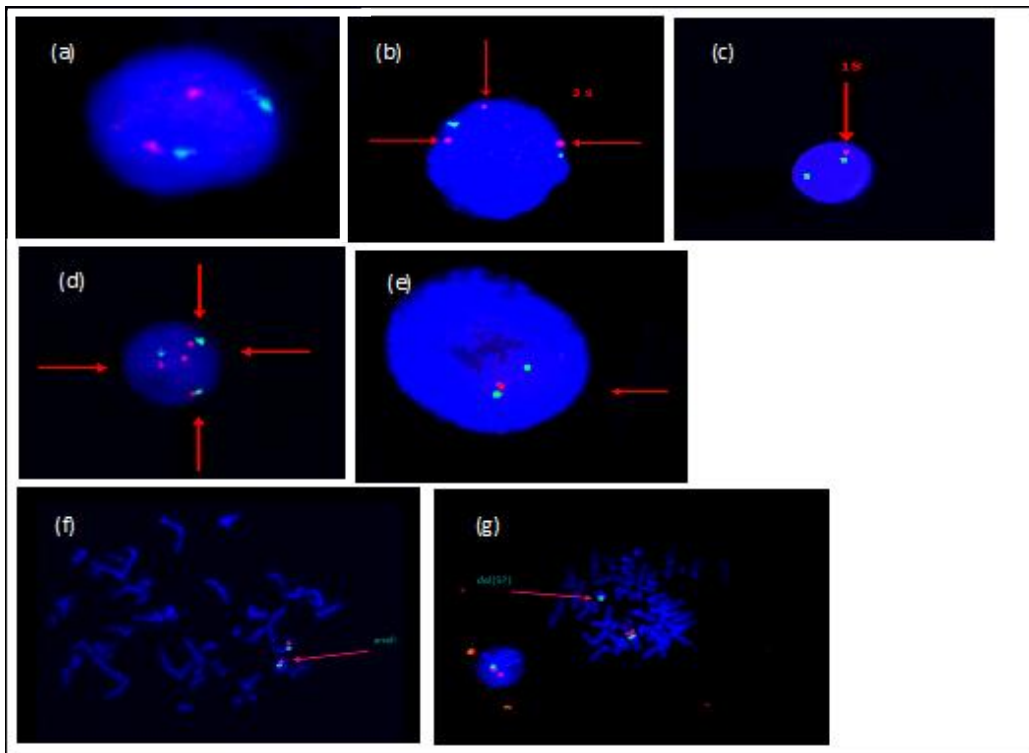
En aquest capítol es presenten els resultats obtinguts en la mateixa sèrie d'individus del capítol anterior i procedents de l'estudi SBC/EPICURO on sota condicions de cultiu sotmeses a estrès replicatiu s'ha analitzat la presència d'alteracions afectant a 9p21 i *CCND1* en limfòcits de sang perifèrica. S'han escollit els loci 9p21 i *CCND1* donat que es troben freqüentment afectats en càncer de bufeta i la seva implicació en limfòcits podria ser indicativa de predisposició a aquest tipus de tumor tal i com indicaven estudis anteriors (Shao et al. 2004). En estudis previs realitzats en altres tipus de neoplàsies també es troba que les alteracions presents en els limfòcits de sang perifèrica són similars a les presents en el teixit tumoral (Pathak et al. 1991; Dave et al. 1993; Dotan et al. 2000; Zhu et al. 2002).

Cal destacar que ambdós loci corresponen a FS implicat en el BC. A 9p21 s'han descrit el FRA9A com un FS rar induïble per àcid fòlic i el FRA9C com un CFS induïble per bromodeoxiuridina. A 11q13 també s'han descrit dos fràgils, el FRA11A rar induïble per àcid fòlic i el FRA11H CFS induïble per l'APH (Moriarty i Webster 2003).

Amb l'objectiu inicial de determinar si existeix una relació entre la presència d'alteracions numèriques i/o estructurals en aquests loci i el càncer de bufeta, es va realitzar aquest estudi mitjançant la tècnica de FISH en limfòcits de sang perifèrica de 24 pacients i de 13 controls proporcionats per la xarxa SBC/EPICURO. Les característiques clíniques dels pacients i dels controls analitzats es troben en la taula 3.1 de material i mètodes. I en la taula 4.2.1 es descriuen les característiques generals dels individus analitzats.

Per l'estudi amb FISH, es va utilitzar les sondes LSI *Cyclin D1* (11q13) *SpectrumOrange* / CEP 11 *SpectrumGreen* i LSI *CDKN2A* *SpectrumOrange*/CEP 9 *SpectrumGreen*. Per cada sonda i mostra es van analitzar un mínim de 200 nuclis, sense superposicions i amb el contorn nuclear intacte. En els casos que va ser possible, també es van analitzar metafases.

Per l'anàlisi del gen *CCND1* i del locus 9p21 es van comptabilitzar el nombre de còpies de cadascun dels loci (figura 4.2.1a), de manera que es va considerar guany del gen *CCND1* o del locus 9p21 quan el nombre de senyals observades era major de 2 (figura 4.2.1b i 1d), i pèrdua quan el nombre de senyals observats era inferior a 2 (figura 4.2.1c i 1e). Es van definir també els següents criteris d'anàlisi: (a) guany absolut, el nombre total de guanys del gen, independentment del centròmer; (b) guany relatiu, increment del nombre de còpies del gen amb centròmer normal o amb increment nombre de còpies del centròmer (polisomia); (c) pèrdua absoluta, el nombre total de pèrdues de una o més còpies del gen, independentment del centròmer; (d) pèrdua relativa, pèrdua del nombre de còpies del gen amb centròmer normal o amb pèrdua de còpia del centròmer (monosomia); (e) alteracions totals, es la suma del guany absolut i de la pèrdua absoluta.



**Figura 4.2.1.** Nuclis interfàsics i metafases hibridats amb la sonda dual LSI *CDKN2A SpectrumOrange/CEP 9 SpectrumGreen* i amb la sonda dual LSI *CCND1 SpectrumOrange / CEP11 SpectrumGreen*. Amb la sonda LSI 9p21(Spectrum Orange) /CEP9 (Spectrum Green): (a) nucli normal, (b) nucli amb guany de 9p21, (c) nucli amb pèrdua de 9p21, (f) detecció del cromosoma 9 en anell en una metafase del pacient n<sup>o</sup>1, (g) deleció del locus 9p21. Amb la sonda dual LSI *CCND1(SpectrumOrange) / CEP11(SpectrumGreen)*: (d) nucli amb guany de *CCND1*, (e) nucli amb pèrdua de *CCND1*.

Es van trobar alteracions en els loci 9p21 i *CCND1* en tots els individus, tant en pacients com en controls. En el pacient n<sup>o</sup>1 es va detectar un cromosoma en anell afectant al cromosoma 9 (figura 4.2.1f).

Taula 4.2.1. Característiques generals dels individus analitzats.

LSI CCND1 SpectrumOrange/ CEP11 SpectrumGreen			LSI 9p21(SpectrumOrange)/ CEP9 (SpectrumGreen)		
Variables	Nombre (%) pacients (n=24)	Nombre (%) controls (n=13)	Variables	Nombre (%) pacients (n=23)	Nombre (%) controls (n=13)
<b>Gènere</b>			<b>Gènere</b>		
Masculí	13 (54,17%)	11 (84,61%)	Masculí	12 (52,17%)	11 (84,61%)
Femení	11 (45,83%)	2 (15,39%)	Femení	11 (47,83%)	2 (15,39%)
<b>Estatus fumador</b>			<b>Estatus fumador</b>		
Mai	7 (29,17%)	3 (23,08%)	Mai	7 (30,43%)	3 (23,08%)
Fumador/Ex-fumador	16 (66,67%)	10 (76,92%)	Fumador/Ex-fumador	15 (65,21%)	10 (76,92%)
Es desconeix	1 (4,16%)		Es desconeix	1 (4,34%)	
<b>Antecedents familiars de càncer</b>			<b>Antecedents familiars de càncer</b>		
No	9 (37,50%)	10 (76,92%)	No	9 (39,13%)	10 (76,92%)
Si	14 (58,33%)	3 (23,08%)	Si	13 (56,52%)	3 (23,08%)
Es desconeix	1 (4,16%)		Es desconeix	1 (4,34%)	
Promig edat ± SD (anys)	68,75 ± 1,29	63,31 ± 3,56	Promig edat ± SD (anys)	68,91 ± 1,34	63,31 ± 3,56

SD, desviació estàndard

## Estudi del gen *CCND1*/Centròmer 11

Es van analitzar els limfòcits de sang perifèrica de 13 controls i 24 pacients amb la sonda LSI *CCND1* SpectrumOrange/ CEP11 SpectrumGreen. La mitjana d'edat dels pacients i dels controls va ser de 68,75 i 63,31 anys, respectivament, tal i com s'indica a la taula 4.2.1. El percentatge d'individus fumadors era més alt en el grup de controls que en el de pacients, mentre que el percentatge més elevat d'antecedents familiars de càncer es donava en el grup de pacients. Entre els 24 de pacients n'hi havia un que presentava un Ta benigne, set que presentaven TaG1, set que presentaven un TaG2, dos amb un T1G3, tres amb T2G3 i dos amb T4G3.

L'anàlisi de la hibridació amb la sonda va ser efectiva en 37 de les 58 mostres cultivades, proporcionant un rendiment de l'estudi per FISH del 63,79% (taula 4.2.2).

**Taula 4.2.2.** Rendiment de l'estudi per FISH per les dues sondes.

	≥ 200 nuclis (%)	Sense material (%)	Contaminació (%)	Total
<b>LSI <i>CCND1</i>(SpectrumOrange) /CEP11 (SpectrumGreen)</b>	37 (63,79%)	13 (22,41%)	8 (13,79%)	58
<b>LSI 9p21(SpectrumOrange) /CEP9 (SpectrumGreen)</b>	36 (62,06%)	13 (22,41%)	8 (13,79%)	57

En les taules 4.2.3 i 4.2.4 s'indiquen els resultats obtinguts en l'anàlisi de *CCND1* en el grup control i en el grup de pacients, respectivament. Alteracions en aquest gen es van trobar tant en controls com en pacients.

En els individus controls es van analitzar un total de 2.755 nuclis, dels quals 151 (5,48%) presentaven alteracions de *CCND1*. En els pacients es van analitzar 5.333 nuclis, dels quals 282 (5,29%) presentaven alteracions. Les alteracions en el gen *CCND1* es van trobar en un rang de 2,44% a 12,28% en PBLs d'individus control, i en un rang de 0,99% a 13,42% en PBLs de pacients. En el grup control, el número promig de pèrdua absoluta va ser  $4,31 \pm 0,84$ , el guany absolut de  $7,31 \pm 2,20$  i les alteracions totals de  $11,62 \pm 1,80$  (taula 4.2.3). En el grup de pacients, el número promig de pèrdua absoluta va ser  $3,21 \pm 0,66$ , el guany absolut de  $8,54 \pm 1,60$  i les alteracions totals de  $11,75 \pm 1,54$  (taula 4.2.4).

Taula 4.2.3. Alteracions en el nombre de còpies del gen *CCND1* en el grup de controls.

CONTROLS								
Individu	Nuclis analitzats	PA (%)	PRCN (%)	PRM (%)	GA (%)	GRCN (%)	GRP (%)	AT (%)
5	219	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	15 (6,85%)	12 (5,48%)	3 (1,37%)	15 (6,85%)
11	211	9 (4,27%)	4 (1,90%)	5 (2,37%)	2 (0,95%)	1 (0,47%)	1 (0,47%)	11 (5,21%)
12	219	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	19 (8,68%)	19 (8,68%)	0 (0,00%)	19 (8,68%)
13	206	4 (1,94%)	4 (1,94%)	0 (0,00%)	2 (0,97%)	2 (0,97%)	0 (0,00%)	6 (2,91%)
15	214	1 (0,47%)	1 (0,47%)	0 (0,00%)	13 (6,07%)	13 (6,07%)	0 (0,00%)	14 (6,54%)
23	228	3 (1,32%)	3 (1,32%)	0 (0,00%)	25 (10,96%)	25 (10,96%)	0 (0,00%)	28 (12,28%)
25	206	3 (1,46%)	3 (1,46%)	0 (0,00%)	3 (1,46%)	3 (1,46%)	0 (0,00%)	6 (2,91%)
29	210	7 (3,33%)	7 (3,33%)	0 (0,00%)	3 (1,43%)	3 (1,43%)	0 (0,00%)	10 (4,76%)
50	205	3 (1,46%)	2 (0,98%)	1 (0,49%)	2 (0,98%)	2 (0,98%)	0 (0,00%)	5 (2,44%)
55	210	6 (2,86%)	4 (1,90%)	2 (0,95%)	4 (1,90%)	4 (1,90%)	0 (0,00%)	10 (4,76%)
56	209	6 (2,87%)	6 (2,87%)	0 (0,00%)	3 (1,44%)	2 (0,96%)	1 (0,48%)	9 (4,31%)
57	213	9 (4,23%)	8 (3,76%)	1 (0,47%)	4 (1,88%)	4 (1,88%)	0 (0,00%)	13 (6,10%)
59	205	5 (2,44%)	5 (2,44%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	5 (2,44%)
<b>Total</b>	2755	56 (2,03%)	47 (1,71%)	9 (0,33%)	95 (3,45%)	90 (3,27%)	5 (0,18%)	151 (5,48%)
<b>Promig</b>	211,92	4,31	3,62	0,69	7,31	6,92	0,39	11,62
<b>± SD</b>	± 1,87	± 0,84	± 0,70	± 0,40	± 2,20	± 2,18	± 0,24	± 1,80
<b>Mediana</b>	210	4	4	0	3	3	0	10

PA, pèrdua absoluta; PRCN, pèrdua relativa amb 2 còpies del centròmer del cromosoma 11; PRM, pèrdua relativa amb monosomia 11; GA, guany absolut; GRCN, guany relatiu amb 2 còpies del centròmer; GRP, guany relatiu amb polisomia 11; AT, alteracions totals; SD, desviació estàndard



Taula 4.2.4. Alteracions en el nombre de còpies del gen *CCND1* en el grup de pacients.

PACIENTS								
Individu	Nuclis analitzats	PA (%)	PRCN (%)	PRM (%)	GA (%)	GRCN (%)	GRP (%)	AT (%)
1	235	3 (1,28%)	3 (1,28%)	0 (0,00%)	26 (11,06%)	26 (11,06%)	0 (0,00%)	29 (12,34%)
2	214	2 (0,93%)	2 (0,93%)	0 (0,00%)	6 (2,80%)	6 (2,80%)	0 (0,00%)	8 (4,74%)
3	222	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	22 (9,91%)	22 (9,91%)	0 (0,00%)	22 (9,91%)
6	216	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	15 (6,94%)	13 (6,02%)	2 (0,93%)	15 (6,94%)
7	269	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	3 (1,12%)	2 (0,74%)	1 (0,37%)	3 (1,12%)
10	168	3 (1,79%)	2 (1,19%)	1 (0,60%)	3 (1,79%)	3 (1,79%)	0 (0,00%)	6 (3,57%)
19	214	8 (3,74%)	6 (2,80%)	2 (0,93%)	5 (2,34%)	5 (2,34%)	0 (0,00%)	13 (6,07%)
24	209	3 (1,44%)	3 (1,44%)	0 (0,00%)	2 (0,96%)	2 (0,96%)	0 (0,00%)	5 (2,39%)
31	210	2 (0,95%)	2 (0,95%)	0 (0,00%)	8 (3,81%)	8 (3,81%)	0 (0,00%)	10 (4,76%)
34	215	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	15 (6,98%)	14 (6,51%)	1 (0,47%)	15 (6,98%)
35	206	1 (0,49%)	1 (0,49%)	0 (0,00%)	5 (2,43%)	5 (2,43%)	0 (0,00%)	6 (2,91%)
36	202	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	2 (0,99%)	2 (0,99%)	0 (0,00%)	2 (0,99%)
37	231	1 (0,43%)	1 (0,43%)	0 (0,00%)	30 (12,99%)	28 (12,12%)	2 (0,87%)	31 (13,42%)
38	212	1 (0,47%)	0 (0,00%)	1 (0,47%)	9 (4,25%)	7 (3,30%)	2 (0,94%)	10 (4,72%)
39	418	11 (2,63%)	11 (2,63%)	0 (0,00%)	7 (1,67%)	7 (1,67%)	0 (0,00%)	18 (4,31%)
41	206	5 (2,43%)	3 (1,46%)	2 (0,97%)	1 (0,49%)	0 (0,00%)	1 (0,49%)	6 (2,91%)
42	207	4 (1,93%)	1 (0,48%)	3 (1,45%)	3 (1,45%)	3 (1,45%)	0 (0,00%)	7 (3,38%)
45	210	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	10 (4,76%)	10 (4,76%)	0 (0,00%)	10 (4,76%)
46	207	5 (2,42%)	4 (1,93%)	1 (0,48%)	2 (0,97%)	1 (0,48%)	1 (0,48%)	7 (3,38%)
47	220	8 (3,64%)	4 (1,82%)	4 (1,82%)	9 (4,09%)	9 (4,09%)	0 (0,00%)	17 (7,73%)
48	204	1 (0,49%)	1 (0,49%)	0 (0,00%)	3 (1,47%)	3 (1,47%)	0 (0,00%)	4 (1,96%)
51	213	5 (2,35%)	5 (2,35%)	0 (0,00%)	8 (3,76%)	8 (3,76%)	0 (0,00%)	13 (6,10%)
52	213	9 (4,23%)	9 (4,23%)	0 (0,00%)	4 (1,88%)	4 (1,88%)	0 (0,00%)	13 (6,10%)
54	212	5 (2,36%)	4 (1,89%)	1 (0,47%)	7 (3,30%)	7 (3,30%)	0 (0,00%)	12 (5,66%)
<b>Total</b>	5333	77 (1,44%)	62 (1,16%)	15 (0,28%)	205 (3,84%)	195 (3,66%)	10 (0,19%)	282 (5,29%)
<b>Promig</b>	222,208	3,21	2,58	0,63	8,54	8,13	0,42	11,75
<b>±SD</b>	± 9,179	± 0,66	± 0,60	± 0,22	± 1,60	± 1,55	± 0,15	± 1,54
<b>Mediana</b>	212,5	2,5	2	0	6,5	6,5	0	10

PA, pèrdua absoluta; PRCN, pèrdua relativa amb 2 còpies del centròmer del cromosoma 11; PRM, pèrdua relativa amb monosomia 11; GA, guany absolut; GRCN, guany relatiu amb 2 còpies del centròmer; GRP, guany relatiu amb polisomia 11; AT, alteracions totals; SD, desviació estàndard

D'altra banda, també es va analitzar l'aneuploïdia del cromosoma 11, tant en controls com en pacients. Es va trobar que un 45,15% (6/13) dels individus control i un 66,66% (16/24) dels pacients presentaven aneuploïdies (taules 4.2.5 i 4.2.6 respectivament). Si es descarten les monosomies, un 23% (3/13) dels controls i un 45,8% (11/24) dels pacients presentaven polisomies del cromosoma 11.

**Taula 4.2.5.** Aneuploïdia del cromosoma 11 en individus control.

<b>CONTROLS</b>			
<b>Individu</b>	<b>Nuclis analitzats</b>	<b>Monosomia (%)</b>	<b>Polisomia (%)</b>
<b>5</b>	219	4 (1,83%)	3 (1,37%)
<b>11</b>	211	5 (2,37%)	1 (0,47%)
<b>12</b>	219	0 (0,00%)	0 (0,00%)
<b>13</b>	206	0 (0,00%)	0 (0,00%)
<b>15</b>	214	0 (0,00%)	0 (0,00%)
<b>23</b>	228	0 (0,00%)	0 (0,00%)
<b>25</b>	206	0 (0,00%)	0 (0,00%)
<b>29</b>	210	0 (0,00%)	0 (0,00%)
<b>50</b>	205	1 (0,49%)	0 (0,00%)
<b>55</b>	210	2 (0,95%)	0 (0,00%)
<b>56</b>	209	0 (0,00%)	1 (0,48%)
<b>57</b>	213	1 (0,47%)	0 (0,00%)
<b>59</b>	205	0 (0,00%)	0 (0,00%)
<b>Total</b>	2755	13 (0,47%)	5 (0,18%)
<b>Promig</b>	16,30	0,07	0,03
<b>± SD</b>	± 1,87	± 0,46	± 0,24
<b>Mediana</b>	210	0	0

SD, desviació estàndard

Taula 4.2.6. Aneuploidia del cromosoma 11 en pacients.

<b>PACIENTS</b>			
<b>Individu</b>	<b>Nuclis analitzats</b>	<b>Monosomia (%)</b>	<b>Polisomia (%)</b>
1	235	2 (0,85%)	4 (1,70%)
2	214	0 (0,00%)	6 (2,80%)
3	222	0 (0,00%)	0 (0,00%)
6	216	0 (0,00%)	3 (1,39%)
7	269	3 (1,12%)	1 (0,37%)
10	168	1 (0,60%)	0 (0,00%)
19	214	2 (0,93%)	1 (0,47%)
24	209	4 (1,91%)	0 (0,00%)
31	210	0 (0,00%)	0 (0,00%)
34	215	0 (0,00%)	1 (0,47%)
35	206	0 (0,00%)	0 (0,00%)
36	202	0 (0,00%)	0 (0,00%)
37	231	0 (0,00%)	2 (0,87%)
38	212	3 (1,42%)	2 (0,94%)
39	418	1 (0,24%)	0 (0,00%)
41	206	2 (0,97%)	1 (0,49%)
42	207	3 (1,45%)	0 (0,00%)
45	210	0 (0,00%)	0 (0,00%)
46	207	1 (0,48%)	1 (0,48%)
47	220	4 (1,82%)	3 (1,36%)
48	204	0 (0,00%)	0 (0,00%)
51	213	0 (0,00%)	0 (0,00%)
52	213	0 (0,00%)	0 (0,00%)
54	212	1 (0,47%)	0 (0,00%)
<b>Total</b>	5333	27 (12,26%)	25 (11,34%)
<b>Promig</b>	9,25	0,05	0,04
<b>± SD</b>	± 9,18	± 0,28	± 0,32
<b>Mediana</b>	212,5	0,5	0

SD, desviació estàndard

Cal destacar que els guanys en el nombre de còpies del gen *CCND1* predominaven sobre les pèrdues (taules 4.2.3 i 4.2.4). Tanmateix, en la majoria dels casos s'observà que aquests guanys no anaven acompanyats de guanys del cromosoma 11. Aquest fet es va observar tant en pacients com en controls.

En un control i en set pacients es van detectar guanys i pèrdues del cromosoma 11 que no anaven acompanyades de guanys i/o pèrdues de *CCND1*. Aquests casos no s'han comptabilitzat com alteracions en el nombre de còpies del gen, però no es pot descartar que corresponguin a translocacions que el nostre tipus d'anàlisi en nuclis interfàsics no ens permet comprovar.

Per tal de veure si hi havia diferències en les alteracions en el gen *CCND1* entre pacients i controls, primer es van normalitzar totes les variables estudiades en funció del nombre de nuclis estudiats. Degut a la distribució no normal de les diferents variables analitzades es va aplicar la suma de rangs de Wilcoxon. L'anàlisi estadístic no va trobar diferències significatives entre el grup de pacients i controls, tant si s'analitzaven les pèrdues absolutes i relatives, com els guanys absoluts i relatius, així com tampoc per les alteracions totals en el gen *CCND1*.

Posteriorment, es va avaluar si l'hàbit tabàquic tenia alguna influència en les alteracions del gen *CCND1* en funció del grup. Per tal de realitzar una anàlisi més acurada de la influència del tabac, es van valorar totes les variables analitzades en el gen *CCND1* en funció del grup. Es va aplicar la suma de rangs de Wilcoxon per cadascuna de les alteracions analitzades i tampoc es van trobar diferències. Finalment, es va analitzar si el fet de ser fumador o haver estat fumador, independentment del grup, tenia alguna influència en les alteracions del gen *CCND1*. Es va aplicar la suma de rangs de Wilcoxon, la qual va trobar diferències estadísticament significatives per les pèrdues absolutes i relatives i pels guanys absoluts i relatius de *CCND1* ( $P < 0,05$ ); en ambdós casos sense alteració del centròmer. Per tant, es van observar pèrdues i guanys significatius del gen però no del cromosoma.

En referència als antecedents familiars de càncer, el primer que es va analitzar va ser si aquests tenien alguna repercussió en el fet de pertànyer al grup de pacients o de controls. A l'aplicar el test F-Fisher, es va trobar una associació significativa amb el grup de pacients ( $P < 0,05$ ). Posteriorment, es va voler analitzar si les alteracions en el gen *CCND1* tenien alguna relació amb els antecedents familiars de càncer en funció del grup,

la suma de rangs de Wilcoxon no va mostrar diferències significatives. Quan es van analitzar els dos grups conjuntament, la suma de rangs de Wilcoxon va mostrar diferències estadísticament significatives únicament pel guany absolut i relatiu de *CCND1* independentment del centròmer 11 ( $P < 0,05$ ). De manera que es va observar guany del gen però no del centròmer.

## Locus 9p21/centròmer 9

Amb la sonda LSI 9p21(SpectrumOrange)/CEP9 (SpectrumGreen) es van analitzar els limfòcits de sang perifèrica de 13 controls i 23 pacients. Només en un pacient (nº 6) no va ser possible aplicar la tècnica FISH per aquesta sonda. Aquest fet modifica la mitjana d'edat dels pacients per l'anàlisi de 9p21, tal i com s'indica en la taula 4.2.1. Malgrat tot, el percentatge d'individus fumadors continua sent més alt entre el grup control, així com el percentatge d'antecedents familiars que és més alt entre el grup de pacients (taula 4.2.1). Entre els 23 pacients, n'hi havia un que presentava un Ta benigne, set que presentaven TaG1, set que presentaven un TaG2, un amb un T1G3, tres amb T2G3 i dos amb T4G3.

L'anàlisi de la hibridació amb la sonda LSI 9p21(SpectrumOrange)/CEP9 (SpectrumGreen) va ser efectiva en 36 de les 58 mostres cultivades, proporcionant un rendiment de l'estudi per FISH del 62,06% (taula 4.2.2).

En les taules 4.2.7 i 4.2.8 s'indiquen els resultats obtinguts de l'anàlisi del locus 9p21 en el grup control i en el grup de pacients, respectivament. Es van trobar alteracions en aquest gen tant en controls com en pacients.

En els individus control es van analitzar un total de 2.808 nuclis, dels quals 154 (5,48%) presentaven alteracions en el locus 9p21. En els pacients es van analitzar 5.013 nuclis, dels quals 315 (6,28%) presentaven alteracions. Les alteracions en el locus 9p21 es van trobar en un rang de 1,95% a 11,50% en PBLs de controls, i en un rang de 0,99% a 16,32% en PBLs de pacients. En el grup control, el promig de pèrdua absoluta va ser de  $7,15 \pm 1,64$ , el guany absolut va ser de  $4,69 \pm 1,29$ , i les alteracions totals de  $11,85 \pm 1,95$  (taula 4.2.7). En el grup de pacients, el promig de pèrdua absoluta va ser  $8,65 \pm 1,81$ , el guany absolut de  $5,04 \pm 1,01$  i les alteracions totals de  $13,70 \pm 2,03$  (taula 4.2.8).

Taula 4.2.7. Alteracions en el nombre de còpies del locus 9p21 en el grup control.

<b>CONTROLS</b>								
<b>Individus</b>	<b>Nuclis analitzats</b>	<b>PA (%)</b>	<b>PRCN (%)</b>	<b>PRM (%)</b>	<b>GA (%)</b>	<b>GRCN (%)</b>	<b>GRP (%)</b>	<b>AT (%)</b>
5	208	3 (1,44%)	2 (0,96%)	1 (0,48%)	2 (0,96%)	2 (0,96%)	0 (0,00%)	5 (2,40%)
11	209	9 (4,31%)	4 (1,91%)	5 (2,39%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	9 (4,31%)
12	269	8 (2,97%)	8 (2,97%)	0 (0,00%)	11 (4,09%)	11 (4,09%)	0 (0,00%)	19 (7,06%)
13	205	4 (1,95%)	1 (0,49%)	3 (1,46%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	4 (1,95%)
15	209	7 (3,35%)	7 (3,35%)	0 (0,00%)	2 (0,96%)	2 (0,96%)	0 (0,00%)	9 (4,31%)
23	219	5 (2,28%)	5 (2,28%)	0 (0,00%)	14 (6,39%)	14 (6,39%)	0 (0,00%)	19 (8,68%)
25	206	4 (1,94%)	4 (1,94%)	0 (0,00%)	2 (0,97%)	0 (0,00%)	2 (0,97%)	6 (2,91%)
29	226	23 (10,18%)	23 (10,18%)	0 (0,00%)	3 (1,33%)	3 (1,33%)	0 (0,00%)	26 (11,50%)
50	207	1 (0,48%)	1 (0,48%)	0 (0,00%)	6 (2,90%)	4 (1,93%)	2 (0,97%)	7 (3,38%)
55	209	6 (2,87%)	6 (2,87%)	0 (0,00%)	3 (1,44%)	3 (1,44%)	0 (0,00%)	9 (4,31%)
56	206	3 (1,46%)	2 (0,97%)	1 (0,49%)	3 (1,46%)	3 (1,46%)	0 (0,00%)	6 (2,91%)
57	218	15 (6,88%)	10 (4,59%)	5 (2,29%)	3 (1,38%)	3 (1,38%)	0 (0,00%)	18 (8,26%)
59	217	5 (2,30%)	4 (1,84%)	1 (0,46%)	12 (5,53%)	8 (3,69%)	4 (1,84%)	17 (7,83%)
<b>Total</b>	2808	93 (3,31%)	77 (2,74%)	16 (0,57%)	61 (2,17%)	53 (1,89%)	8 (0,28%)	154 (5,48%)
<b>Promig</b>	216	7,15	5,92	1,23	4,69	4,08	0,62	11,85
<b>± SD</b>	± 4,76	± 1,64	± 1,61	± 0,52	± 1,29	± 1,20	± 0,35	± 1,95
<b>Mediana</b>	216	5	4	0	3	3	0	9

PA, pèrdua absoluta; PRCN, pèrdua relativa amb 2 còpies del centròmer del cromosoma 9; PRM, pèrdua relativa amb monosomia 9; GA, guany absolut; GRCN, guany relatiu amb 2 còpies del centròmer; GRP, guany relatiu amb polisomia 9; AT, alteracions totals; SD, desviació estàndard

Taula 4.2.8. Alteracions en el nombre de còpies del locus 9p21 en el grup de pacients.

PACIENTS								
Individus	Nuclis analitzats	PA (%)	PRCN (%)	PRM (%)	GA (%)	GRCN (%)	GRP (%)	AT (%)
1	208	3 (1,44%)	1 (0,48%)	2 (0,96%)	2 (0,96%)	1 (0,48%)	1 (0,48%)	5 (2,40%)
2	207	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	6 (2,90%)	4 (1,93%)	2 (0,97%)	6 (2,90%)
3	221	10 (4,52%)	10 (4,52%)	0 (0,00%)	13 (5,88%)	13 (5,88%)	0 (0,00%)	23 (10,41%)
7	283	2 (0,71%)	2 (0,71%)	0 (0,00%)	18 (6,36%)	17 (6,01%)	1 (0,35%)	20 (7,07%)
10	211	9 (4,27%)	6 (2,84%)	3 (1,42%)	1 (0,47%)	1 (0,47%)	0 (0,00%)	10 (4,74%)
19	207	6 (2,90%)	3 (1,45%)	3 (1,45%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	6 (2,90%)
24	216	3 (1,39%)	3 (1,39%)	0 (0,00%)	13 (6,02%)	13 (6,02%)	0 (0,00%)	16 (7,41%)
31	205	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	4 (1,95%)	4 (1,95%)	0 (0,00%)	4 (1,95%)
34	214	8 (3,74%)	8 (3,74%)	0 (0,00%)	6 (2,80%)	5 (2,34%)	1 (0,47%)	14 (6,54%)
35	206	4 (1,94%)	4 (1,94%)	0 (0,00%)	2 (0,97%)	2 (0,97%)	0 (0,00%)	6 (2,91%)
36	229	23 (10,04%)	23 (10,04%)	0 (0,00%)	5 (2,18%)	2 (0,87%)	3 (1,31%)	28 (12,23%)
37	216	12 (5,56%)	12 (5,56%)	0 (0,00%)	4 (1,85%)	3 (1,39%)	1 (0,46%)	16 (7,41%)
38	226	19 (8,41%)	19 (8,41%)	0 (0,00%)	7 (3,10%)	7 (3,10%)	0 (0,00%)	26 (11,50%)
39	247	17 (6,88%)	17 (6,88%)	0 (0,00%)	3 (1,21%)	3 (1,21%)	0 (0,00%)	20 (8,10%)
41	205	4 (1,95%)	4 (1,95%)	0 (0,00%)	1 (0,49%)	1 (0,49%)	0 (0,00%)	5 (2,44%)
42	203	3 (1,48%)	1 (0,49%)	2 (0,99%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	3 (1,48%)
45	215	8 (3,72%)	8 (3,72%)	0 (0,00%)	7 (3,26%)	6 (2,79%)	1 (0,47%)	15 (6,98%)
46	239	33 (13,81%)	33 (13,81%)	0 (0,00%)	6 (2,51%)	6 (2,51%)	0 (0,00%)	39 (16,32%)
47	226	21 (9,29%)	20 (8,85%)	1 (0,44%)	3 (1,33%)	2 (0,88%)	1 (0,44%)	24 (10,62%)
48	207	7 (3,38%)	7 (3,38%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	7 (3,38%)
51	214	3 (1,40%)	3 (1,40%)	0 (0,00%)	11 (5,14%)	11 (5,14%)	0 (0,00%)	14 (6,54%)
52	202	1 (0,50%)	1 (0,50%)	0 (0,00%)	1 (0,50%)	1 (0,50%)	0 (0,00%)	2 (0,99%)
54	206	3 (1,46%)	1 (0,49%)	2 (0,97%)	3 (1,46%)	1 (0,49%)	2 (0,97%)	6 (2,91%)
<b>Total</b>	5013	199 (3,97%)	186 (3,71%)	13 (0,26%)	116 (2,31%)	103 (2,05%)	13 (0,26%)	315 (6,28%)
<b>Promig</b>	217,96	8,65	8,09	0,57	5,04	4,48	0,57	13,70
<b>± SD</b>	± 3,90	± 1,81	± 1,84	± 0,21	± 1,01	± 1,00	± 0,18	± 2,03
<b>Mediana</b>	214	6	4	0	4	3	0	14

PA, pèrdua absoluta; PRCN, pèrdua relativa amb 2 còpies del centròmer del cromosoma 9; PRM, pèrdua relativa amb monosomia 9; GA, guany absolut; GRCN, guany relatiu amb 2 còpies del centròmer; GRP, guany relatiu amb polisomia 9; AT, alteracions totals; SD, desviació estàndard

D'altra banda, també es van analitzar les aneuploïdies en el cromosoma 9, tant en controls com en pacients. Es va trobar que un 61,54 % (8/13) dels controls i un 56,52 % (13/23) dels pacients presentaven aneuploïdies (taules 4.2.9 i taula 4.2.10, respectivament). Si es descarten les monosomies, un 30,7% (4/13) dels controls i un 39% (9/23) dels pacients presentaven polisomies del cromosoma 9.

**Taula 4.2.9.** Anàlisi d'aneuploïdia del cromosoma 9 en individus control.

<b>CONTROLS</b>			
<b>Individu</b>	<b>Nuclis analitzats</b>	<b>Monosomia (%)</b>	<b>Polisomia (%)</b>
<b>5</b>	208	4 (1,92%)	0 (0,00%)
<b>11</b>	209	5 (2,39%)	0 (0,00%)
<b>12</b>	269	0 (0,00%)	0 (0,00%)
<b>13</b>	205	3 (1,46%)	1 (0,49%)
<b>15</b>	209	0 (0,00%)	0 (0,00%)
<b>23</b>	219	0 (0,00%)	0 (0,00%)
<b>25</b>	206	0 (0,00%)	2 (0,97%)
<b>29</b>	226	0 (0,00%)	0 (0,00%)
<b>50</b>	207	0 (0,00%)	2 (0,97%)
<b>55</b>	209	0 (0,00%)	0 (0,00%)
<b>56</b>	206	1 (0,49%)	0 (0,00%)
<b>57</b>	218	5 (2,29%)	0 (0,00%)
<b>59</b>	217	1 (0,46%)	4 (1,84%)
<b>Total</b>	2808	19 (0,68%)	9 (0,32%)
<b>Promig</b>	216	1,46	0,69
<b>± SD</b>	± 4,76	± 0,56	± 0,35
<b>Mediana</b>	209	0	0

SD, desviació estàndard



Taula. 4.2.10. Anàlisi d'aneuploidia del cromosoma 9 en pacients.

<b>PACIENTS</b>			
<b>Individu</b>	<b>Nuclis analitzats</b>	<b>Monosomia (%)</b>	<b>Polisomia (%)</b>
1	208	5 (2,40%)	1 (0,48%)
2	207	1 (0,48%)	2 (0,97%)
3	221	0 (0,00%)	0 (0,00%)
7	283	3 (1,06%)	10 (3,53%)
10	211	4 (1,90%)	0 (0,00%)
19	207	4 (1,93%)	0 (0,00%)
24	216	0 (0,00%)	0 (0,00%)
31	205	1 (0,49%)	0 (0,00%)
34	214	0 (0,00%)	1 (0,47%)
35	206	0 (0,00%)	0 (0,00%)
36	229	1 (0,44%)	3 (1,31%)
37	216	0 (0,00%)	1 (0,46%)
38	226	0 (0,00%)	0 (0,00%)
39	247	0 (0,00%)	0 (0,00%)
41	205	0 (0,00%)	0 (0,00%)
42	203	2 (0,99%)	0 (0,00%)
45	215	0 (0,00%)	1 (0,47%)
46	239	0 (0,00%)	0 (0,00%)
47	226	3 (1,33%)	1 (0,44%)
48	207	0 (0,00%)	0 (0,00%)
51	214	0 (0,00%)	0 (0,00%)
52	202	0 (0,00%)	0 (0,00%)
54	206	2 (0,97%)	2 (0,97%)
<b>Total</b>	<b>5013</b>	<b>26 (0,52%)</b>	<b>22 (0,44%)</b>
<b>Promig</b>	<b>217,96</b>	<b>1,13</b>	<b>0,96</b>
<b>± SD</b>	<b>± 3,83</b>	<b>± 0,33</b>	<b>± 0,45</b>
<b>Mediana</b>	<b>214</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

SD, desviació estàndard

Cal destacar que les pèrdues en el nombre de còpies del locus 9p21 predominaven sobre els guanys (taules 4.2.7 i 4.2.8). Tanmateix, en la majoria dels casos s'observà que aquestes pèrdues no anaven acompanyades de pèrdues del cromosoma 9. Aquest fet es va observar tant en pacients com en controls.

En dos controls i en un pacient es van detectar guanys i pèrdues del cromosoma 9 que no anaven acompanyades de guanys i/o pèrdues de 9p21. Aquests casos no s'han comptabilitzat com alteracions en el nombre de còpies del gen, però no es pot descartar que corresponguin a translocacions que el nostre tipus d'anàlisi en nuclis interfàsics no ens permet comprovar.

Per tal de veure si hi havia diferències en el nombre de còpies del locus 9p21 entre pacients i controls, primer es van normalitzar totes les variables estudiades en funció del nombre de nuclis estudiats. L'anàlisi estadística mitjançant el test t-Student i la suma de rangs de Wilcoxon no va trobar diferències significatives entre el grup de pacients i controls, tant si s'analitzaven les pèrdues absolutes i relatives, com els guanys absoluts i relatius, així com tampoc per les alteracions totals del locus 9p21.

Per tal de determinar si el tabac podia tenir algun efecte sobre el locus 9p21, es va analitzar la relació entre les alteracions en aquest locus i l'hàbit del tabac, sense tenir en compte a quin grup pertanyia cada individu. Es va aplicar la suma de rangs de Wilcoxon per cadascuna de les alteracions analitzades i no es van trobar diferències significatives.

També es va voler avaluar si els antecedents familiars de càncer tenien alguna influència en les alteracions del locus 9p21 sense trobar diferències estadísticament significatives entre les diferents variables i els antecedents familiars de càncer (suma de rangs de Wilcoxon  $P > 0,05$ ).

## **Discussió**

El rendiment de l'estudi de FISH va ser superior a l'estudi de fragilitat en PBLs dels mateixos individus. La FISH és una tècnica molt versàtil que no requereix que la cèl·lula es divideixi, només amb la presència de nuclis és suficient per obtenir un resultat, per tant en aquest cas no va influir el fet de que els limfòcits haguessin estat extrets amb citrat sòdic i congelats posteriorment. Únicament i degut a un problema tècnic amb la sonda del

locus 9p21 no es va obtenir hibridació en un cas particular. En general podem concloure que es va obtenir un bon rendiment de la tècnica.

Els nostres resultats mostren la presència, amb major o menor freqüència, d'alteracions afectant a 9p21 i *CCND1* en PBLs de tots els individus sense diferències significatives entre pacients i controls.

Estudis previs realitzats en altres tipus de neoplàsies havien detectat que les alteracions presents en els limfòcits de sang perifèrica són similars a les presents en el teixit tumoral (Pathak et al. 1991; Dave et al. 1993; Dotan et al. 2000).

Basant-se en què les pèrdues de 9p21 i guanys o amplificacions de *CCND1* són alteracions freqüentment implicades en la carcinogènesi de la bufeta, Shao i col·laboradors (2004) van hipotetitzar que aquestes alteracions es trobarien també en PBLs de pacients afectats de BC. Aquests autors van observar un increment estadísticament significatiu de les delecions en 9p21 i de les alteracions totals en el locus 9p21 en limfòcits de sang perifèrica d'individus amb BC. Concretament, van detectar que la taxa d'alteracions en 9p21 era de  $12,1 \pm 5,1$  en PBLs de pacients amb BC i de  $6,4 \pm 5,3$  en PBLs de controls. En el present estudi, tot i trobar una taxa similar d'alteracions en el locus 9p21 en pacients amb BC ( $14,61 \pm 2,18$ ) no es va trobar un increment estadísticament significatiu ni per les alteracions totals així com tampoc per les pèrdues ni pels guanys en el locus 9p21 en PBLs de pacients amb BC respecte als controls.

En el present estudi tampoc es varen trobar alteracions de *CCND1* estadísticament significatives en PBLs de pacients amb BC respecte a controls, tant si es valoraven els guanys com les pèrdues d'aquest gen. Aquests resultats contrasten novament amb els de Shao i col·laboradors (2004) que van descriure que les translocacions i amplificacions de *CCND1* només es trobaven en pacients amb BC. Aquestes discrepàncies podrien explicar-se pel fet de que els nostres resultats poden estar influïts per la presència d'APH en el cultiu de PBL tant en pacients com en controls. Tot i que el nostre estudi no permet identificar translocacions implicant el gen *CCND1*, els nostres resultats suggereixen la presència d'aquestes en sis pacients *versus* un únic control.

Estudis més recents comparant la freqüència de CNVs (*Copy number variation*) somàtics en PBLs de pacients afectats de BC i individus control, també procedents de la sèrie SBC/EPICURO, tampoc troben diferències entre ambdós grups (Rodríguez-Santiago, et

al. 2010). A part de la presència d'alteracions en PBLs de pacients afectats de BC, troben en individus control delecions en 9q, trisomia/polisomia 9 i UPD 9p, en un 39%, 63% i 83% de les cèl·lules analitzades, respectivament; també troben delecions i UPD en 11q, en un 39% i 22% de les cèl·lules analitzades, respectivament. La presència d'aquestes alteracions en individus sans suggereix l'existència d'un mosaïcisme somàtic clonal que estaria present en un 1,7% de la població adulta sense conseqüències fenotípiques (Rodríguez-Santiago et al. 2010). Estudis posteriors han mostrat que la freqüència d'aquest mosaïcisme incrementa amb l'edat degut a què més de la meitat d'aquestes alteracions es troben en els individus d'edat avançada (Jacobs et al. 2012). Els nostres resultats coincidrien amb els d'aquests autors en el que fa referència a que tampoc trobem diferències entre pacients i controls, que son individus d'edats avançades i que de forma interessant es troba afectat el cromosoma 9. De totes maneres, hem de tenir en compte que les alteracions presents en el nostre estudi poden haver estat induïdes per l'APH i que més aviat observem inestabilitat en els loci estudiats que no pas mosaïcisme. El fet que els cultius de PBLs del nostre estudi hagin estat tractats amb APH dóna suport al fet de que els CFS podrien generar CNVs tal i com proposen Wilson i col·laboradors (2015).

Degut a què l'hàbit del tabac és el principal factor de risc en el BC (Jiang et al. 2007; Volanis et al. 2010) i a Espanya, els estudis epidemiològics mostren que el risc de BC en la població fumadora encara és més elevat de l'esperat (Samanic et al. 2006) es va voler analitzar l'efecte del tabac en el locus 9p21 ja que alteracions d'aquest locus s'han trobat freqüentment en cèl·lules epitelials de fumadors crònics. En el present estudi no es va trobar un increment de les delecions (PA, pèrdua absoluta) en el locus 9p21. Inesperadament, a l'analitzar els efectes del tabac en el gen *CCND1* es van trobar delecions (PA, pèrdua absoluta i PRCN, pèrdua relativa amb dues còpies de centròmer) i guanys (GA, guany absolut i GRCN, guany relatiu amb dues còpies de centròmer) significatius entre la població fumadora i ex-fumadora respecte als no fumadors. De manera que probablement els efectes carcinogènics del tabac no sempre es reflecteixin a nivell de delecions en 9p21 sinó que podria produir els seus efectes alterant altres loci, com *CCND1*.

Tot i trobar una associació significativa entre presentar antecedents familiars de càncer i pertànyer al grup de pacients amb BC, aquesta associació no es va reflectir en les alteracions observades en *CCND1* ni en el locus 9p21 entre els dos grups. De manera que si només es tenien en compte les alteracions en aquests dos loci en funció dels

antecedents familiars, només es va trobar diferències significatives en els guanys de *CCND1* (GA i GRCN) possiblement suggerint una relació entre antecedents familiars de càncer i alteracions tals com translocacions, trencaments o amplificacions d'aquest gen.

**En resum**, els nostres resultats indiquen la presència d'alteracions cromosòmiques afectant el locus 9p21 i el gen *CCND1* tant en pacients com en controls. Donat que les alteracions d'aquests loci es manifesten en forma de guanys o pèrdues en un mateix individu, podem considerar que les alteracions detectades en el present estudi són un reflex d'una inestabilitat en aquestes regions que es manifesta com CNVs sota l'efecte d'un estrès replicatiu induït per l'afidicolina.

Els nostres resultats demostren que l'afidicolina indueix alteracions en forma de delecions i duplicacions en loci tals com 9p21 i *CCND1* normalment alterats en cèl·lules tumorals. En comparació a altres estudis realitzats sobre una mostra de pacients procedents de la mateixa sèrie que els nostres i que troben alteracions en mosaic afectant al cromosoma 9 i 9p21, no podem descartar el fet de que les regions 9p21 i 11q13 presentessin una inestabilitat constitucional que incrementaria amb l'edat i que, en un percentatge baix de casos, es faria clonal, tant en pacients com en controls.

# **RESULTATS**

**Capítol 3. Estudi d'instabilitat cromosòmica en la mucosa  
urotelial**



La inestabilitat genòmica pot estar confinada a un òrgan i actuar com a factor de predisposició a l'aparició de tumors.

En aquest sentit, el càncer de bufeta es pot considerar un model per l'estudi d'inestabilitat genòmica donada l'elevada freqüència de recidives i la multifocalitat o presència de tumors sincrònics o metacrònics en aquest òrgan. Amb l'objectiu de determinar si l'uroteli on hi ha hagut tumors de bufeta és inestable, es van analitzar amb FISH centromèric els cromosomes 1, 7, 8, 9, 11 i 17 per tal de detectar possibles aneuploidies afectant aquests cromosomes que puguin predisposar a l'aparició de tumors sincrònics o metacrònics a partir d'un uroteli inestable.

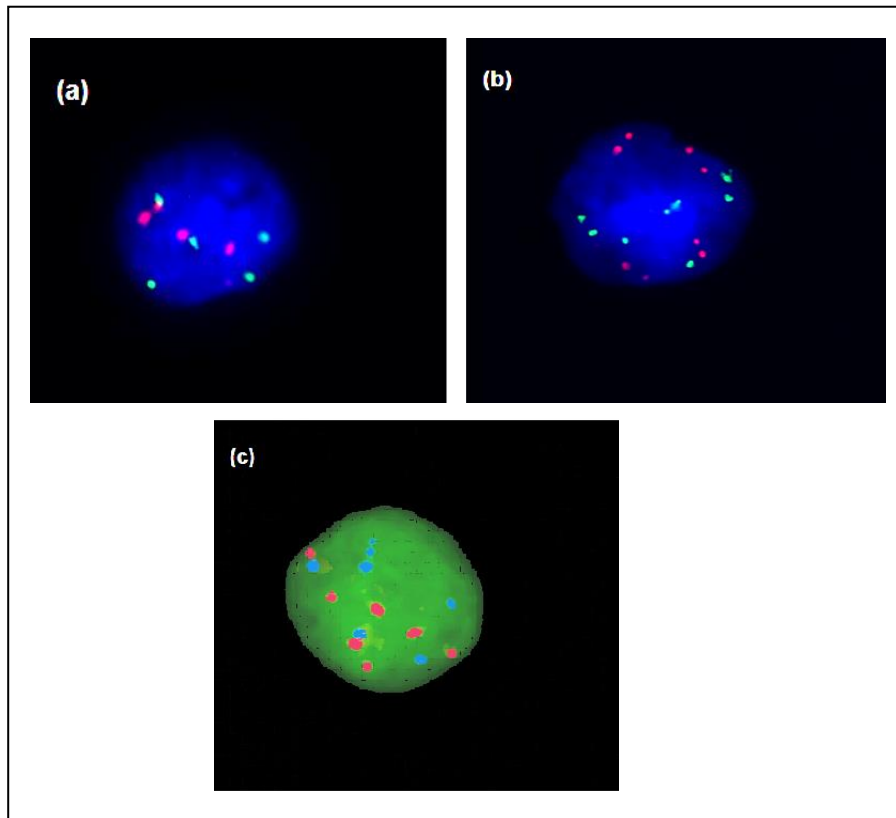
L'estudi es va portar a terme en dues bufetes obtingudes per cistoprostatectomia radical a causa de la presència de tumors d'alt grau i estadi avançat que havien estat extrets prèviament per resecció transuretral (RTUs). Es va aplicar la tècnica de FISH sobre empremtes de teixit provinents de deu regions diferents de la bufeta 1 i de vuit regions diferents de la bufeta 2, proporcionades per la Corporació Sanitària Parc Taulí de Sabadell - UDIAT Centre Diagnòstic (taula 4.3.1) . Es van escollir els cromosomes 1, 7, 8, 9, 11 i 17 perquè es troben freqüentment alterats en els tumors de bufeta.

**Taula 4.3.1.** Característiques histopatològiques de les dues peces cistectomitzades.

Nº	Sexe	Edat (anys)	Estadi oncològic de la cistectomia	Mostres analitzades
1	Masculí	56	T1G3	4 X T1G3 2 X mostres proximals 4 X mostres distals
2	Masculí	64	Sense evidència de neoplàsia residual	5 X mostres en zona d'ulceració (on prèviament hi havia hagut el tumor) 3 X mostres proximals

Per dur a terme aquest estudi es van utilitzar tres kits d'oligonucleòtids: KIT: 1 – 11; KIT: 17 – 9; i KIT: 8 – 7) proporcionats pel Dr. Joan Aurich d'*One Cell Systems* (Cambridge, MA). Aquests oligonucleòtids hibriden amb la regió centromèrica dels cromosomes, el què permet fer una valoració de les aneuploidies (figura 4.3.1). El fet d'haver utilitzat un kit que detecta simultàniament dos cromosomes diferents permet tenir un control intern de la tècnica de FISH, així com una valoració més objectiva de les monosomies.



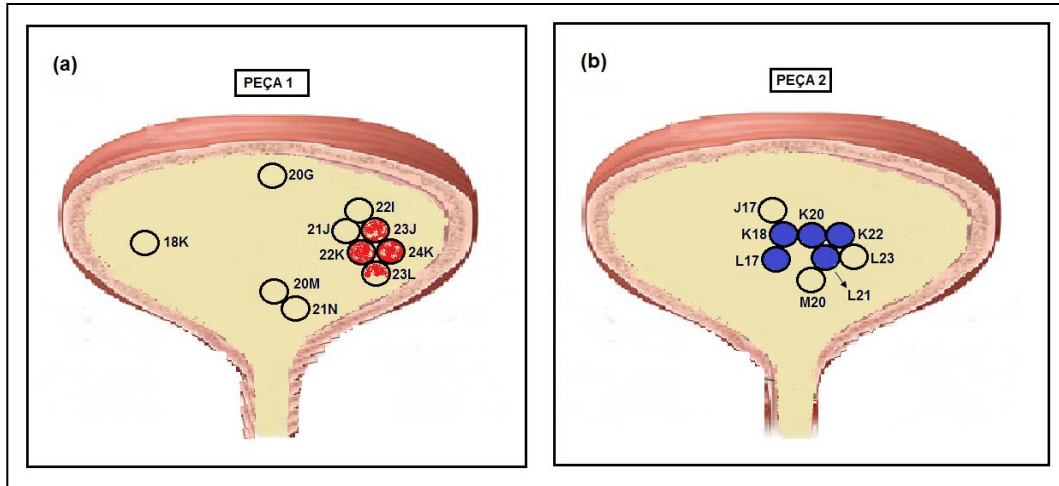


**Figura 4.3.1.** Nuclis hibridats amb els kits d'oligonucleòtids: (a) *1Red – 11Green*, amb quatre senyals pel cromosoma 1 i cinc senyals pel cromosoma 11; (b) *8Red – 7Green*, set senyals pel cromosoma 8 i vuit senyals pel cromosoma 7; (c) *17Red - 9Aqua*, set senyals pel cromosoma 17 i set senyals pel cromosoma 9.

Cada kit es va hibridar amb una empremta de teixit provinent d'una determinada regió de la bufeta prèviament seleccionada, tal i com es descriu a l'apartat corresponent de material i mètodes. Concretament, de la bufeta 1 es van biopsiar quatre regions del tumor, dues regions proximals al tumor i quatre regions distals al tumor. En la bufeta 2, es van biopsiar cinc regions on hi havia hagut el tumor, i tres regions pròximes, tal i com s'indica en la figura 3.2.1 de material i mètodes.

Les biòpsies tumorals es van realitzar a la regió en la que macroscòpicament s'observava tumor, les biòpsies proximals en les regions adjacents al tumor, i les biòpsies distals aquelles que es localitzaven com a mínim a 1 cm del tumor.

A la peça de cistectomia 1 es van analitzar les biòpsies tumorals: 23J, 22K, 24K i 23L; les biòpsies proximals: 22I i 21J; i les biòpsies distals: 20G, 18K, 20M i 21N. A la peça de cistectomia 2 es van analitzar les biòpsies on prèviament hi havia hagut un tumor: K18, K20, K22, L17, L21; i les biòpsies que es van considerar proximals degut a la seva localització: J17, L23 i M20 (figura 4.3.2).



**Figura 4.3.2.** Regions biopsiades a la peça de cistectomia 1 (a) i a la peça de cistectomia 2 (b). En vermell s'indica la regió corresponent a la recidiva de la peça de cistectomia 1, i en blau la regió on prèviament hi havia el tumor extret per RTU, el qual no ha recidivat, en la peça de cistectomia 2 (adaptada de Knwoles, 2015).

Es van poder analitzar gairebé totes les hibridacions de les 10 regions de la bufeta 1, a excepció de la combinació dels cromosomes 1 i 11 de la regió 18K, i totes les hibridacions de les 8 regions de la bufeta 2 (taula 4.3.2). Per cada empremta es van analitzar 200 nuclis, de manera que es van realitzar un mínim de 53 empremtes de teixit i es va estudiar un total de 10.600 nuclis.

**Taula 4.3.2.** Rendiment de l'estudi d'hibridació amb oligonucleòtids de *One Cell Systems* (Cambridge, MA).

BUFETA 1					BUFETA 2				
Biòpsies	Nombre de nuclis estudiats			Rendiment	Biòpsies	Nombre nuclis estudiats			Rendiment
	KIT 1-11	KIT 7-8	KIT 9-17			KIT 1-11	KIT 7-8	KIT 9-17	
<b>20G</b>	200	200	200	100%	<b>J17</b>	200	200	200	100%
<b>22I</b>	200	200	200	100%	<b>K18</b>	200	200	200	100%
<b>21J</b>	200	200	200	100%	<b>K20</b>	200	200	200	100%
<b>23J</b>	200	200	200	100%	<b>K22</b>	200	200	200	100%
<b>18K</b>	0	200	200	66,66%	<b>L17</b>	200	200	200	100%
<b>22K</b>	200	200	200	100%	<b>L21</b>	200	200	200	100%
<b>24K</b>	200	200	200	100%	<b>L23</b>	200	200	200	100%
<b>23L</b>	200	200	200	100%	<b>M20</b>	200	200	200	100%
<b>20M</b>	200	200	200	100%					
<b>21N</b>	200	200	200	100%					

## Peça de cistectomia 1

Es van trobar alteracions cromosòmiques en totes les biòpsies analitzades d'aquesta peça. Es va comptabilitzar un total 1.832 nuclis amb alteracions (31,59%) amb un rang de 23 a 160 alteracions per biòpsia.

Alteracions dels cromosomes 1 i 11 es van observar en 509 nuclis (28,28%) amb un promig de  $56,56 \pm 9,02$  alteracions per biòpsia. A la regió tumoral (23J, 22K, 24K i 23L), es van observar de 23 a 94 alteracions, destacant la regió 23J amb 94 alteracions (47% nuclis alterats). A la regió proximal (22I i 21J), es van observar 42 i 87 alteracions, destacant la regió 22I amb 87 alteracions (43,50% nuclis alterats). I a la regió distal (20G, 18K, 20M i 21N) el rang de les alteracions va oscil·lar entre 32 i 92, destacant la regió 21N amb un 46% dels nuclis amb alteracions (taula 4.3.3).

Alteracions dels cromosomes 9 i 17 es van observar en 650 nuclis (32,50%) amb un promig de  $65 \pm 6,21$  alteracions per regió. A la regió tumoral (23J, 22K, 24K i 23L), es van observar un rang d'alteracions entre 36 i 97, destacant la regió 23J amb 97 alteracions (48,50% nuclis alterats). A la regió proximal (22I i 21J), es van observar 68 i 90 alteracions, destacant la regió 22I amb 90 alteracions (45% nuclis alterats). I a la regió distal (20G, 18K, 20M i 21N), es van observar un rang d'alteracions entre 49 i 83, destacant la regió 21N amb 83 alteracions (41,5% nuclis alterats) (taula 4.3.3).

Alteracions dels cromosomes 7 i 8 es van observar en 673 nuclis (33,65%) amb un promig de  $67,30 \pm 13,20$  alteracions per regió. A la regió tumoral (23J, 22K, 24K i 23L), es va observar un rang d'alteracions entre 70 i 160, destacant la regió 24K amb 160 alteracions (80% dels nuclis alterats). A la regió proximal (22I i 21J), es van observar 37 i 65 alteracions, destacant la regió 22I amb 65 alteracions (32,5%). I a la regió distal (20G, 18K, 20M i 21N), es va observar un rang d'alteracions entre 25 i 51, destacant la regió 21N amb 51 alteracions (25,5%) (taula 4.3.3).

La variable monosomia relativa/polisomia relativa (MR/PR) fa referència als nuclis que presenten pèrdua d'un cromosoma i simultàniament guany de l'altre, representant un percentatge molt petit dels nuclis estudiats (taula 4.3.3).

El nombre modal (NM) fa referència al nombre cromosòmic més comú en una població heterogènia de cèl·lules. En l'estudi d'aquesta peça de cistectomia es va observar que el NM era de dos en totes les biòpsies analitzades exceptuant la biòpsia tumoral 24K

on el NM pel cromosoma 8 era tres. La distribució o heterogeneïtat de les alteracions cromosòmiques detectades per biòpsia en aquesta peça de cistectomia es pot observar a les figures 4.3.3, 4.3.4 i 4.3.5 corresponents a les quatre biòpsies de la regió tumoral, a les dues biòpsies proximals i a les quatre biòpsies distals, respectivament.

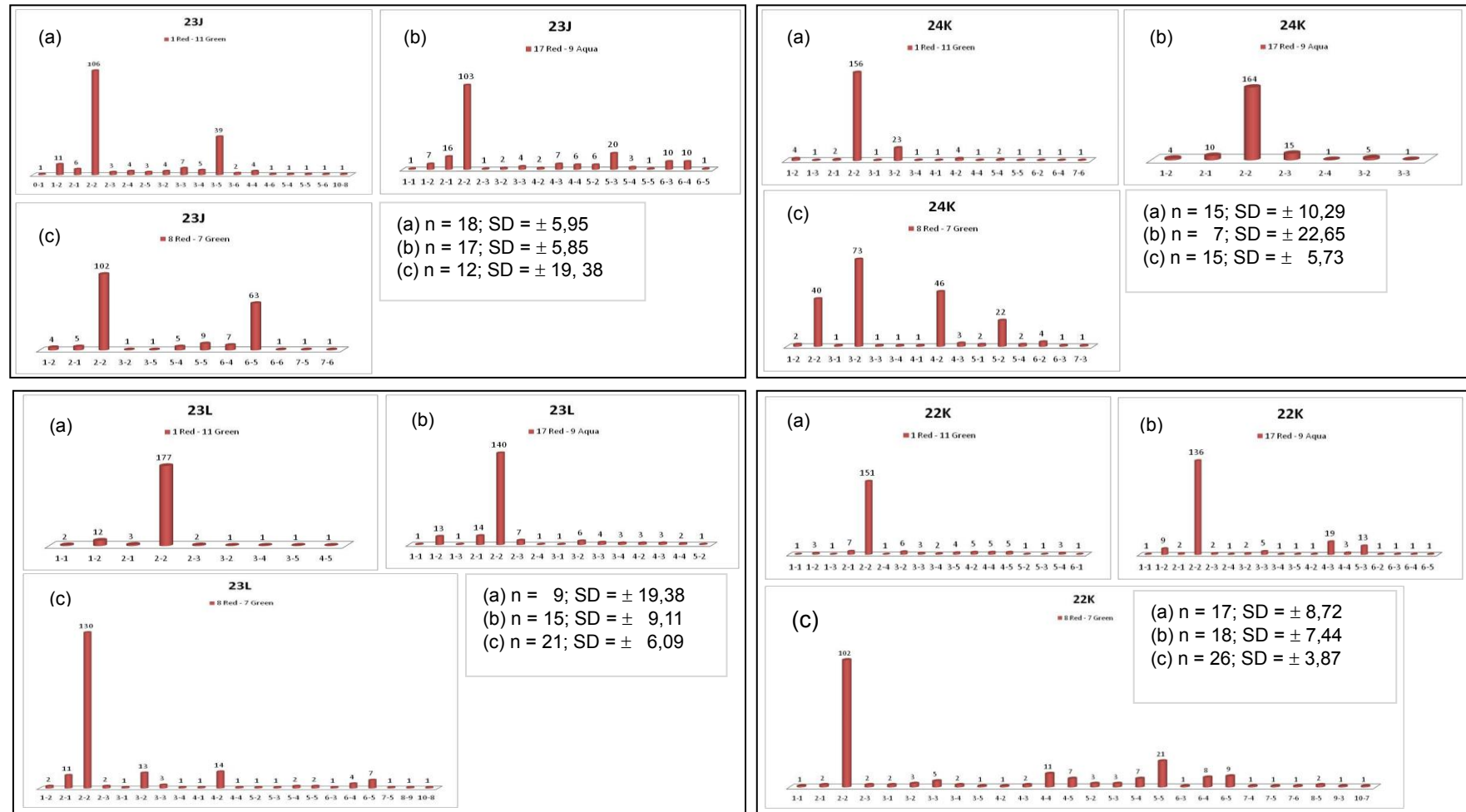
En aquesta peça es va observar que presentava una gran dispersió o heterogeneïtat de les alteracions, principalment en les quatre mostres tumorals, les dues proximals així com la mostra distal 21N. De manera que si s'establia un valor llindar de desviació típica o desviació estàndard ( $\pm$  SD) inferior a 11 com a mesura de dispersió o heterogeneïtat de les alteracions analitzades, s'observava dispersió de les alteracions pels cromosomes 1 i 11 en tres mostres tumorals (23J, 24K i 22K), en les dues mostres proximals (22I i 21J) i en la distal 21N. Pels cromosomes 9 i 17 s'observava dispersió en tres mostres tumorals (23J, 23L i 22K), en les dues proximals i en les quatre distals. Mentre que pels cromosomes 7 i 8, s'observava dispersió en les quatre mostres tumorals, en les dues proximals i en les distals 18K, 20G i 21N (figures 4.3.3, 4.3.4 i 4.3.5).

**Taula 4.3.3.** Alteracions a la peça de cistectomia 1.

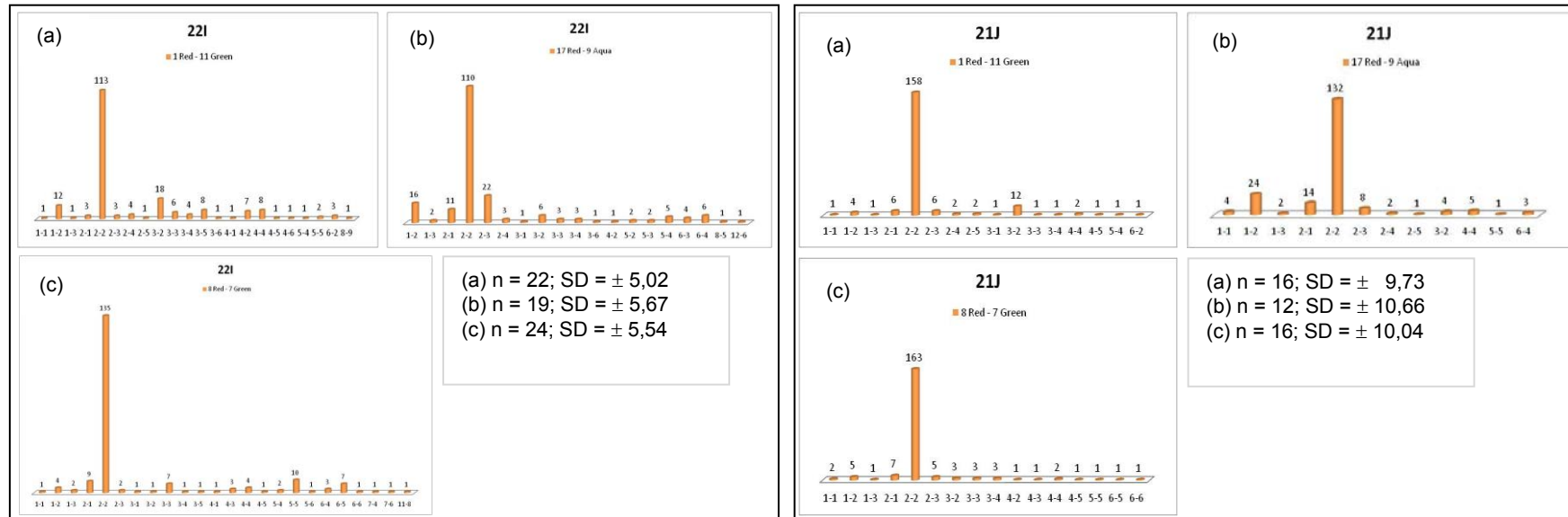
	Cromosomes 1 - 11						Cromosomes 9 - 17						Cromosomes 7 - 8						
	N	M	P	MR/PR	AT	% AT	N	M	P	MR/PR	AT	% AT	N	M	P	MR/PR	AT	% AT	
<b>Distal</b>	<b>20G</b>	154	17	29		46	23,00%	147	31	21	1	53	26,50%	160	25	13	2	40	20,00%
	<b>18K</b>						0,00%	150	23	25	2	50	25,00%	171	12	15	2	29	14,50%
	<b>20M</b>	168	19	13		32	16,00%	151	23	24	2	49	24,50%	175	14	9	2	25	12,50%
	<b>21N</b>	108	8	84		92	46,00%	117	26	53	4	8	41,50%	149	12	38	1	51	25,50%
<b>Proximal</b>	<b>22I</b>	113	16	69	2	87	43,50%	110	27	60	3	90	45,00%	135	14	48	3	65	32,50%
	<b>21J</b>	158	11	29	2	42	21,00%	132	42	24	2	68	34,00%	163	14	22	1	37	18,50%
<b>Tumor</b>	<b>23J</b>	106	18	76		94	47,00%	103	24	73		97	48,50%	102	9	89		98	49,00%
	<b>22K</b>	151	11	36	2	49	24,50%	136	12	52		64	32,00%	102	3	93	2	98	49,00%
	<b>24K</b>	156	6	35	3	44	22,00%	164	14	22		36	18,00%	40	2	154	4	160	80,00%
	<b>23L</b>	177	17	6		23	11,50%	140	28	30	2	60	30,00%	130	13	56	1	70	35,00%
<b>Total</b>	1291	123	377	9	509	28,28%	1350	250	384	16	650	32,50%	1327	118	537	18	673	33,65%	
<b>Promig</b>	143,44	13,67	41,89	1,00	56,56		135,00	25,00	38,40	1,60	65,00		132,70	11,80	53,70	1,80	67,30		
<b>±SD</b>	±9,02	±1,58	±9,29	±0,17	±9,02		±6,21	±2,66	±6,05	±0,30	±6,21		±13,20	±2,03	±14,64	±0,32	±13,20		
<b>Mediana</b>	154,00	16,00	35,00	2,00	46,00		138,00	25,00	27,50	2,00	62,00		142,00	12,50	43,00	2,00	58,00		

N, nuclis normal; M, monosomia; P, polisomia; MR/PR, monosomia relativa/polisomia relativa; AT, alteracions totals.  
La variable MR/PR fa referència als nuclis que presenten pèrdua d'un cromosoma i simultàniament guany de l'altre.

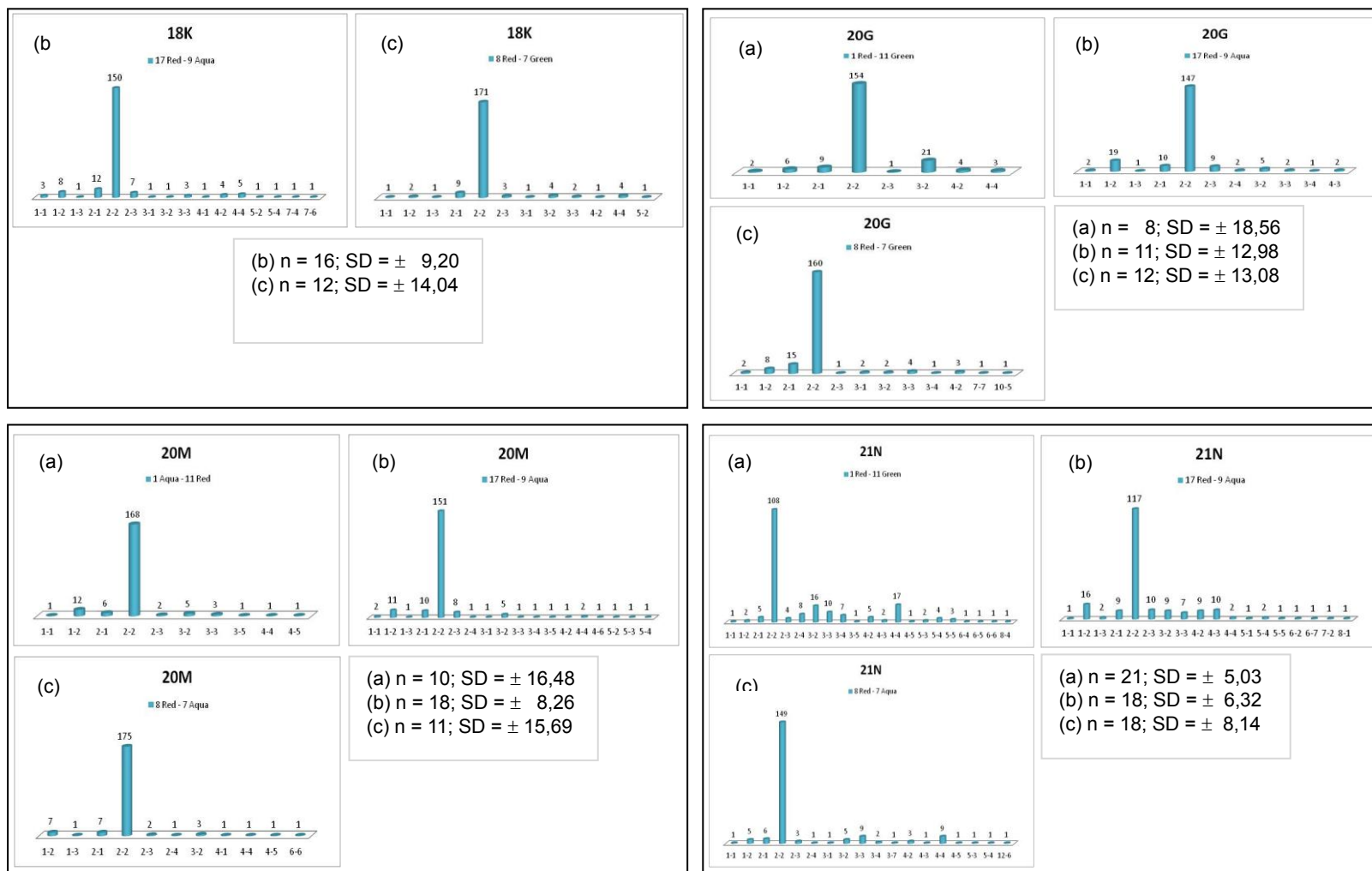
**Figura 4.3.3.** Dispersió de les alteracions en les quatre biòpsies de la regió tumoral de la peça de cistectomia 1 (23J, 23L, 24K i 22K): (a) pels cromosomes 1 i 11; (b) pels cromosomes 17 i 9; (c) i pels cromosomes 8 i 7.



**Figura 4.3.4.** Dispersió de les alteracions observades en les dues biòpsies proximals de la peça de cistectomia 1 (22I i 21J): (a) pels cromosomes 1 i 11; (b) pels cromosomes 17 i 9; (c) pels cromosomes 8 i 7.



**Figura 4.3.5.** Dispersió de les alteracions observades en les quatre biòpsies distals a tumor de la peça de cistectomia 1 (18K, 20M, 20G i 21N): (a) pels cromosomes 1 i 11; (b) pels cromosomes 17 i 9; (c) pels cromosomes 8 i 7.





L'aneuploïdia és una característica present en les cèl·lules tumorals en la qual el nombre de cromosomes difereix d'un nombre exacte múltiple de la dotació haploide (n). Es van trobar aneuploïdies en totes les regions analitzades de la peça de cistectomia 1 (taula 4.3.4).

**Taula 4.3.4.** Aneuploïdies en la peça de cistectomia 1 segons localització

		Distal				Proximal		Tumor			
		20G	18K	20M	21N	22I	21J	23J	22K	24K	23L
1	N	164	-	176	125	124	174	122	159	158	182
	AT	36 (18%)	-	24 (12%)	75 (37,5%)	76 (38%)	26 (13%)	78 (39%)	41 (20,5%)	42 (21%)	18 (9%)
	M	8	-	13	3	14	6	12	5	5	14
	P	28	-	11	72	62	20	66	36	37	4
11	N	185	-	185	131	153	175	121	166	188	190
	AT	15 (7,5%)	-	15 (7,5%)	69 (34,5%)	47 (23,5%)	25 (12,5%)	79 (39,5%)	34 (17%)	12 (5%)	10 (5%)
	M	11	-	7	6	5	8	7	9	4	5
	P	4	-	8	63	42	17	72	25	8	5
17	N	168	169	170	136	146	157	120	141	190	162
	AT	32 (16%)	31 (15,5%)	30 (15%)	64 (32%)	54 (27%)	43 (21,5%)	80 (40%)	59 (29,5%)	10 (5%)	38 (19%)
	M	22	12	14	19	18	30	8	10	4	15
	P	10	19	16	45	36	13	72	49	6	23
9	N	171	164	169	153	135	160	120	149	173	163
	AT	29 (14,5%)	36 (18%)	31 (15,5%)	47 (23,5%)	65 (32,5%)	40 (20%)	80 (40%)	51 (25,5%)	27 (13,5%)	37 (18,5%)
	M	12	17	13	12	12	18	17	3	10	16
	P	17	19	18	35	53	22	63	48	17	21
8	N	176	183	185	159	146	175	107	106	40	143
	AT	24 (12%)	17 (8,5%)	15 (7,5%)	41 (20,5%)	54 (27%)	25 (12,5%)	93 (46,5%)	94 (47%)	160 (80%)	57 (28,5%)
	M	10	4	8	6	7	8	4	1	2	2
	P	14	13	7	35	47	17	89	93	158	55
7	N	173	179	185	162	140	172	107	109	187	160
	AT	27 (13,5%)	21 (10,5%)	15 (7,5%)	38 (19%)	60 (30%)	28 (14%)	93 (46,5%)	91 (45,5%)	13 (6,5%)	40 (20%)
	M	19	11	8	8	12	9	5	5	4	13
	P	8	10	7	30	48	19	88	86	9	27

Les alteracions del cromosoma 1, exceptuant la biòpsia tumoral 23L, van superar el 10% en totes les regions analitzades, arribant a més del 30% d'alteracions a 21N (distal), a 22I (proximal) i a 23J (tumoral). El nombre d'alteracions del cromosoma 11 va ser més elevat a la regió proximal que a la regió distal i que en algunes de les regions tumorals, exceptuant la biòpsia 23J tumoral on quasi va arribar al 40% i la biòpsia 21N distal on quasi va arribar al 35%. La freqüència d'alteracions del cromosoma 17 va ser superior al 15% en totes les regions exceptuant la biòpsia tumoral 24K (5%). Novament, les

freqüències més elevades d'alteracions pel cromosoma 17 es van trobar a la biòpsia distal 21N i a la biòpsia tumoral 23J. Pel que fa al cromosoma 9, aquest es va trobar alterat en totes les regions i per sobre d'un 13%. No es va observar predominança de la monosomia per sobre de la polisomia en cap de les regions estudiades. El cromosoma 8 es va trobar alterat en totes les regions, arribant a un 80% en la regió tumoral (24K). Finalment, el cromosoma 7 també es va trobar alterat en totes les regions, però com s'observava amb el cromosoma 8, es va observar que a la regió tumoral les alteracions arribaven fins el 46,5%, tot i que es va observar una regió tumoral (24K) amb poques alteracions per aquest cromosoma. Aquestes alteracions cromosòmiques eren principalment polisomies, tal i com es pot observar a la figura 4.3.6 en color vermell.

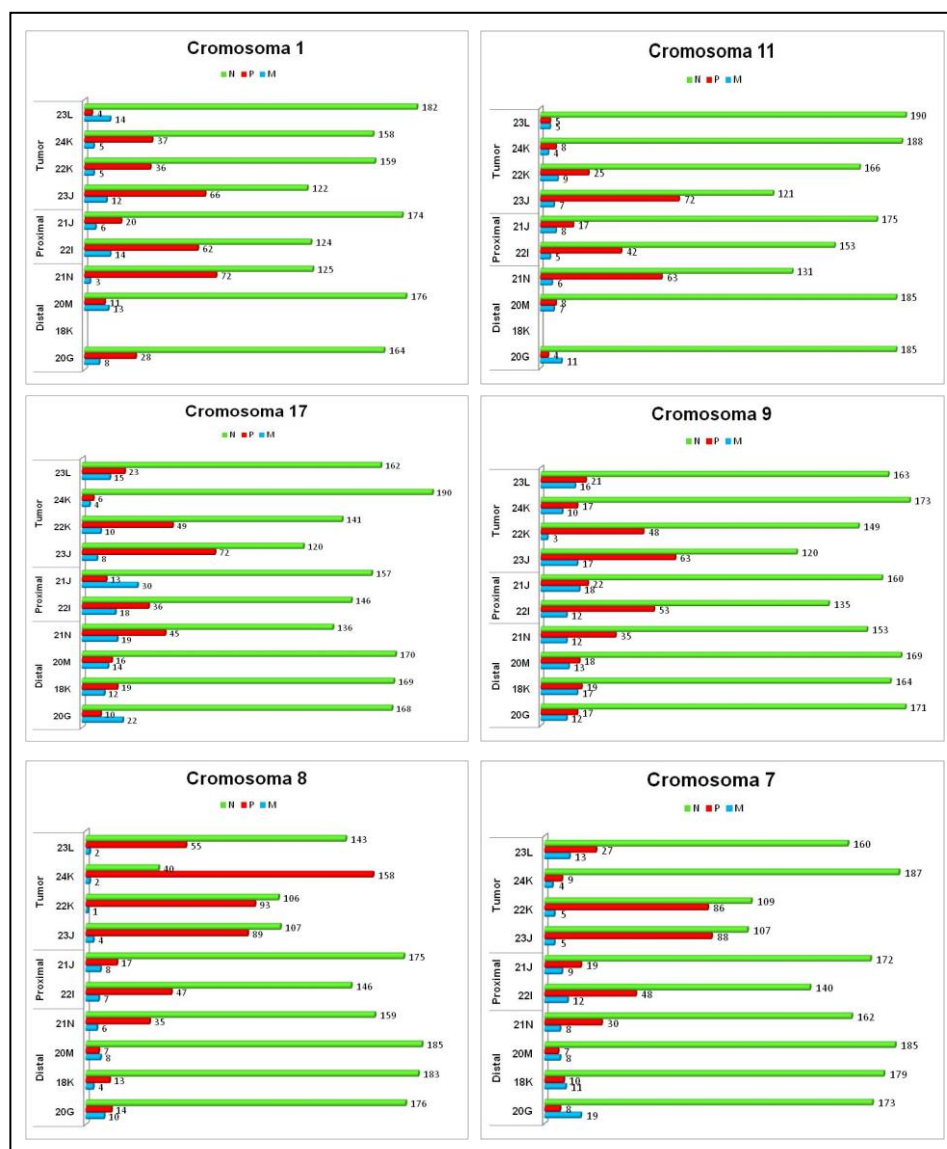


Figura 4.3.6. Aneuploidia dels cromosomes 1, 7, 8, 9, 11 i 17 en funció de la biòpsia en la peça de cistectomia 1. En verd, nuclis normals (N); en blau, monosomies (M); i en vermell, les polisomies (P).

## Peça de cistectomia 2

Es van trobar alteracions cromosòmiques en totes les biòpsies analitzades d'aquesta peça, tot i que amb una freqüència inferior a la observada a la peça de cistectomia 1. Es va comptabilitzar un total de 725 nuclis alterats (15,10%) amb un rang de 7 a 76 alteracions per biòpsia.

Alteracions en els cromosomes 1 i 11 es van observar en 277 nuclis (17,31%) amb un promig de  $34,63 \pm 6,89$  alteracions per biòpsia. A la regió d'ulceració on prèviament hi havia el tumor (L17, L21, K18, K20 i K22), es van observar de 23 a 76 alteracions, destacant la regió L21 amb 76 alteracions (38% nuclis alterats). A la regió proximal (L23, J17 i M20), es van observar entre 19 i 28 alteracions, destacant la regió M20 amb 28 alteracions (14%) (taula 4.3.5).

Alteracions en els cromosomes 9 i 17 es van observar en 262 nuclis (16,38%) amb un promig de  $32,75 \pm 2,20$  alteracions. A la regió on prèviament hi havia el tumor (L17, L21, K18, K20 i K22), es van observar un rang d'alteracions entre 29 i 46, destacant la regió L17 amb 46 alteracions (23%). A la regió proximal (L23, J17 i M20), es van observar de 26 a 34 alteracions, destacant la regió M20 amb 34 alteracions (17%) (taula 4.3.5).

Alteracions en els cromosomes 7 i 8 es van observar en 186 nuclis (11,63%) amb un promig de  $23,25 \pm 4,7$  alteracions. A la regió on prèviament hi havia el tumor (L17, L21, K18, K20 i K22), es van observar un rang d'alteracions entre 17 i 45, destacant la regió L21 amb 45 alteracions (22,50%). A la regió proximal (L23, J17 i M20), es van observar de 7 a 19 alteracions, destacant la regió M20 amb 19 alteracions (9,50%) (taula 4.3.5).

La variable monosomia relativa/polisomia relativa (MR/PR) fa referència als nuclis que presenten pèrdua d'un cromosoma i simultàniament guany de l'altre, representant un percentatge molt petit dels nuclis estudiats (taula 4.3.5).

En l'estudi d'aquesta peça de cistectomia es va observar que el NM era de dos en totes les biòpsies analitzades. L'heterogeneïtat de les alteracions cromosòmiques detectades per biòpsia en aquesta peça es pot observar a les figures 4.3.7 i 4.3.8 corresponents a les cinc biòpsies realitzades a la regió on prèviament hi havia el tumor i a les tres biòpsies proximals, respectivament.

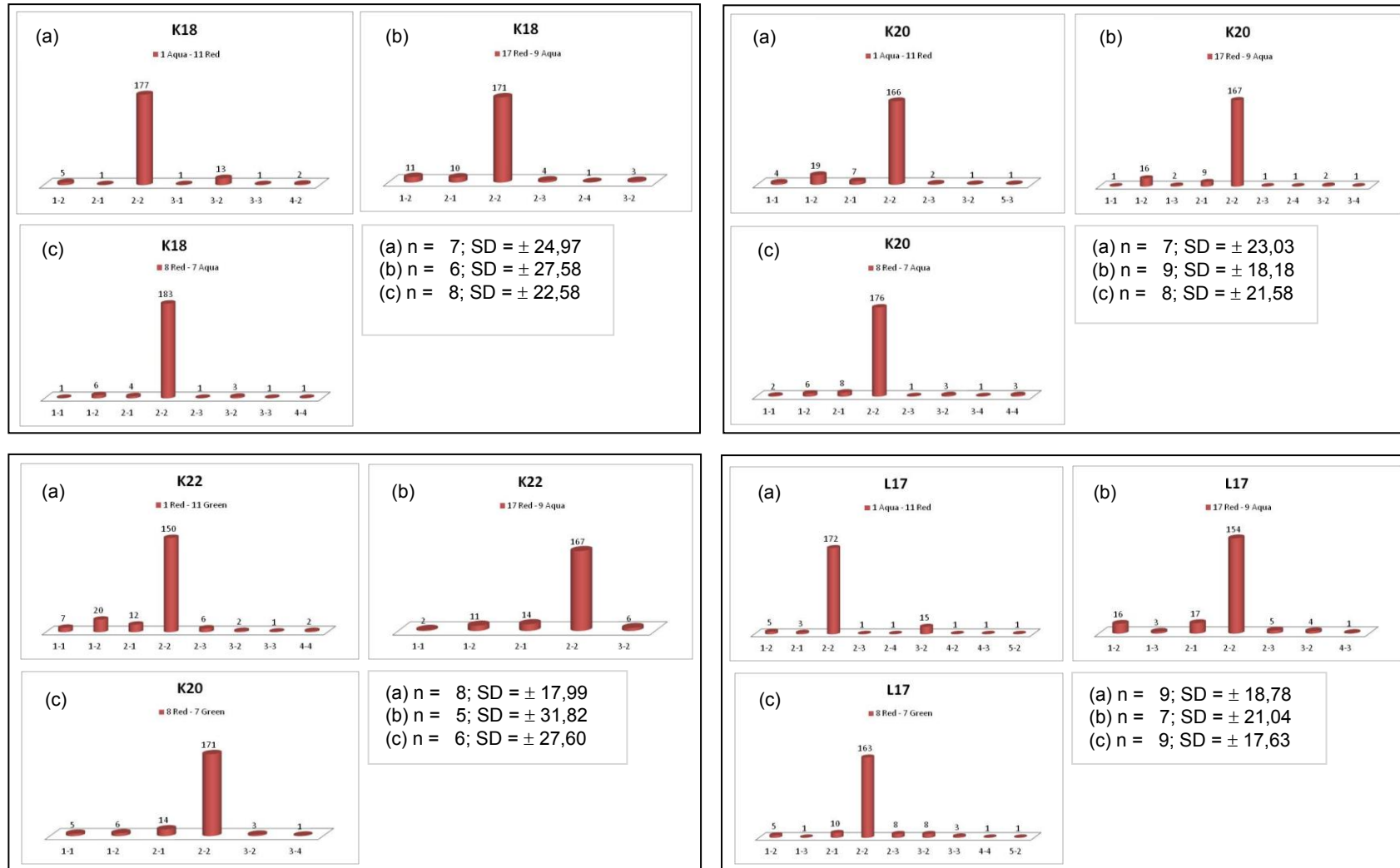
De la mateixa manera que en la peça de cistectomia anterior, es va considerar que la mostra presentava dispersió o heterogeneïtat quan la desviació típica o desviació estàndard ( $\pm$  SD) era inferior a 11. En aquesta peça únicament es va observar dispersió a la regió L21 pels cromosomes 1 i 11 (figura 4.3.7 i 4.3.8).

Taula 4.3.5. Alteracions a la peça de cistectomia 2.

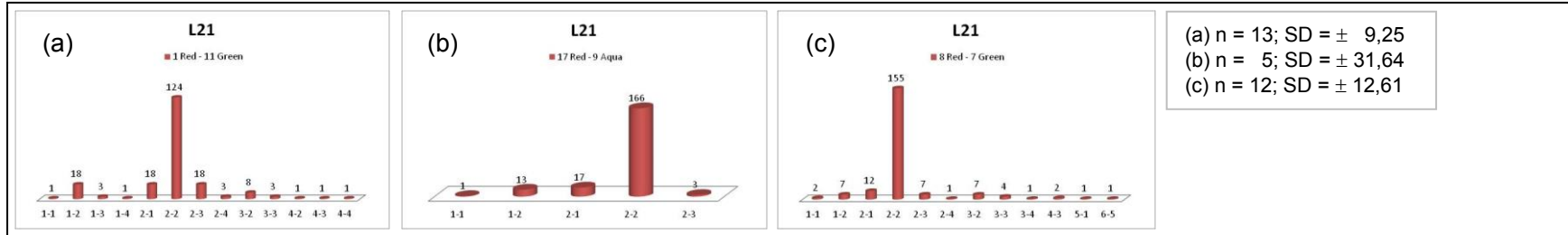
	Cromosomes 1 - 11						Cromosomes 9 - 17						Cromosomes 7 - 8						
	N	M	P	MR/PR	AT	% AT	N	M	P	MR/PR	AT	% AT	N	M	P	MR/PR	AT	%AT	
<b>Proximal</b>	<b>L23</b>	181	9	9	1	19	9,50%	174	18	7	1	26	13,00%	193	5	2		7	3,50%
	<b>J17</b>	181	7	11	1	19	9,50%	173	18	8	1	27	13,50%	192	7	1		8	4,00%
	<b>M20</b>	172	19	9		28	14,00%	166	30	2	2	34	17,00%	181	17	2		19	9,50%
<b>Tumor</b>	<b>L17</b>	172	8	20		28	14,00%	154	33	10	3	46	23,00%	163	15	21	1	37	18,50%
	<b>L21</b>	124	37	35	4	76	38,00%	166	31	3		34	17,00%	155	21	23	1	45	22,50%
	<b>K18</b>	177	6	16	1	23	11,50%	171	21	8		29	14,50%	183	11	6		17	8,50%
	<b>K20</b>	166	30	4		34	17,00%	167	26	5	2	33	16,50%	176	16	8		24	12,00%
	<b>K22</b>	150	39	11		50	25,00%	167	27	6		33	16,50%	171	25	4		29	14,50%
<b>Total</b>	1323	155	115	7	277	17,31%	1338	204	49	9	262	16,38%	1414	117	67	2	186	11,63%	
<b>Promig</b>	165,4	19,38	14,38	0,88	34,63		167,3	25,5	6,13	1,13	32,75		176,8	14,63	8,38	0,25	23,25		
<b>± SD</b>	±6,89	±4,96	±3,40	±0,53	±6,89		±2,20	±2,08	±0,95	±0,30	±2,20		±4,72	±2,40	±3,09	±0	±4,72		
<b>Mediana</b>	172	14	11	1	28		167	26,5	6,5	2	33		178,5	15,5	5	1	21,5		

N, nuclis normal; M, monosomia; P, polisomia; MR/PR, monosomia relativa/polisomia relativa; AT, alteracions totals. La variable MR/PR fa referència als nuclis que presenten pèrdua d'un cromosoma i simultàniament guany de l'altre.

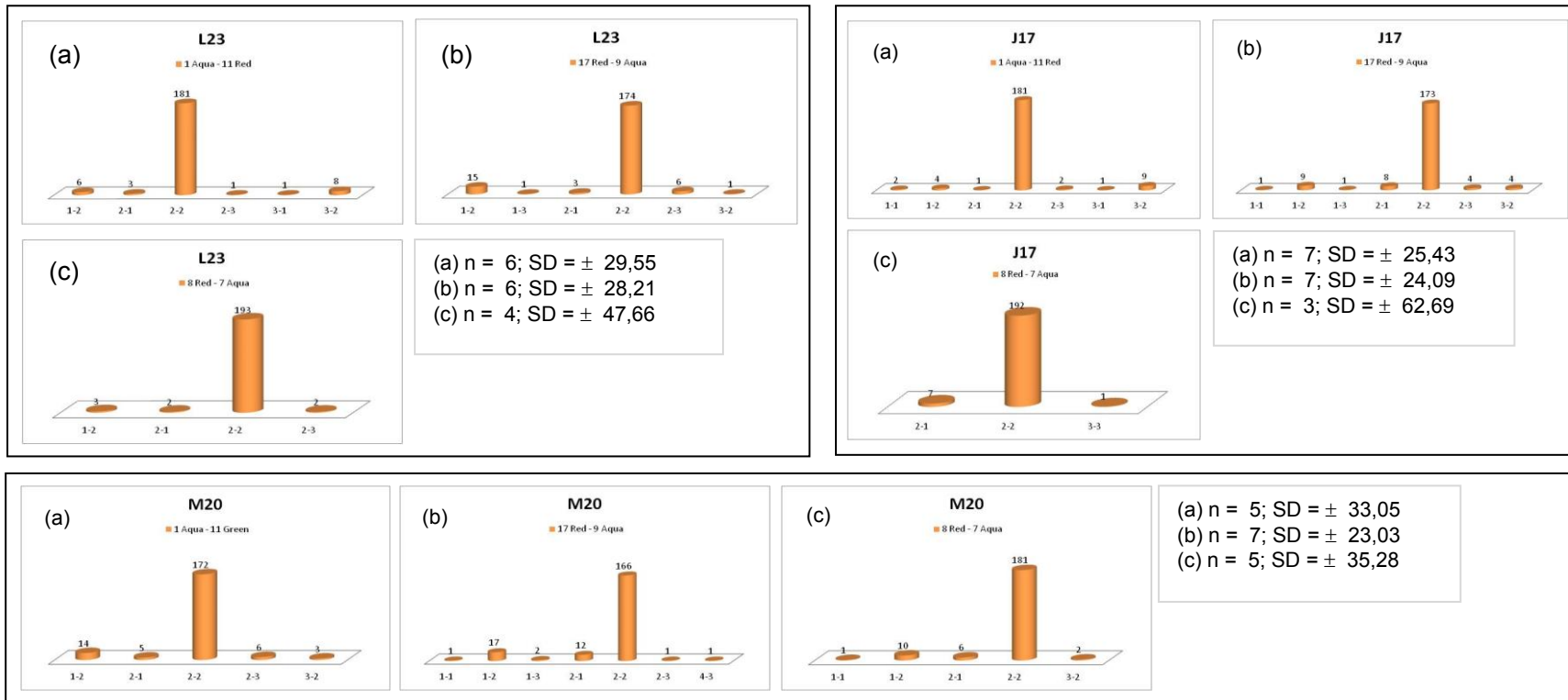
**Figura 4.3.7.** Dispersió de les alteracions en les cinc biòpsies de la regió on prèviament hi havia un tumor de la peça de cistectomia 2 (K18, K20, K22, L17 i L22): (a) pels cromosomes 1 i 11; (b) pels cromosomes 17 i 9; (c) i pels cromosomes 8 i 7.



**Figura 4.3.7. (continuació)**



**Figura 4.3.8** Dispersió de les alteracions en les tres biòpsies pròximes a tumor de la peça de cistectomia 2 (L23, J17 i M20): (a) pels cromosomes 1 i 11; (b) pels cromosomes 17 i 9; (c) i pels cromosomes 8 i 7.



Tot i que es varen trobar aneuploïdies en les regions analitzades de la peça de cistectomia 2 (taula 4.3.6), el percentatge d'aquestes va ser al voltant de la meitat de les observades a la peça de cistectomia 1.

**Taula 4.3.6.** Aneuploïdies a la peça de cistectomia 2 segons la localització

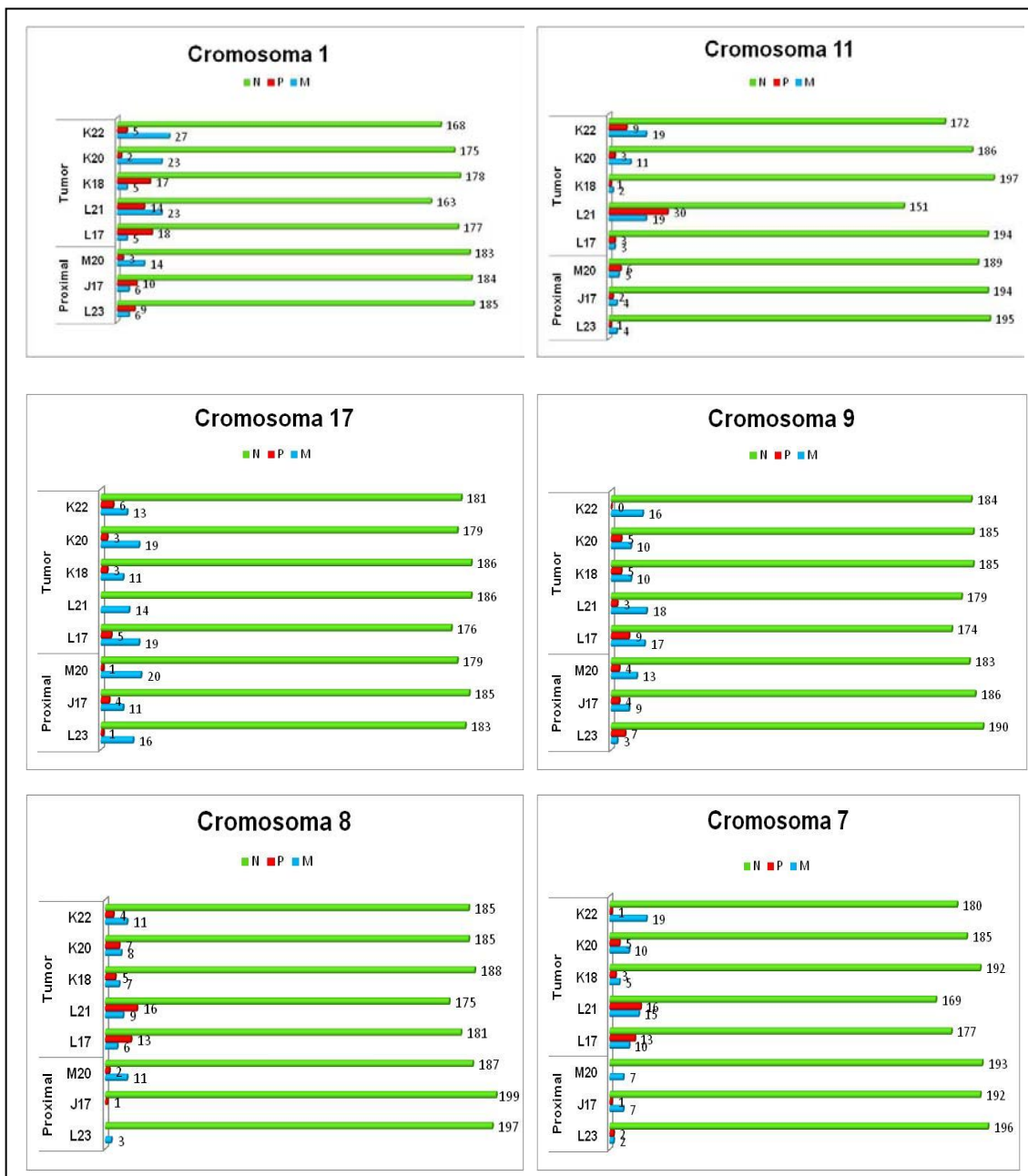
		Proximal			Regió on prèviament hi havia tumor				
		L23	J17	M20	L17	L21	K18	K20	K22
1	N	185	184	183	177	163	178	175	168
	AT	15 (7,5%)	16 (8%)	17 (8,5%)	23 (11,5%)	37 (18,5%)	22 (11%)	25 (12,5%)	32 (16%)
	M	6	6	14	5	23	5	23	27
	P	9	10	3	18	14	17	2	5
11	N	195	194	189	194	151	197	186	172
	AT	5 (2,5%)	6 (3%)	11 (5,5%)	6 (3%)	49 (24,5%)	3 (1,5%)	14 (7%)	28 (14%)
	M	4	4	5	3	19	2	11	19
	P	1	2	6	3	30	1	3	9
17	N	183	185	179	176	186	186	179	181
	AT	17 (8,5%)	15 (7,5%)	21 (10,5%)	24 (12%)	14 (7%)	14 (7%)	22 (11%)	19 (9,5%)
	M	16	11	20	19	14	11	19	13
	P	1	4	1	5		3	3	6
9	N	190	186	183	174	179	185	185	184
	AT	10 (5%)	13 (6,5%)	17 (8,5%)	26 (13%)	21 (10,5%)	15 (7,5%)	15 (7,5%)	16 (8%)
	M	3	9	13	17	18	10	10	16
	P	7	4	4	9	3	5	5	
8	N	197	199	187	181	175	188	185	185
	AT	3 (1,5%)	1 (0,5%)	13 (6,5%)	19 (9,5%)	25 (12,5%)	12 (6%)	15 (7,5%)	15 (7,5%)
	M	3		11	6	9	7	8	11
	P		1	2	13	16	5	7	4
7	N	196	192	193	177	169	192	185	180
	AT	4 (2%)	8 (4%)	7 (3,5%)	23 (11,5%)	31 (15,5%)	8 (4%)	15 (7,5%)	20 (10%)
	M	2	7	7	10	15	5	10	19
	P	2	1		13	16	3	5	1

N, nuclis normals; M, monosomia; P, polisomia; AT, alteracions totals

En aquesta peça, tot i que es van observar aneuploïdies en totes les biòpsies, a les biòpsies proximals L23 i J17 la freqüència d'aneuploïdia va ser inferior al 5%, pels cromosomes 7, 8 i 11. A la regió K18, corresponent a la regió on prèviament hi havia hagut un tumor, també es va observar que pels cromosomes 7 i 11 la freqüència d'aneuploïdia va ser inferior al 5%. Les alteracions pels cromosomes 1, 7, 8, 9 i 17 en aquesta peça de cistectomia no van arribar al 20% en cap de les biòpsies. En la meitat de les biòpsies analitzades, les alteracions pel cromosoma 11 van ser inferior al 5%.



Pels cromosomes 1, 7, 8 i 11 el percentatge més alt d'alteracions es va observar a la biòpsia L21, mentre que pels cromosomes 9 i 17 es va trobar a la biòpsia L17. Ambdues biòpsies corresponen a la regió ulcerativa on prèviament hi havia hagut un tumor. Aquestes alteracions cromosòmiques eren principalment monosomies, tal i com es pot observar en la figura 4.3.9 en color blau.



**Figura 4.3.9.** Distribució de les aneuploidies per cada cromosoma en funció de la biòpsia en la peça de cistectomia 2. En verd, nuclis normals (N); en blau, monosomies (M); i en vermell, les polisomies (P)

## Discussió

Novament, la tècnica de FISH va resultar ser una tècnica molt sensible i de gran utilitat per detectar aneuploidies a la mucosa urotelial de les dues bufetes. Per tal de poder realitzar aquestes hibridacions, es va haver de posar a punt la tècnica d'empremta en un teixit com l'uroteli degut a que els protocols descrits mitjançant formaldehid o formaldehid combinat amb calor sec no van ser efectius en el cas de les biòpsies de bufeta.

L'aplicació de la tècnica de FISH en empremtes de teixit ens ha permès analitzar l'heterogeneïtat present en el tumor i en diferents àrees de l'uroteli, sent aquesta heterogeneïtat la millor aproximació per detectar inestabilitat en aquestes regions. Cal destacar que l'estudi en empremtes de teixit ens permet detectar les alteracions presents sense interferències. En aquest sentit, les tècniques de cultiu podrien afectar la selecció de determinades alteracions davant d'altres, tal i com s'evidencia en un estudi sobre la pèrdua del cromosoma Y en càncer de pròstata, que va demostrar que l'aneuploidia d'aquest cromosoma augmenta quan es detecta a partir de tècniques de FISH en cèl·lules en cultiu que quan es realitza a partir d'empremtes de teixit (Nadal et al. 2005).

Mitjançant les empremtes de teixit es van poder analitzar diferents àrees d'una mateixa bufeta, amb la finalitat que gran part de la mucosa urotelial estigués representada en aquesta anàlisi. Es varen estudiar les aneuploidies dels cromosomes més freqüentment implicats en la carcinogènesi de la bufeta (1, 7, 8, 9, 11 i 17).

### Peça de cistectomia 1

Tenint en compte totes les regions analitzades d'aquesta peça de cistectomia, les alteracions observades per les parelles de cromosomes 1 - 11, 17 - 9 i 8 - 7 van ser superiors al 25%, suggerint que es tractava d'un uroteli amb inestabilitat.

Les alteracions del cromosoma 1 representen un esdeveniment primerenc en la carcinogènesi del BC. Aquestes alteracions mai es troben com a única alteració en el BC, sinó que normalment van acompanyades de pèrdues del cromosoma 9 o d'alteracions en el cromosoma 11. Guanys del braç llarg del cromosoma 1 s'han descrit més freqüentment en tumors T1 que Ta, d'aquí que també es relacionin amb la progressió tumoral (Fadi-Elmula 2005). El fet de trobar alteracions, principalment

polisomies del cromosoma 1, en la gran majoria de les biòpsies i que en la regió distal 21N es trobi en un percentatge similar a la regió tumoral, recolza el paper primerenc del cromosoma 1 en la carcinogènesi de bufeta. Sandberg i Berger (1994). troben alteracions numèriques d'aquest cromosoma en tots els graus i estadis

D'acord amb la bibliografia, el fet de trobar alteracions del cromosoma 11, principalment polisomies, en la majoria de les biòpsies recolza que les alteracions detectades en el cromosoma 11 van lligades amb les alteracions observades en el cromosoma 1. Fet que també ve demostrat perquè en la biòpsia distal 21N també es localitzen alteracions en un percentatge similar al de les biòpsies de la regió tumoral. Aquests resultats donen suport a estudis previs que suggereixen que els guanys del cromosoma 11 estan relacionats amb una poliploidització de les cèl·lules tumorals (Hopman et al. 1991).

Tot i la pèrdua del cromosoma 9 és l'alteració més comuna en el BC (Knowles i Hurst 2015), en el present estudi es mostra que a la regió tumoral i proximal es troben principalment guanys o polisomies, de la mateixa manera que a la regió distal 21N. En la resta de biòpsies distals es troben tant guanys com pèrdues. Les alteracions d'aquest cromosoma afecten a un 20% dels nuclis en el conjunt de les mostres analitzades, tant normals com tumorals, però la presència de polisomies incrementa de forma notable a la regió tumoral. De manera que probablement aquests guanys també estiguin relacionats amb una poliploidització de les cèl·lules tumorals, com el que s'està observant pels cromosomes 1 i 11.

En un estudi previ realitzat en diferents graus tumorals, es va observar que la polisomia del cromosoma 17 detectada per FISH es trobava en el 100% dels tumors de grau III (G3) (Simonetti et al. 2009).

El cromosoma 8 també és un cromosoma freqüentment implicat en la carcinogènesi de la bufeta. La implicació d'aquest cromosoma en el BC sol ser en forma de pèrdues de 8p i guanys de 8q. Recentment, s'han identificat amplicons a 8p12-p11, i concretament en un estudi previ es detecten en tumors T1G3 guanys a 8p en un 18% i guanys a 8q en un 29% dels tumors analitzats (Hurst et al. 2012). En el present estudi, s'observen polisomies d'aquest cromosoma concentrades principalment en la regió tumoral amb uns valors que arriben fins al 80% a la regió 24K on s'observa un clon majoritari amb trisomia 8. Els guanys de 8q es relacionen amb un fenotip agressiu (Knowles i Hurst 2015).

Finalment, la trisomia del cromosoma 7 és també una anomalia freqüent en el BC, inclús s'ha descrit com a única anomalia en alguns casos (Berrozpe et al. 1990; Fadl-Elmula 2005). El seu guany també es relaciona amb el grau tumoral suggerint que és un aconeteixement tardà (Cheng et al. 2011). En el present estudi les alteracions del cromosoma 7 es van concentrar també a la regió tumoral, exceptuant la biòpsia 24K.

Per tant, el fet que en una regió de la bufeta es trobin polisomies dels cromosomes 7 i 8 es podria relacionar amb la presència de tumor. Alteracions en altres regions de la mucosa urotelial pels cromosomes implicats en la fase primerenca de la carcinogènesi vesical suggereix que aquesta mucosa està alterada. És a dir, els resultats obtinguts de l'anàlisi de les biòpsies de la peça de cistectomia 1 suggereix la presència d'un epiteli cromosòmicament inestable, ja que es van trobar alteracions no únicament en regions identificades com a tumorals o en les regions adjacents catalogades com a proximals, sinó també en regions macroscòpicament identificades com a "normals", distals en aquest estudi. A més, quan s'analitzava la dispersió de les alteracions, també es va observar una gran heterogeneïtat, no únicament en la regió tumoral o proximal, sinó també en la regió distal.

Cal destacar que a la regió distal, hi ha una mostra que presenta una freqüència d'alteracions superior a la resta de les biòpsies distals, la 21N. L'anatomia patològica de la cistectomia va identificar un CIS localitzat en la paret posterior de la bufeta. Creiem que aquesta lesió correspon a la biòpsia 21N, per la seva localització i per freqüència d'alteracions observades.

Quan es comparen les diferents regions analitzades, es pot observar pel que fa al percentatge de nuclis alterats, hi ha una similitud entre les regions de mucosa aparentment normal 20J, 18K, 20M, 21J i la regió tumoral 23L. Tanmateix s'observa similitud entre les regions tumorals 23J, 22K, 24K, i el probable CIS 21N, i la regió proximal morfològicament normal 22I. De totes aquestes, la regió més alterada és la 23J.

Referent a la relació monosomia/polisomia, s'observa que tenen freqüències més o menys similars en les regions no tumorals però les polisomies incrementen de forma important en les àrees tumorals i en el CIS 21N. Aquest fenomen és particularment rellevant pel cromosoma 9 en què les monosomies/polisomies són semblants excepte en l'àrea tumoral i el CIS on incrementa la polisomia.

En el seu conjunt, aquests resultats recolzarien el model de Knwoles and Hurst (2015) segons el qual a l'uroteli, a mesura que ens acostem a l'àrea tumoral, incrementaria el nombre d'alteracions de manera seqüencial.

#### Peça de cistectomia 2

A la peça de cistectomia 2, les alteracions no van superar el 18% per les parelles de cromosomes 1 – 11, 9 - 17 i 7 - 8. Es va observar una certa tendència a incrementar la freqüència d'aquestes alteracions en la regió ulcerativa on prèviament hi havia hagut un tumor T2G3, el qual no va recidivar. En aquest sentit cal destacar que es va realitzar una CGH convencional en aquesta regió la qual va donar negatiu per la presència de desequilibris.

Quan es comparen les diferents regions analitzades, es pot observar que dues regions allunyades (J17 i L23) presenten similitud pel què fa al percentatge d'alteracions amb l'única excepció que L23 presenta predominança de guanys del cromosoma 9 mentre que J17 presenta pèrdues d'aquest cromosoma. Les regions de l'àrea ulcerativa K18, K20, K22 i la regió proximal M20 també presenten similituds entre elles. Finalment, les regions L17 i L21 són semblants pel què fa a les alteracions dels cromosomes 7, 8, 9 i 17 però no pels cromosomes 1 i 11, que són molt més freqüents a la regió L21 (38% *versus* 14%).

Aquests resultats suggereixen que a partir d'un uroteli lleugerament inestable i una repoblació de la zona on prèviament hi havia hagut el tumor, les cèl·lules urotelials presenten poques alteracions, entre elles la monosomia del cromosoma 9, concretament, a la biòpsia L21. No obstant, si s'analitzaven acuradament les alteracions observades, pels cromosomes 7, 8 i 11, hi havia regions on quasi no es detectaven alteracions (< 5%). El cromosoma 9 sí que es va trobar alterat en les dues regions analitzades d'aquesta bufeta ( $\geq 5\%$ ). A més, si s'analitzava el tipus d'aneuploïdia, es va observar que en quasi tots els cromosomes analitzats predominava la monosomia (figura 4.3.9).

**En resum**, quan es comparen les dues peces de cistectomia, a la peça 1 les dades suggereixen que es tracta d'una mucosa inestable, fet que ve recolzat per la presència d'un CIS a la paret posterior, així com pel fet que és un tumor que ha recidivat tres mesos després de les RTUs. A més s'observa una predominança de les polisomies

que incrementa en l'àrea tumoral i en el CIS. Mentre que a la peça de cistectomia 2, que no mostra recidiva, la inestabilitat i heterogeneïtat són més baixes, amb una predominança de les monosomies i pèrdua del cromosoma 9 en pràcticament totes les regions analitzades.



## **5. DISCUSSIÓ**





La forma en què les mutacions s'acumulen a les cèl·lules normals és central per entendre el desenvolupament del càncer i és, per altra banda, un fenomen poc conegut. Shao i col·laboradors (2004) van suggerir que la inestabilitat genòmica present en la cèl·lula tumoral també està present d'una forma similar en els diferents tipus cel·lulars d'un mateix individu. Aquesta inestabilitat genòmica es pot manifestar a través de l'expressió dels llocs cromosòmics fràgils.

Per altra banda la inestabilitat genòmica es pot també manifestar en forma de múltiples alteracions cromosòmiques numèriques i/o estructurals. Diversos autors han proposat que es pot detectar inestabilitat cromosòmica en limfòcits de sang perifèrica d'individus afectats de càncer i que a més, aquesta inestabilitat podria ser un reflex de la trobada en el tumor (Pathak et al. 1991; Dave et al. 1993; Dotan et al. 2000; Shao et al. 2004).

Per tal d'estudiar l'expressió de CFS com a indicador d'inestabilitat cromosòmica constitucional i la seva possible relació amb predisposició al càncer, es va portar a terme un estudi en limfòcits de pacients afectats de càncer de bufeta i d'individus control. En la mateixa sèrie d'individus, sota les mateixes condicions de cultiu, es va analitzar la presència d'alteracions en el nombre de còpies afectant a 9p21 i *CCND1*.

Del nostre estudi es desprèn que no hi ha diferències entre pacients i individus control en quant a l'expressió dels CFS ni tampoc respecte a les alteracions a 9p21 i *CCND1*. Aquests resultats contrasten amb els d'altres autors que trobaven una alta expressió de fragilitat en pacients afectats de diferents tipus de tumors (Tunca et al. 2002; Dhillon et al. 2003) i que les alteracions en 9p21 i *CCND1* eren significativament superiors en pacients afectats de càncer de bufeta que en controls (Shao et al. 2004).

Estudis de freqüència de CNVs somàtics en PBLs de pacients afectats de BC i individus control, procedents de la mateixa sèrie SBC/EPICURO, tampoc van trobar diferències entre ambdós grups (Rodríguez-Santiago et al. 2010). A part de la presència d'alteracions en PBLs de pacients afectats de BC, també van trobar delecions en 9q i 11q, UPD 9p i 11q, i trisomia/polisomia 9 en individus control, suggerint l'existència d'un mosaïcisme somàtic clonal que estaria present en un 1,7% de la població adulta sense conseqüències fenotípiques. Posteriorment s'ha mostrat que la freqüència de mosaïcisme incrementava amb l'edat (Jacobs et al. 2012).

Els nostres resultats coincideixen amb els d'aquests autors en el que fa referència a que: a) no trobem diferències entre pacients i individus control; b) són individus d'edat avançada; i c) es troba afectat el cromosoma 9 de forma destacable. Cal tenir en

compte que les alteracions presents en el nostre estudi poden haver estat induïdes per l'afidicolina i que més aviat observem inestabilitat en els loci estudiats que no pas mosaïcisme. De totes maneres, no podem descartar el fet que les regions 9p21 i 11q13 presentin una inestabilitat constitucional que incrementi amb l'edat i que, en un percentatge baix de casos, es faci clonal tant en pacients com en controls. El fet que en el locus 9p21 predominin les pèrdues i en el locus de *CCND1* predominin els guanys corroboraria aquesta hipòtesi.

En un estudi de mosaïcisme somàtic, O'Huallachain i col·laboradors (2012) van observar una variabilitat en la freqüència de CNVs entre diferents teixits del mateix individu que, segons aquests autors, seria indicativa que aquells canvis que confereixen una avantatge proliferativa serien seleccionats a favor. Aquest fet, estaria d'acord amb els nostres resultats, on els CNVs induïts per l'afidicolina podrien ser tant guanys com pèrdues però hi ha hagut una selecció a favor de la pèrdua de 9p21 i del guany de *CCND1* ja que ambdues alteracions confereixen una avantatge proliferativa als limfòcits. A més, cal destacar que en l'estudi portat a terme per Rodríguez-Santiago i col·laboradors (2010), alguns individus presenten alteracions complexes que afecten regions cromosòmiques adjacents o combinacions de CNVs i UPDs que apareixen en diferents graus de mosaïcisme en un mateix individu. Fet que recolza un esdeveniment inicial d'inestabilitat.

L'expressió dels CFS en la nostra sèrie és independent de l'hàbit fumador per la qual cosa, els nostres resultats descartarien en principi un efecte dels carcinògens del tabac en l'expressió dels CFS en limfòcits de sang perifèrica. Únicament s'ha detectat un efecte del tabac sobre el locus *CCND1*. Fins al moment, dels dos loci estudiats en el present treball, solament el 9p21 s'havia proposat com una diana dels efectes carcinogènics del fum del tabac (Hazra et al. 2004).

Únicament s'ha observat que els trencaments de cromàtide són significativament superiors en els pacients, la qual cosa indica un increment de l'aparició de trencaments en la fase S que no són ben reparats en aquest grup i que es podria considerar com un índex d'inestabilitat cromosòmica. Un increment de trencaments de cromàtide també s'ha observat en un estudi de cèl·lules deficientes en *BRCA1* sotmeses a estrès oxidatiu (Fridlich et al. 2015). És ben conegut que quan els intermediaris de reparació de trencaments de cadena simple (SSB) persisteixen durant la fase S, els SSB es poden convertir en DSB que es reparen per recombinació homòloga (Pfeiffer 2000). Segons Fridlich i col·laboradors (2015), en cèl·lules deficientes en *BRCA1*, els DSB formats a la fase S no poden ser reparats pel

mecanisme de reparació per recombinació homòloga (HRR) essent el mecanisme de reparació per unió dels extrems no homòloga (NHEJ) l'única opció alternativa i que com a conseqüència, genera trencaments de cromàtide. Tenint en compte que BRCA1 està implicada en el manteniment de l'estabilitat dels CFS, l'increment significatiu dels trencaments de cromàtide en els pacients del present estudi podria ser indicatiu d'alguna alteració en aquests mecanismes de reparació.

Dins dels nostres resultats, cal destacar un subgrup de quatre pacients amb una expressió alta de fragilitat i la presència d'alteracions cromosòmiques en mosaic. Alguns d'aquests pacients presentaven una freqüència alta d'alteracions en *CCND1* i 9p21. El pacient nº 1 presentava a més un anell afectant al cromosoma 9 i havia sofert un altre tumor primari. La presència d'alta fragilitat i alteracions cromosòmiques s'ha descrit en pacients amb més d'un tumor primari (Ribas et al. 1999).

Dels quatre pacients que presentaven una expressió de fragilitat més alta (de 5,36 lesions/cèl·lula a 7,56 lesions/cèl·lula) un presentava un alt percentatge de nuclis amb alteracions a 9p21 (11,31% de nuclis alterats) i un altre, un 12,34% de nuclis amb alteracions a *CCND1*. Pel que fa al grup de controls, cal destacar que els quatre individus que presentaven fragilitat més alta (de 2,65 a 4/70 lesions/cèl·lula) presentaven també les freqüències més elevades d'alteracions a *CCND1* i dos d'aquests, presentaven a més els percentatges més elevats d'alteracions a 9p21. Aquesta relació entre CFS i alteracions en el nombre de còpies confirma que ambdós fenòmens poden ser diferents manifestacions d'un mateix mecanisme generador d'instabilitat (Wilson et al. 2015).

En aquest sentit, estudis experimentals han demostrat que l'estrès replicatiu produït per l'afidicolina, la hidroximetilurea o baixes dosis de radiacions ionitzants podria produir una inducció parcial de les CNVs no recurrents, tot i que el mecanisme molecular que indueix aquestes variacions amb la instabilitat dels CFS encara no es coneix (Durkin et al. 2008; Arlt et al. 2009; Arlt et al. 2012; Arlt et al. 2014). Recentment, Wilson i col·laboradors (2015) han demostrat, en una línia cel·lular humana, que punts calents per CNVs i CFS ocorren als mateixos loci. De forma interessant la regió 9p21 és un dels punts calents per la formació de CNVs sota condicions d'estrès replicatiu.

Mentre que els mecanismes de formació dels CNVs recurrents són ben coneguts i s'originen generalment durant la meiosi a partir d'una recombinació homòloga no al·lèlica entre duplicacions segmentàries, es coneix poc sobre l'origen dels CNVs no recurrents. De forma interessant, es disposa de dades que indiquen un origen mitòtic. En aquest sentit, els CNVs detectats en estudis de mosaïcisme somàtic està clar que

tenen un origen mitòtic per la qual cosa s'ha suggerit que s'originarien per un mecanisme semblant al de la inducció de CFS i CNVs per part de l'afidicolina (Mkrtychyan et al. 2010). El fet que sota condicions d'estrès replicatiu induïdes per baixes dosis d'afidicolina donin lloc a CNVs no recurrents apunta vers un origen per errors en la replicació (Durkin et al. 2008; Arlt et al. 2009; Arlt, Wilson, and Glover 2012; Arlt et al. 2014). Segons Arlt i col·laboradors (2012), un estancament de la forqueta de replicació seria responsable d'aquests CNVs. A més, qualsevol agent que provoqués un estrès replicatiu podria ser un factor de risc per l'aparició de CNVs. De forma interessant, els CNVs generats per estrès replicatiu mimetitzen als CNVs associats a càncer i als constitucionals o detectats en mosaïcisme somàtic. Els nostres resultats, demostren que l'estrès replicatiu induït per APH en limfòcits de sang perifèrica té la capacitat d'induir CNVs afectant a loci freqüentment implicats en càncer de bufeta tant en pacients com en individus control.

Finalment, i donat que en la nostra sèrie tant els pacients com els controls presentaven una edat avançada podríem confirmar que l'envelliment podria tenir un efecte sobre la pèrdua d'integritat del genoma. Com a suport d'aquest fet, podem considerar que tant els controls com els pacients estudiats en el present treball tenien un promig d'edat superior als 69 anys i en tots ells l'expressió de CFS era molt superior a la d'una sèrie control amb edat promig de 24 anys estudiada en el nostre laboratori (Martín 2006). De la mateixa manera, el fet que les alteracions a 9p21 i *CCND1* s'observessin tant en pacients com en controls podria estar relacionada amb l'edat avançada d'ambdós grups, és a dir, per un efecte de l'edat. En aquest sentit els nostres resultats coincidirien en part amb els d'altres autors, que utilitzant tècniques d'arrays d'SNPs, detecten la presència de mosaïcisme somàtic relacionat amb l'edat en controls sans (Jacobs et al. 2012).

Els estudis sobre la càrrega de mutacions somàtiques en cèl·lules normals s'han centrat principalment en limfòcits de sang perifèrica on s'ha vist que les alteracions es van acumulant lentament a mesura que incrementa l'edat. Per veure el comportament de les alteracions en teixits no hematològics, la pell pot ser un bon model i en el cas d'òrgans, la bufeta es podria considerar un model ideal en relació als tumors urotelials donat que les cistectomies radicals ens permeten analitzar la totalitat de l'uroteli. Per aquest motiu ens varem proposar analitzar la inestabilitat en forma d'aneuploidies dels cromosomes 1, 7, 8, 9, 11 i 17 en l'uroteli de dues cistectomies radicals humanes per esbrinar si de forma generalitzada es produeixen alteracions cromosòmiques

numèriques que puguin predisposar a l'aparició de tumors sincrònics i metacrònics a partir d'un uroteli inestable.

L'elevada freqüència de multifocalitat en forma de tumors sincrònics i metacrònics suggereix que el càncer de bufeta és una malaltia que afecta a l'uroteli, donant suport al concepte d'un efecte de camp neoplàstic que promouria la transformació independent de múltiples cèl·lules urotelials. D'acord amb aquesta hipòtesi caldria esperar que diferents tumors d'un mateix pacient no presentessin una relació clonal. Per tant, els primers estudis es van centrar en l'anàlisi de les alteracions presents en els tumors.

Estudis de clonalitat en base al patró d'inactivació del cromosoma X, van mostrar resultats contradictoris: mentre que Sidransky i col·laboradors (1992) van detectar el mateix patró d'inactivació en diferents tumors sincrònics, Cheng i col·laboradors (2002) van mostrar que alguns dels MIBC apareixen a partir de cèl·lules independents donant suport a l'efecte de camp per explicar la carcinogènesi de la bufeta. Altres estudis portats a terme en diferents sèries de pacients han suggerit que els tumors de bufeta multifocals poden ser monoclonals o oligoclonals. L'estudi de mutacions del gen *TP53* en pacients amb BC que havien estat exposats a amines aromàtiques va mostrar que les mutacions eren diferents en tumors sincrònics i metacrònics (Yasunaga et al. 1997). Mutacions diferents del gen *TP53* també es van detectar en tumors multifocals de pacients exposats a radiacions per l'accident de Chernobyl, indicant que es poden produir múltiples esdeveniments de transformació a l'uroteli després d'una forta exposició a carcinògens i donant suport a l'efecte de camp (Yamamoto et al. 1999).

Estudis més recents combinant LOH, FISH i anàlisi de mutacions han mostrat resultats favorables a un origen monoclonal (Denzinger et al. 2006). D'acord amb aquests estudis es produiria una disseminació de cèl·lules tumorals que originaria els diferents tumors. Una revisió portada a terme per Habuchi (2005) també dóna suport a la hipòtesi d'un origen monoclonal dels tumors de bufeta multifocals. Estudis realitzats en el nostre laboratori mitjançant CGH convencional van mostrar que hi havia més similitud entre diferents tumors d'un mateix pacient que entre diferents regions d'un mateix tumor, evidenciant una heterogeneïtat intratumoral i suggerint un origen monoclonal pels tumors sincrònics (Prat et al. 2008).

Tal i com hem dit abans, per les seves característiques de multifocalitat, el BC es pot considerar com una malaltia de l'uroteli, tot i així els estudis abans esmentats es centraven en l'anàlisi dels tumors i es disposa de pocs estudis que analitzin la presència d'alteracions en la mucosa urotelial normal de pacients afectats de BC.

Les dades al respecte de què disposem a la literatura també mostren resultats conflictius. Un estudi realitzat per Junker i col·laboradors (2003), recolzava la teoria monoclonal degut a que no van trobar inestabilitat en la mucosa urotelial de pacients amb BC i, per tant, semblaria que la recurrència i la multifocalitat vindria donada per una disseminació intraluminal o migració intraepitelial. No obstant, estudis més recents semblen recolzar el concepte de camp degut a què sí que troben inestabilitat genètica en la mucosa macroscòpicament "normal" de pacients amb BC i en les lesions pre-malignes (CIS i displàsia) que sovint es localitzen distants al tumor invasiu, suggerint que l'uroteli és genèticament inestable (Cheng et al. 2011). Cianciulli i col·laboradors (2003) van detectar una estreta relació entre els tumors analitzats i la mucosa aparentment normal observant que el 60% de les biòpsies estudiades presentaven aneuploidia dels cromosomes 1, 7, 9 i 17 com a mínim en un dels cromosomes analitzats. Estudis posteriors del mateix grup, analitzant aneuploidies dels cromosomes 3, 7, 9 i 17 i delecions dels gens *RB1*, *TP53*, *HER-2* i 9p21, van posar en evidència una inestabilitat generalitzada en la totalitat de l'epiteli transicional i una estreta relació entre les alteracions del tumor i la mucosa adjacent (Gallucci et al. 2005).

La majoria d'aquests estudis es centraven en analitzar la presència o no d'alteracions en l'uroteli normal i comparar-les amb les del tumor per tal de detectar una relació clonal.

El disseny del nostre estudi, analitzant la presència d'aneuploidia, no permet fer una anàlisi de clonalitat, però a diferència dels estudis anteriors ens ha permès detectar alteracions en la mucosa i, a més, analitzar l'heterogeneïtat com a signe d'inestabilitat, especialment en la cistectomia 1, procedent d'un pacient en el què el tumor havia recidivat.

L'anàlisi de les aneuploidies dels cromosomes 1, 7, 8, 9, 11 i 17 en la cistectomia 1 va mostrar una elevada heterogeneïtat en quant al nombre de cromosomes ja que el fet d'estudiar-los per parelles ens permetia diferenciar nuclis amb diferent representació de cada parella de cromosomes. El què varem observar en aquesta cistectomia era que el percentatge d'alteracions en algunes regions del tumor era similar a l'observat en regions de la mucosa. Hi havia en general un predomini de les polisomies sobre les monosomies i aquest incrementava en els tumors.

És ben sabut que la pèrdua total o parcial del cromosoma 9 és l'alteració més comuna del BC, revisat per Knowles i Hurst (2015). A la peça de cistectomia 1, les pèrdues del cromosoma 9 van ser equivalents als guanys d'aquest cromosoma en les regions distals al tumor i progressivament, a mesura que ens acostem a la regió tumoral i a la regió del CIS, s'incrementaven els guanys per sobre de les pèrdues. Aquest resultat

concordaria amb les dades obtingudes per Stadler i col·laboradors (2001) que van observar que els guanys del cromosoma 9 estan associats a la progressió del tumor i a CIS, essent infreqüents en tumors Ta. Per altra banda, els nostres resultats suggereixen que les polisomies dels cromosomes 7 i especialment el 8 podrien ser més indicatives de la presència de tumor.

En la cistectomia 2, sense indicis de tumor, es va observar un predomini de monosomies sobre les polisomies dels cromosomes analitzats i una heterogeneïtat notablement inferior a l'observada en la cistectomia 1. A més, es va observar que regions allunyades de l'uroteli normal presentaven percentatges similars d'alteracions, la qual cosa podria ser indicativa d'una migració de cèl·lules del tumor primari prèviament extirpat. En aquesta cistectomia, la monosomia 9 es va observar en totes les regions urotelials analitzades excepte en una, on predominaven els guanys.

En els dos casos també es va observar que l'epiteli urotelial es feia més inestable a mesura que s'aproximava al tumor o a la regió ulcerativa on prèviament hi havia hagut un tumor.

Els nostres resultats confirmen la presència d'una inestabilitat generalitzada en tot l'uroteli de la bufeta d'un pacient que, després d'haver extirpat un tumor, presentava un altre tumor i un CIS. En l'uroteli de la bufeta d'un altre pacient que no mostrava indicis de tumor presentava un uroteli menys inestable. Aquests resultats confirmen per una banda la teoria de cancerització de camp però també posen en evidència la variabilitat interindividual en relació a la inestabilitat de les cèl·lules de l'uroteli aparentment normals, la qual cosa explicaria les discrepàncies observades en estudis anteriors.

En un estudi de seqüenciació portat a terme per Martincorena i col·laboradors (2015) en cèl·lules normals de la pell es detecten mutacions del tipus *driver* entre un 18 i un 32% de les cèl·lules normals. Segons aquests autors, la pell envellida exposada al sol és un mosaic de milers de clons en evolució amb al voltant d'una quarta part de les cèl·lules portadores de mutacions oncogèniques i que mantenen les funcions fisiològiques normals de l'epidermis. Els nostres resultats, encara que referents a aneuploidies en l'uroteli estarien d'acord amb aquesta afirmació.





## **6. CONCLUSIONS**



## CONCLUSIONS

1. La inestabilitat o expressió dels llocs fràgils en limfòcits d'una sèrie de pacients afectats de càncer de bufeta no difereix estadísticament de la trobada en una sèrie control aparellada per edat.
2. Únicament els trencaments de cromàtide són significativament superiors en el grup de pacients.
3. L'expressió dels CFS és independent de l'hàbit fumador per la qual cosa, els nostres resultats descartarien un efecte dels carcinògens del tabac en l'expressió dels CFS en limfòcits de sang perifèrica.
4. L'estrès replicatiu induït per l'afidicolina en limfòcits de sang perifèrica, genera delecions i duplicacions dels loci 9p21 i *CCND1* i en menor grau aneuploidies dels cromosomes 9 i 11 en pacients i controls.
5. Donat que les alteracions d'aquests loci es manifesten en forma de guanys o pèrdues en un mateix individu, podem considerar que les alteracions de 9p21 i *CCND1* detectades són reflex d'una inestabilitat en aquestes regions.
6. L'absència de diferències entre pacients i controls en quant a l'expressió dels CFS i d'alteracions a 9p21 i *CCND1* podria atribuir-se a l'edat avançada dels dos grups, confirmant que l'envelliment podria tenir un efecte sobre la pèrdua d'integritat del genoma.
7. Un subgrup de pacients es caracteritza per una expressió alta de fragilitat, superior a cinc lesions per cèl·lula, i per la presència, en alguns d'ells, d'alteracions cromosòmiques afectant a 9p21 i *CCND1*.
8. Els resultats demostren que en limfòcits de sang perifèrica, la inestabilitat dels llocs fràgils pot generar CNVs afectant a loci que normalment estan alterats en càncer i més concretament en tumors de bufeta, probablement aquesta inestabilitat s'estendria a altres loci no analitzats en el present estudi.

9. En comparació a altres estudis d'alteracions en mosaic afectant al cromosoma 9 i 9p21 en individus control, no podem descartar el fet que les regions 9p21 i 11q13 presentin una inestabilitat constitucional o una pèrdua d'integritat del genoma que incrementi amb l'edat i que, en un percentatge baix de casos, es faci clonal, tant en pacients com en individus control.
  
10. L'anàlisi d'una cistectomia amb la presència d'una recidiva posa en evidència una inestabilitat numèrica generalitzada a l'uroteli aparentment "normal" i una tendència a la poliploidització en les cèl·lules tumorals.
  
11. L'anàlisi d'una cistectomia sense la presència d'una recidiva posa en evidència una inestabilitat numèrica a l'uroteli inferior a l'anterior i amb predomini de les monosomies.
  
12. Els resultats obtinguts donen suport a l'existència d'una variabilitat interindividual de les alteracions presents a l'uroteli.
  
13. La inestabilitat observada a l'uroteli dóna suport a la cancerització de camp, encara que no es pot descartar una migració de les cèl·lules tumorals.

## **7. BIBLIOGRAFIA**



- Aben KKH, Baglietto L, Baffoe-Bonnie A, Coebergh J-WW, Bailey-Wilson JE, Trink B, Verbeek ALM, Schoenberg MP, Alfred Witjes J, Kiemeneij LA. 2006. Segregation analysis of urothelial cell carcinoma. *Eur. J. Cancer* 42:1428-33.
- Aben KKH, Witjes JA, Schoenberg MP, Hulsbergen-van de Kaa C, Verbeek ALM, Kiemeneij LA. 2002. Familial aggregation of urothelial cell carcinoma. *Int. J. Cancer* 98:274-8.
- Aben, K. K., Macville, M. V., Smeets, D. F., Schoenberg, M. P., Witjes, J. A., & Kiemeneij LA. 2001. Absence of karyotype abnormalities in patients with familial urothelial cell carcinoma. *Urology* 57:266-269.
- Abol-Enein H, Kava BR, Carmack AJK. 2007. Nonurothelial cancer of the bladder. *Urology* 69:93-104.
- Aboukassim TO, LaRue H, Lemieux P, Rousseau F, Fradet Y. 2003. Alteration of the PATCHED locus in superficial bladder cancer. *Oncogene* 22:2967-71.
- Ahmad I, Morton JP, Singh LB, Radulescu SM, Ridgway RA, Patel S, Woodgett J, Winton DJ, Taketo MM, Wu X-R, et al. 2011.  $\beta$ -Catenin activation synergizes with PTEN loss to cause bladder cancer formation. *Oncogene* 30:178-89.
- Ainsworth P, Chakraborty P, Weksberg R. 1997. Example of somatic mosaicism in a series of de novo neurofibromatosis type 1 cases due to a maternally derived deletion. *Hum. Mutat.* 9:452.
- Amary MF, Damato S, Halai D, Eskandarpour M, Berisha F, Bonar F, McCarthy S, Fantin VR, Straley KS, Lobo S, et al. 2011. Ollier disease and Maffucci syndrome are caused by somatic mosaic mutations of IDH1 and IDH2. *Nat. Genet.* 43:1262-5.
- Arlt MF, Glover TW. 2010. Inhibition of topoisomerase I prevents chromosome breakage at common fragile sites. *DNA Repair (Amst)*. 9:678-89.
- Arlt MF, Mulle JG, Schaibley VM, Ragland RL, Durkin SG, Warren ST, Glover TW. 2009. Replication stress induces genome-wide copy number changes in human cells that resemble polymorphic and pathogenic variants. *Am. J. Hum. Genet.* 84:339-50.
- Arlt MF, Rajendran S, Birkeland SR, Wilson TE, Glover TW. 2014. Copy number variants are produced in response to low-dose ionizing radiation in cultured cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 55:103-13.
- Arlt MF, Wilson TE, Glover TW. 2012. Replication stress and mechanisms of CNV formation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 22:204-10.
- Auerbach O, Garfinkel L. 1989. Histologic changes in the urinary bladder in relation to cigarette smoking and use of artificial sweeteners. *Cancer* 64:983-987.
- Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, Shariat SF, van Rhijn BWG, Compérat E, Sylvester



- RJ, Kaasinen E, Böhle A, Palou Redorta J, et al. 2013. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. *Eur. Urol.* 64:639-53.
- Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R. 2013. Guidelines on non-muscle invasive bladder cancer (TaT1 and CIS). 2011.
- Balci A, Ekmekci A, Cetin R. 1999. The expression of common fragile sites in peripheral blood lymphocytes of breast and colorectal cancer patients with aphidicolin. *Tohoku J. Exp. Med.* 189:107-16.
- Barlow JH, Faryabi RB, Callén E, Wong N, Malhowski A, Chen HT, Gutierrez-Cruz G, Sun HW, McKinnon P, Wright G, et al. 2013. Identification of early replicating fragile sites that contribute to genome instability. *Cell* 152:620-632.
- Bartsch H, Nair U, Risch A, Rojas M, Wikman H, Alexandrov K. 2000. Genetic Polymorphism of CYP Genes, Alone or in Combination, as a Risk Modifier of Tobacco-related Cancers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9:3-28.
- Berrozpe G, Miró R, Caballin MR, Salvador J, Egozcue J. 1990. Trisomy 7 may be a primary change in noninvasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Genet. Cytogenet.* 50:9-14.
- Biesecker L, Spinner N. 2013. A genomic view of mosaicism and human disease. *Nat. Rev. Genet.*
- Bolt HM. 2014. Causation of human urothelial cancer: there are challenging new data! *Arch. Toxicol.* 88:1769-70.
- Bonassi S, Abbondandolo A, Camurri L, Dal Prá L, De Ferrari M, Degrossi F, Forni A, Lamberti L, Lando C, Padovani P. 1995. Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? Preliminary results of an Italian cohort study. *Cancer Genet. Cytogenet.* 79:133-5.
- Bonassi S, Hagmar L, Strömberg U, Montagud AH, Tinnerberg H, Forni A, Heikkilä P, Wanders S, Wilhardt P, Hansteen IL, et al. 2000. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *Cancer Res.* 60:1619-25.
- Bonassi S, Norppa H, Ceppi M, Strömberg U, Vermeulen R, Znaor A, Cebulska-Wasilewska A, Fabianova E, Fucic A, Gundy S, et al. 2008. Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: results from a pooled cohort study of 22 358 subjects in 11 countries. *Carcinogenesis* 29:1178-83.
- Borgerding M, Bodnar J and, Wingate D. 2000. The 1999 Massachusetts Benchmark

- Study—Final Report. A research study conducted after consultation with the Massachusetts Department of Public Health.
- Burger M, Catto JWF, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, Kassouf W, Kiemeny LA, La Vecchia C, Shariat S, et al. 2013. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur. Urol.* 63:234-41.
- Busch C, Algaba F. 2002. The WHO/ISUP 1998 and WHO 1999 systems for malignancy grading of bladder cancer. Scientific foundation and translation to one another and previous systems. *Virchows Arch.* 441:105-8.
- Cairns P, Mao L, Merlo A, Lee D. 1994. Rates of p16 (MTS1) mutations in primary tumors with 9p loss. *Sci. (washingt. , DC);(United States)* 265.
- Cann KL, Dellaire G. 2011. Heterochromatin and the DNA damage response: the need to relax. *Biochem. cell Biol.* 89:45-60.
- Casper AM, Durkin SG, Arlt MF, Glover TW. 2004. Chromosomal instability at common fragile sites in Seckel syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 75:654-60.
- Castano-Vinyals, G., D'errico, A., Malats, N., & Kogevinas M. 2004. Biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental air pollution. *Occup. Environmetal Med.* 61:e12-e12.
- Ceçener G, Egeli U, Taşdelen I, Tunca B, Duman H, Kizil A. 1998. Common fragile site expression and genetic predisposition to breast cancer. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 18:279-91.
- Cheng L, Gu J, Ulbright TM, MacLennan GT, Sweeney CJ, Zhang S, Sanchez K, Koch MO, Eble JN. 2002. Precise microdissection of human bladder carcinomas reveals divergent tumor subclones in the same tumor. *Cancer* 94:104-10.
- Cheng L, Zhang S, MacLennan GT, Williamson SR, Lopez-Beltran A, Montironi R. 2011. Bladder cancer: translating molecular genetic insights into clinical practice. *Hum. Pathol.* 42:455-81.
- Choi W, Porten S, Kim S, Willis D, Plimack ER, Hoffman-Censits J, Roth B, Cheng T, Tran M, Lee I-L, et al. 2014. Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell* 25:152-65.
- Cianciulli AM, Leonardo C, Guadagni F, Marzano R, Iori F, De Nunzio C, Franco G, Merola R, Laurenti C. 2003. Genetic instability in superficial bladder cancer and adjacent mucosa: an interphase cytogenetic study. *Hum. Pathol.* 34:214-21.
- Cohen SM, Garland EM, St John M, Okamura T, Smith RA. 1992. Acrolein initiates rat urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res.* 52:3577-81.
- Colombel M, Soloway M, Akaza H, Böhle A, Palou J, Buckley R, Lamm D, Brausi M, Witjes JA, Persad R. 2008. Epidemiology, Staging, Grading, and Risk

- Stratification of Bladder Cancer. *Eur. Urol. Suppl.* 7:618-626.
- Conlin LK, Thiel BD, Bonnemann CG, Medne L, Ernst LM, Zackai EH, Deardorff MA, Krantz ID, Hakonarson H, Spinner NB. 2010. Mechanisms of mosaicism, chimerism and uniparental disomy identified by single nucleotide polymorphism array analysis. *Hum. Mol. Genet.* 19:1263-1275.
- Copp HL, Chin JL, Conaway M, Theodorescu D. 2006. Prospective evaluation of the prognostic relevance of molecular staging for urothelial carcinoma. *Cancer* 107:60-66.
- Costet N, Villanueva C, Jaakkola J, Kogevinas M, Cantor K, King W, Lynch C, Nieuwenhuijsen M, Cordier S. 2011. Water disinfection by-products and bladder cancer: is there a European specificity? A pooled and meta-analysis of European case-control studies. *Occup. Environ. Med.*
- Crandall B. 1996. Incidence and significance of chromosome mosaicism involving an autosomal structural abnormality diagnosed prenatally through amniocentesis: a collaborative study. *Prenat Diagn* 16.
- Czerniak B, Li L, Chaturvedi V, Ro JY, Johnston DA, Hodges S, Benedict WF. 2000. Genetic modeling of human urinary bladder carcinogenesis. *Genes. Chromosomes Cancer* 27:392-402.
- Dahm P, Gschwend JE. 2003. Malignant Non-Urothelial Neoplasms of the Urinary Bladder: A Review. *Eur. Urol.* 44:672-681.
- Damrauer JS, Hoadley KA, Chism DD, Fan C, Tiganelli CJ, Wobker SE, Yeh JJ, Milowsky MI, Iyer G, Parker JS, et al. 2014. Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111:3110-5.
- Dave BJ, Hopwood VL, Hughes JI, Mellilo D, Jackson GL, Pathak S. 1993. Nonrandom chromosomal abnormalities in lymphocyte cultures of individuals with colorectal polyps and of asymptomatic relatives of patients with colorectal cancer or polyps. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2:587-91.
- Debatisse M, Le Tallec B, Letessier A, Dutrillaux B, Brison O. 2012. Common fragile sites: mechanisms of instability revisited. *Trends Genet.* 28:22-32.
- Denzinger S, Mohren K, Knuechel R, Wild PJ, Burger M, Wieland WF, Hartmann A, Stoehr R. 2006. Improved clonality analysis of multifocal bladder tumors by combination of histopathologic organ mapping, loss of heterozygosity, fluorescence in situ hybridization, and p53 analyses. *Hum. Pathol.* 37:143-51.
- Dhillon V, Husain S, Ray G. 2003. Expression of aphidicolin- induced fragile sites and their relationship between genetic susceptibility in breast cancer, ovarian cancer, and non- small- cell lung cancer. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 23:35-

- 45.
- Dillon LW, Pierce LCT, Lehman CE, Nikiforov YE, Wang Y-H. 2013. DNA topoisomerases participate in fragility of the oncogene RET. *PLoS One* 8:e75741.
- Dong C, Hemminki K. 2001. Modification of cancer risks in offspring by sibling and parental cancers from 2,112,616 nuclear families. *Int. J. Cancer* 92:144-50.
- Dor F. 1999. Validity of biomarkers in environmental health studies: the case of PAHs and benzene. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 29:129-168.
- Dörrenhaus A, Müller T, Roos PH. 2007. Increased CYP1A1 expression in human exfoliated urothelial cells of cigarette smokers compared to non-smokers. *Arch. Toxicol.* 81:19-25.
- Dotan ZA, Dotan A, Litmanovitch T, Ravia Y, Oniashvili N, Leibovitch I, Ramon J, Avivi L. 2000. Modification in the inherent mode of allelic replication in lymphocytes of patients suffering from renal cell carcinoma: a novel genetic alteration associated with malignancy. *Genes. Chromosomes Cancer* 27:270-7.
- Durkin SG, Glover TW. 2007. Chromosome fragile sites. *Annu. Rev. Genet.* 41:169-92.
- Durkin SG, Ragland RL, Arlt MF, Mülle JG, Warren ST, Glover TW. 2008. Replication stress induces tumor-like microdeletions in FHIT/FRA3B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:246-51.
- Eble J, Sauter G, Epstein J, Sesterhenn I. 2004. Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon IARC 90 109.
- Eriksen M, Mackay J, Schluger N. 2015. The tobacco atlas. 5th edn. Atlanta, GA: The American Cancer Society.
- Fadl-Elmula I. 2005. Chromosomal changes in uroepithelial carcinomas. *Cell Chromosome* 4:1.
- Fajkovic H, Halpern JA, Cha EK, Bahadori A, Chromecki TF, Karakiewicz PI, Breinl E, Merseburger AS, Shariat SF. 2011. Impact of gender on bladder cancer incidence, staging, and prognosis. *World J. Urol.* 29:457-63.
- Fan Y-S. 2002. *Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications (Methods in Molecular Biology)*: 9781617373008: Medicine & Health Science Books @ Amazon.com. Humana Press. 2002:411 páginas.
- Forsberg LA, Rasi C, Razzaghian HR, Pakalapati G, Waite L, Thilbeault KS, Ronowicz A, Wineinger NE, Tiwari HK, Boomsma D, et al. 2012. Age-related somatic structural changes in the nuclear genome of human blood cells. *Am. J. Hum. Genet.* 90:217-28.
- Franchitto A. 2013. Genome instability at common fragile sites: searching for the cause of their instability. *Biomed Res. Int.* 2013:730714.

- Fridlich R, Annamalai D, Roy R, Bernheim G, Powell SN. 2015a. BRCA1 and BRCA2 protect against oxidative DNA damage converted into double-strand breaks during DNA replication. *DNA Repair (Amst)*. 30:11-20.
- Frio TR, Lavoie J, Hamel N. 2010. Homozygous BUB1B mutation and susceptibility to gastrointestinal neoplasia. *N. Engl. J. Med.* 363:2628-2637.
- Gaisa NT, Graham TA, McDonald SAC, Cañadillas-Lopez S, Poulsom R, Heidenreich A, Jakse G, Tadrous PJ, Knuechel R, Wright NA. 2011. The human urothelium consists of multiple clonal units, each maintained by a stem cell. *J. Pathol.* 225:163-71.
- Gakis G, Witjes JA, Compérat E, Cowan NC, De Santis M, Leuret T, Ribal MJ, Sherif AM. 2013. EAU guidelines on primary urethral carcinoma. *Eur. Urol.* 64:823-830.
- Gallucci M, Guadagni F, Marzano R, Leonardo C, Merola R, Sentinelli S, Ruggeri EM, Cantiani R, Sperduti I, Lopez F de la I, et al. 2005. Status of the p53, p16, RB1, and HER-2 genes and chromosomes 3, 7, 9, and 17 in advanced bladder cancer: correlation with adjacent mucosa and pathological parameters. *J. Clin. Pathol.* 58:367-71.
- Glover T, Berger C, Coyle J, Echo B. 1984. DNA polymerase  $\alpha$  inhibition by aphidicolin induces gaps and breaks at common fragile sites in human chromosomes. *Hum. Genet.* 67:136-142.
- Goldgar DE, Easton DF, Cannon-Albright LA, Skolnick MH. 1994. Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. *J. Natl. Cancer Inst.* 86:1600-1608.
- Gottlieb B, Beitel L, Trifiro M. 2001. Somatic mosaicism and variable expressivity. *TRENDS Genet.* 17:79-82.
- Grignon DJ, Ro JY, Ayala AG, Johnson DE, Ordóñez NG. 1991. Primary adenocarcinoma of the urinary bladder. A clinicopathologic analysis of 72 cases. *Cancer* 67:2165-72.
- Grivas PD, Melas M, Papavassiliou AG. 2015. The biological complexity of urothelial carcinoma: Insights into carcinogenesis, targets and biomarkers of response to therapeutic approaches. *Semin. Cancer Biol.* 35:125-32.
- Guo G, Sun X, Chen C, Wu S, Huang P, Li Z, Dean M, Huang Y, Jia W, Zhou Q, et al. 2013. Whole-genome and whole-exome sequencing of bladder cancer identifies frequent alterations in genes involved in sister chromatid cohesion and segregation. *Nat. Genet.* 45:1459-63.
- Guttenbach M, Koschorz B. 1995. Sex chromosome loss and aging: in situ hybridization studies on human interphase nuclei. *Am. J. Hum. Genet.* 57:1143.

- Güven GS, Hacıhanefioğlu S, Cenani A, Hacıhanefioğlu S, Cenani A. 1999. Expression of aphidicolin, FUDR and caffeine-induced fragile sites in lymphocytes of healthy Turkish individuals. *Genetica* 105:109-16.
- Habuchi T. 2005. Origin of multifocal carcinomas of the bladder and upper urinary tract: Molecular analysis and clinical implications. *Int. J. Urol.* 12:709-716.
- Habuchi T, Luscombe M, Elder PA, Knowles MA. 1998. Structure and methylation-based silencing of a gene (DBCCR1) within a candidate bladder cancer tumor suppressor region at 9q32-q33. *Genomics* 48:277-88.
- Hafner C, Toll A, Real F. 2011. HRAS mutation mosaicism causing urothelial cancer and epidermal nevus. *N. Engl. J. Med.* 365:1940-1942.
- Hagmar L, Brøgger A, Hansteen IL, Heim S, Högstedt B, Knudsen L, Lambert B, Linnainmaa K, Mitelman F, Nordenson I. 1994. Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res.* 54:2919-22.
- Hanahan D, Weinberg R a. 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144:646-674.
- Hartmann A, Moser K, Kriegmair M. 1999. Frequent genetic alterations in simple urothelial hyperplasias of the bladder in patients with papillary urothelial carcinoma. *Am. J. Pathol.* 154:721-727.
- Hazra A, Grossman HB, Zhu Y, Luo S, Spitz MR, Wu X. 2004. Benzo[a]pyrene diol epoxide-induced 9p21 aberrations associated with genetic predisposition to bladder cancer. *Genes. Chromosomes Cancer* 41:330-8.
- Heim S, Mitelman F. 2009. Nonrandom chromosome abnormalities in cancer—an overview. *Cancer Cytogenet.:*25-44.
- Heim Sverre and Mitelman Felix. 2009. *Cancer Cytogenetics.*
- Helmrich A, Ballarino M, Tora L. 2011. Collisions between replication and transcription complexes cause common fragile site instability at the longest human genes. *Mol. Cell* 44:966-77.
- Ho PL, Kurtova A, Chan KS. 2012. Normal and neoplastic urothelial stem cells: getting to the root of the problem. *Nat. Rev. Urol.* 9:583-94.
- Hofmann T, Knüchel-Clarke R, Hartmann A, Stöhr R, Tilki D, Seitz M, Karl A, Stief C, Zaak D. 2006. Clinical Implications of the 2004 WHO Histological Classification on Non-Invasive Tumours of the Urinary Bladder. *EAU-EBU Updat. Ser.* 4:83-95.
- Hopman AH, Moesker O, Smeets AW, Pauwels RP, Vooijs GP, Ramaekers FC. 1991. Numerical chromosome 1, 7, 9, and 11 aberrations in bladder cancer detected by in situ hybridization. *Cancer Res.* 51:644-51.

- van der Horst G, Bos L, van der Pluijm G. 2012. Epithelial plasticity, cancer stem cells, and the tumor-supportive stroma in bladder carcinoma. *Mol. Cancer Res.* 10:995-1009.
- Howard BH. 1995. Nucleosome Positioning by Human Alu Elements in Chromatin. *J. Biol. Chem.* 270:10091-10096.
- Howlett N, Taniguchi T. 2005. The Fanconi anemia pathway is required for the DNA replication stress response and for the regulation of common fragile site stability. *Hum. Mol. Genet.* 14:693-701.
- Hsu L, Kaffe S, Jenkins E. 1992. Proposed guidelines for diagnosis of chromosome mosaicism in amniocytes based on data derived from chromosome mosaicism and pseudomosaicism studies. *Prenat. Diagn.* 12:555-573.
- Humphrey PA. 2004. Urinary bladder pathology 2004: an update. *Ann. Diagn. Pathol.* 8:380-9.
- Hurst CD, Platt FM, Taylor CF, Knowles MA. 2012. Novel tumor subgroups of urothelial carcinoma of the bladder defined by integrated genomic analysis. *Clin. Cancer Res.* 18:5865-77.
- Jacobs KB, Yeager M, Zhou W, Wacholder S, Wang Z, Rodriguez-Santiago B, Hutchinson A, Deng X, Liu C, Horner M-J, et al. 2012. Detectable clonal mosaicism and its relationship to aging and cancer. *Nat. Genet.* 44:651-8.
- Jameson C. 2008. The pathology of bladder cancer. New York Cambridge Univ. Press:1-23.
- Jiang X, Castelao JE, Yuan J-M, Stern MC, Conti D V, Cortessis VK, Pike MC, Gago-Dominguez M. 2012. Cigarette smoking and subtypes of bladder cancer. *Int. J. Cancer* 130:896-901.
- Jiang X, Yuan J, Skipper P. 2007. Environmental tobacco smoke and bladder cancer risk in never smokers of Los Angeles County. *Cancer Res.* 67:7540-7545.
- Jiang Y, Lucas I, Young DJ, Davis EM, Karrison T, Rest JS, Le Beau MM. 2009. Common fragile sites are characterized by histone hypoacetylation. *Hum. Mol. Genet.* 18:4501-12.
- Johansson S, Cohen S, Johansson S. 1992. Epidemiology and etiology of bladder cancer. *Urol. Clin. North Am.*
- Juanpere N, Agell L, Lorenzo M, de Muga S, López-Vilaró L, Murillo R, Mojal S, Serrano S, Lorente JA, Lloreta J, et al. 2012. Mutations in FGFR3 and PIK3CA, singly or combined with RAS and AKT1, are associated with AKT but not with MAPK pathway activation in urothelial bladder cancer. *Hum. Pathol.* 43:1573-1582.
- Junker K, Boerner D, Schulze W, Utting M, Schubert J, Werner W. 2003. Analysis of

- genetic alterations in normal bladder urothelium. *Urology* 62:1134-8.
- Kadlubar FF, Dooley KL, Teitel CH, Roberts DW, Benson RW, Butler MA, Bailey JR, Young JF, Skipper PW, Tannenbaum SR. 1991. Frequency of urination and its effects on metabolism, pharmacokinetics, blood hemoglobin adduct formation, and liver and urinary bladder DNA adduct levels in. *Cancer Res.* 51:4371-4377.
- Karadağ M, Tunca B, Ceçener G, Egeli U, Ozyardimci N, Ege E, Gözü O. 2002. Chromosomal fragile sites and relationship between genetic predisposition to small cell lung cancer. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 22:31-40.
- Kiemeney LA, Moret NC, Witjes JA, Schoenberg MP, Tulinius H. 1997. Familial transitional cell carcinoma among the population of Iceland. *J. Urol.* 157:1649-51.
- Kiriluk K, Prasad S, Patel A. 2012. Bladder cancer risk from occupational and environmental exposures. *Urologic oncology.* 30: 199-211.
- Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L, Kiemeney L, Kriegmair M, Montironi R, Murphy WM, et al. 2005. Bladder cancer: Epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology* 66:4-34.
- Knowles MA, Hurst CD. 2015. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat. Rev. Cancer* 15:25-41.
- Kompier LC, Lurkin I, van der Aa MNM, van Rhijn BWG, van der Kwast TH, Zwarthoff EC. 2010. FGFR3, HRAS, KRAS, NRAS and PIK3CA mutations in bladder cancer and their potential as biomarkers for surveillance and therapy. *PLoS One* 5:e13821.
- Kramer AA, Graham S, Burnett WS, Nasca P. 1991. Familial aggregation of bladder cancer stratified by smoking status. *Epidemiology* 2:145-8.
- Kurtio P, Pukkala E, Kahelin H, Auvinen A, Pekkanen J. 1999. Arsenic concentrations in well water and risk of bladder and kidney cancer in Finland. *Environ. Health Perspect.* 107:705-10.
- Letašiová S, Medve'ová A, Šovčíková A, Dušinská M, Volkovová K, Mosoiu C, Bartonová A. 2012. Bladder cancer, a review of the environmental risk factors. *Environ. Health* 11 Suppl 1:S11.
- Lindgren D, Sjobahl G, Lauss M, Staaf J. 2012. Integrated genomic and gene expression profiling identifies two major genomic circuits in urothelial carcinoma. *PLoS One* 7:e38863.
- Liou SH, Lung JC, Chen YH, Yang T, Hsieh LL, Chen CJ, Wu TN. 1999. Increased chromosome-type chromosome aberration frequencies as biomarkers of cancer risk in a blackfoot endemic area. *Cancer Res.* 59:1481-4.
- López-Abente G, González CA, Errezola M, Escolar A, Izarzugaza I, Nebot M, Riboli E.



1991. Tobacco smoke inhalation pattern, tobacco type, and bladder cancer in Spain. *Am. J. Epidemiol.* 134:830-9.
- Lu X, Phung M, Shaw C, Pham K. 2008. Genomic imbalances in neonates with birth defects: high detection rates by using chromosomal microarray analysis. *Pediatrics* 122:1310-1318.
- Lukusa T, Fryns JP. 2008. Human chromosome fragility. *Biochim. Biophys. Acta* 1779:3-16.
- Ma K, Qiu L, Mrasek K, Zhang J, Liehr T, Quintana LG, Li Z. 2012. Common fragile sites: genomic hotspots of DNA damage and carcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 13:11974-99.
- Machiela M, Chanock S. 2013. Detectable clonal mosaicism in the human genome. *Semin. Hematol.* 50:348-359.
- Marlhens F, Achkar WA, Aurias A, Couturier J, Dutrillaux AM, Gerbault-Sereau M, Hoffschir F, Lamoliatte E, Lefrançois D, Lombard M. 1986. The rate of chromosome breakage is age dependent in lymphocytes of adult controls. *Hum. Genet.* 73:290-7.
- Martín B. 2006. Estudi citogenètic i de marcadors de neurodesenvolupament alterat en pacients amb esquizofrènia.
- Martincorena I, Roshan A, Gerstung M. 2015. High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin. *Science* (80-. ). 348:880-886.
- McConkey DJ, Lee S, Choi W, Tran M, Majewski T, Lee S, Siefker-Radtke A, Dinney C, Czerniak B. 2010. Molecular genetics of bladder cancer: Emerging mechanisms of tumor initiation and progression. *Urol. Oncol.* 28:429-40.
- McGarvey TW, Maruta Y, Tomaszewski JE, Linnenbach AJ, Malkowicz SB. 1998. PTCH gene mutations in invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Oncogene* 17:1167-1172.
- Menten B, Maas N, Thienpont B, Buysse K, Vandesompele J, Melotte C, de Ravel T, Van Vooren S, Balikova I, Backx L. 2006. Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalance in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients. *J. Med. Genet.* 43:625-633.
- Michaud DS, Kogevinas M, Cantor KP, Villanueva CM, Garcia-Closas M, Rothman N, Malats N, Real FX, Serra C, Garcia-Closas R, et al. 2007. Total fluid and water consumption and the joint effect of exposure to disinfection by-products on risk of bladder cancer. *Environ. Health Perspect.* 115:1569-72.
- Mkrtchyan H, Gross M, Hinreiner S, Polytko A, Manvelyan M, Mrasek K, Kosyakova N,

- Ewers E, Nelle H, Liehr T, et al. 2010. Early embryonic chromosome instability results in stable mosaic pattern in human tissues. *PLoS One* 5:e9591.
- Mollerup S, Ryberg D, Hewer A, Phillips D, Haugen A. 1999. Sex differences in lung CYP1A1 expression and DNA adduct levels among lung cancer patients. *Cancer Res.* 59:3317-3320.
- Moriarty HT, Webster LR. 2003. Fragile sites and bladder cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* 140:89-98.
- Morrison CD, Liu P, Woloszynska-Read A, Zhang J, Luo W, Qin M, Bshara W, Conroy JM, Sabatini L, Vedell P, et al. 2014. Whole-genome sequencing identifies genomic heterogeneity at a nucleotide and chromosomal level in bladder cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111:E672-81.
- Mostafa MH, Sheweita SA, O'Connor PJ. 1999. Relationship between schistosomiasis and bladder cancer. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:97-111.
- Mostofi F.K. SLH and T. 1973. Histological typing of urinary bladder tumours. WHO.
- Mrasek K, Schoder C, Teichmann A-C, Behr K, Franze B, Wilhelm K, Blaurock N, Claussen U, Liehr T, Weise A. 2010. Global screening and extended nomenclature for 230 aphidicolin-inducible fragile sites, including 61 yet unreported ones. *Int. J. Oncol.* 36:929-40.
- Mueller C, Caporaso N, Greene M. 2008. Familial and genetic risk of transitional cell carcinoma of the urinary tract. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* 26:451-464.
- Mulvihill DJ, Wang Y-H. 2004. Two breakpoint clusters at fragile site FRA3B form phased nucleosomes. *Genome Res.* 14:1350-7.
- Murta-Nascimento C, Silverman DT, Kogevinas M, García-Closas M, Rothman N, Tardón A, García-Closas R, Serra C, Carrato A, Villanueva C, et al. 2007. Risk of bladder cancer associated with family history of cancer: do low-penetrance polymorphisms account for the increase in risk? *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16:1595-600.
- Nadal M, Pera G, Gómez-Zaera M, Abril J, Suárez JF, Aguiló F, Condom E, Nunes V. 2005. Tissue imprints or primary cultures: which strategy to use to study cytogenetic clonality? *Diagn. Mol. Pathol.* 14:243-6.
- Nishiyama H, Hornigold N, Davies AM, Knowles MA. 1999. A sequence-ready 840-kb PAC contig spanning the candidate tumor suppressor locus DBC1 on human chromosome 9q32-q33. *Genomics* 59:335-8.
- Notini A, Craig J, White S. 2008. Copy number variation and mosaicism. *Cytogenet. Genome Res.* 123:270-277.
- O'Brien JM. 2000. Environmental and heritable factors in the causation of cancer: analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland, by P.

- Lichtenstein, N.V. Holm, P.K. Verkasalo, A. Iliadou, J. Kaprio, M. Koskenvuo, E. Pukkala, A. Skytthe, and K. Hemminki. N. Surv. Ophthalmol. 45:167-8.
- O'Huallachain M. 2012. Extensive genetic variation in somatic human tissues. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109:18018-18023
- Ozeri-Galai E, Schwartz M, Rahat A, Kerem B. 2008. Interplay between ATM and ATR in the regulation of common fragile site stability. Oncogene 27:2109-17.
- Ozeri-Galai E, Tur-Sinai M, Bester AC, Kerem B. 2014. Interplay between genetic and epigenetic factors governs common fragile site instability in cancer. Cell. Mol. Life Sci. 71:4495-506.
- Palakodeti A, Lucas I, Jiang Y, Young DJ, Fernald AA, Karrison T, Le Beau MM. 2010. Impaired replication dynamics at the FRA3B common fragile site. Hum. Mol. Genet. 19:99-110.
- Pansuriya TC, van Eijk R, d'Adamo P, van Ruler MAJH, Kuijjer ML, Oosting J, Cleton-Jansen A-M, van Oosterwijk JG, Verbeke SLJ, Meijer D, et al. 2011. Somatic mosaic IDH1 and IDH2 mutations are associated with enchondroma and spindle cell hemangioma in Ollier disease and Maffucci syndrome. Nat. Genet. 43:1256-61.
- Papavassiliou P, York T. 2009. The phenotype of persons having mosaicism for trisomy 21/Down syndrome reflects the percentage of trisomic cells present in different tissues. Am. J. Med. Genet. Part A 149:573-583.
- Pathak S, Hopwood VL, Hughes JI, Jackson GL. 1991. Identification of colon cancer-predisposed individuals: a cytogenetic analysis. Am. J. Gastroenterol. 86:679-84.
- Paz y Miño C, Peñaherrera MS, Sánchez ME, Córdova A, Gutiérrez S, Ocampo L, Leone PE. 1997. Comparative study of chromosome aberrations induced with aphidicolin in women affected by breast cancer and cervix uterine cancer. Cancer Genet. Cytogenet.
- Pellicoli A, Muzi-Falconi M. 2013. A blooming resolvase at chromosomal fragile sites. Nat. Cell Biol. 15:883-885.
- Pfeiffer P. 2000. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. Mutagenesis 15:289-302.
- Piotrowski A, Bruder CEG, Andersson R, Diaz de Ståhl T, Menzel U, Sandgren J, Poplawski A, von Tell D, Crasto C, Bogdan A, et al. 2008. Somatic mosaicism for copy number variation in differentiated human tissues. Hum. Mutat. 29:1118-24.
- Pirzio LM, Pichierri P, Bignami M, Franchitto A. 2008. Werner syndrome helicase activity is essential in maintaining fragile site stability. J. Cell Biol. 180:305-314.

- Pitard A, Brennan P, Clavel J, Greiser E, Lopez-Abente G, Chang-Claude J, Wahrendorf J, Serra C, Kogevinas M, Boffetta P. 2001. Cigar, pipe, and cigarette smoking and bladder cancer risk in European men. *Cancer Causes Control* 12:551-6.
- Platt FM, Hurst CD, Taylor CF, Gregory WM, Harnden P, Knowles MA. 2009. Spectrum of Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway Gene Alterations in Bladder Cancer. *Clin. Cancer Res.* 15:6008-6017.
- Prat E, Bernués M, Caballín MR, Egozcue J, Gelabert A, Miró R. 2001. Detection of chromosomal imbalances in papillary bladder tumors by comparative genomic hybridization. *Urology* 57:986-92.
- Prat E, Del Rey J, Camps J, Ponsa I, Lloreta J, Egozcue J, Gelabert A, Campillo M, Miro R. 2008. Genomic imbalances in urothelial cancer: intratumor heterogeneity versus multifocality. *Diagn. Mol. Pathol.* 17:134-40.
- Prat E, del Rey J, Ponsa I, Nadal M, Camps J, Plaja A, Campillo M, Algaba F, Gelabert A, Miró R. 2010. Comparative genomic hybridization analysis reveals new different subgroups in early-stage bladder tumors. *Urology* 75:347-55.
- Puzio-Kuter AM, Castillo-Martin M, Kinkade CW, Wang X, Shen TH, Matos T, Shen MM, Cordon-Cardo C, Abate-Shen C. 2009. Inactivation of p53 and Pten promotes invasive bladder cancer. *Genes Dev.* 23:675-80.
- Rampias T, Vgenopoulou P, Avgeris M, Polyzos A, Stravodimos K, Valavanis C, Scorilas A, Klinakis A. 2014. A new tumor suppressor role for the Notch pathway in bladder cancer. *Nat. Med.* 20:1199-205.
- Rebouissou S, Hérault A. 2012. CDKN2A homozygous deletion is associated with muscle invasion in FGFR3-mutated urothelial bladder carcinoma. *J. Pathol.* 227:315-324.
- Rehen SK. 2005. Constitutional Aneuploidy in the Normal Human Brain. *J. Neurosci.* 25:2176-2180.
- Del Rey J. 2009. Inestabilidad cromosómica y desequilibrios genómicos en cáncer de vejiga. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Del Rey J, Prat E, Ponsa I, Lloreta J, Gelabert A, Algaba F, Camps J, Miró R. 2010. Centrosome clustering and cyclin D1 gene amplification in double minutes are common events in chromosomal unstable bladder tumors. *BMC Cancer* 10:280.
- van Rhijn BWG, van der Kwast TH, Alkhateeb SS, Fleshner NE, Van Leenders GJLH, Bostrom PJ, Van Der Aa MNM, Kakiashvili DM, Bangma CH, Jewett M a S, et al. 2012. A new and highly prognostic system to discern T1 bladder cancer substage. *Eur. Urol.* 61:378-384.
- Ribas M, Miró R, Gelabert A, Egozcue J. 1999. Chromosome instability in lymphocytes

- from two patients affected by three sequential primary cancers: the role of fragile sites. *Cancer Genet. Cytogenet.* 110:133-5.
- Rigola M. 2008. Detecció i identificació de desequilibris cromosòmics constitucionals i adquirits mitjançant l'aplicació de la tècnica de Hibridació Genòmica Comparada. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Rodríguez-Santiago B, Malats N, Rothman N, Armengol L, Garcia-Closas M, Kogevinas M, Villa O, Hutchinson A, Earl J, Marenne G, et al. 2010. Mosaic uniparental disomies and aneuploidies as large structural variants of the human genome. *Am. J. Hum. Genet.* 87:129-38.
- Rosin MP, Anwar W a., Ward AJ. 1994. Inflammation, chromosomal instability, and cancer: The schistosomiasis model. *Cancer Res.* 54:1929s-1933s.
- Rouprêt M, Babjuk M, Compérat E, Zigeuner R, Sylvester RJ, Burger M, Cowan NC, Böhle A, Van Rhijn BWG, Kaasinen E, et al. 2015. European Association of Urology Guidelines on Upper Urinary Tract Urothelial Cell Carcinoma: 2015 Update. *Eur. Urol.* 68:868-79.
- Samanic C, Kogevinas M, Dosemeci M. 2006. Smoking and bladder cancer in Spain: effects of tobacco type, timing, environmental tobacco smoke, and gender. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15:1348-1354.
- Sandberg AA, Berger CS. 1994. Review of chromosome studies in urological tumors. II. Cytogenetics and molecular genetics of bladder cancer. *J. Urol.* 151:545-60.
- Scott SA, Cohen N, Brandt T, Toruner G, Desnick RJ, Edelman L. 2010. Detection of low-level mosaicism and placental mosaicism by oligonucleotide array comparative genomic hybridization. *Genet. Med.* 12:85-92.
- Shah SN, Opresko PL, Meng X, Lee MYWT, Eckert KA. 2010. DNA structure and the Werner protein modulate human DNA polymerase delta-dependent replication dynamics within the common fragile site FRA16D. *Nucleic Acids Res.* 38:1149-62.
- Shao L, Lerner SL, Bondaruk J, Czerniak BA, Zeng X, Grossman HB, Spitz MR, Wu X. 2004. Specific chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes are associated with risk of bladder cancer. *Genes. Chromosomes Cancer* 41:379-89.
- Shin K, Lim A, Odegaard JI, Honeycutt JD, Kawano S, Hsieh MH, Beachy PA. 2014. Cellular origin of bladder neoplasia and tissue dynamics of its progression to invasive carcinoma. *Nat. Cell Biol.* 16:469-78.
- Sidransky D, Frost P, Von Eschenbach A, Oyasu R, Preisinger AC, Vogelstein B. 1992. Clonal origin bladder cancer. *N. Engl. J. Med.* 326:737-40.
- Simonetti S, Russo R, Ciancia G. 2009. Role of polysomy 17 in transitional cell

- carcinoma of the bladder: immunohistochemical study of HER2/neu expression and fish analysis of c-erbB-2 gene and. *Int. J. Surg. Pathol.* 17:198-205.
- Sjödahl G, Lauss M, Gudjonsson S, Liedberg F, Halldén C, Chebil G, Månsson W, Höglund M, Lindgren D. 2011. A Systematic Study of Gene Mutations in Urothelial Carcinoma; Inactivating Mutations in TSC2 and PIK3R1. Guan X, editor. *PLoS One* 6:e18583.
- Sjödahl G, Lauss M, Lövgren K, Chebil G, Gudjonsson S, Veerla S, Patschan O, Aine M, Fernö M, Ringnér M, et al. 2012. A molecular taxonomy for urothelial carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 18:3377-86.
- Snape K, Hanks S, Ruark E, Barros-Núñez P. 2011. Mutations in CEP57 cause mosaic variegated aneuploidy syndrome. *Nat. Genet.* 43:527-529.
- Solomon D, Kim T, Diaz-Martinez L, Fair J. 2011. Mutational inactivation of STAG2 causes aneuploidy in human cancer. *Science* (80-. ). 333:1039-1043.
- Stadler WM, Steinberg G, Yang X, Hagos F, Turner C, Olopade OI. 2001. Alterations of the 9p21 and 9q33 chromosomal bands in clinical bladder cancer specimens by fluorescence in situ hybridization. *Clin. Cancer Res.* 7:1676-82.
- Stein CK, Glover TW, Palmer JL, Glisson BS. 2002. Direct correlation between FRA3B expression and cigarette smoking. *Genes. Chromosomes Cancer* 34:333-40.
- Le Tallec B, Dutrillaux B, Lachages A-M, Millot GA, Brison O, Debatisse M. 2011. Molecular profiling of common fragile sites in human fibroblasts. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18:1421-3.
- Le Tallec B, Millot GA, Blin ME, Brison O, Dutrillaux B, Debatisse M. 2013. Common fragile site profiling in epithelial and erythroid cells reveals that most recurrent cancer deletions lie in fragile sites hosting large genes. *Cell Rep.* 4:420-8.
- Tang M, Wang H, Hu Y, Chen W-S, Akao M, Feng Z, Hu W. 2011. Acrolein induced DNA damage, mutagenicity and effect on DNA repair. *Mol. Nutr. Food Res.* 55:1291-300.
- TCGA. 2014. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature* 507:315-22.
- Thys RG, Lehman CE, Pierce LCT, Wang Y-H. 2015. DNA secondary structure at chromosomal fragile sites in human disease. *Curr. Genomics* 16:60-70.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. 2015. Global cancer statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* 65:87-108.
- Tuna M, Knuutila S, Mills G. 2009. Uniparental disomy in cancer. *Trends Mol. Med.* 15:120-128.
- Tunca B, Cecener G, Gebitekin C, Egeli U, Ediz B, Ercan I. 2002. Investigation of genetic susceptibility to non-small cell lung cancer by fragile site expression.

- Teratog. Carcinog. Mutagen.
- Tunca B, Egeli U, Zorluoglu A, Yilmazlar T, Yerci O, Kizil A. 2000. The expression frequency of common fragile sites and genetic predisposition to colon cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* 119:139-45.
- Udumudi A, Jaiswal M, Rajeswari N, Desai N, Jain S, Balakrishna N, Rao K V, Ahuja YR. 1998. Risk assessment in cervical dysplasia patients by single cell gel electrophoresis assay: a study of DNA damage and repair. *Mutat. Res.* 412:195-205.
- Villanueva CM, Silverman DT, Murta-Nascimento C, Malats N, Garcia-Closas M, Castro F, Tardon A, Garcia-Closas R, Serra C, Carrato A, et al. 2009. Coffee consumption, genetic susceptibility and bladder cancer risk. *Cancer Causes Control* 20:121-7.
- Volanis D, Kadiyska T, Galanis A, Delakas D, Logotheti S, Zoumpourlis V. 2010. Environmental factors and genetic susceptibility promote urinary bladder cancer. *Toxicol. Lett.*
- Wang L, Darling J, Zhang JS, Huang H, Liu W, Smith DI. 1999. Allele-specific late replication and fragility of the most active common fragile site, FRA3B. *Hum. Mol. Genet.* 8:431-7.
- WHO and IARC. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Fact Sheets by Population.
- WHO and IARC. 2010. IARC Monographs- Monographs available in PDF format. *Iarc Monogr. Eval. Carcinog. Risks To Humans. Vol. 92 Some Non-heterocyclic Polycycl. Aromat. Hydrocarb. Some Relat. Expo.*:1-819. [accedit 2015 des 12]. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol83/index.php>
- Wiencke JK. 2002. DNA adduct burden and tobacco carcinogenesis. *Oncogene* 21:7376-91.
- Williamson MP, Elder PA, Shaw ME, Devlin J, Knowles MA. 1995. p16 (CDKN2) is a major deletion target at 9p21 in bladder cancer. *Hum. Mol. Genet.* 4:1569-1577.
- Wilson TE, Arlt MF, Park SH, Rajendran S, Paulsen M, Ljungman M, Glover TW. 2015. Large transcription units unify copy number variants and common fragile sites arising under replication stress. *Genome Res.* 25:189-200.
- Witjes JA, Comp erat E, Cowan NC, De Santis M, Gakis G, Leuret T, Ribal MJ, Van der Heijden AG, Sherif A. 2014. EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: summary of the 2013 guidelines. *Eur. Urol.* 65:778-92.
- Wu X-R, Kong X-P, Pellicer A, Kriebich G, Sun T-T. 2009. Uroplakins in urothelial biology, function, and disease. *Kidney Int.* 75:1153-65.
- Yamamoto S, Romanenko A, Wei M, Masuda C, Zaparin W, Vinnichenko W, Voizianov

- A, Lee CC, Morimura K, Wanibuchi H, et al. 1999. Specific p53 gene mutations in urinary bladder epithelium after the Chernobyl accident. *Cancer Res.* 59:3606-9.
- Yasunaga Y, Nakanishi H, Naka N, Miki T, Tsujimura T, Itatani H, Okuyama A, Aozasa K. 1997. Alterations of the p53 gene in occupational bladder cancer in workers exposed to aromatic amines. *Lab. Invest.* 77:677-84.
- Youssoufian H, Pyeritz RE. 2002. Mechanisms and consequences of somatic mosaicism in humans. *Nat. Rev. Genet.* 3:748-58.
- Yunis JJ, Soreng AL. 1984. Constitutive fragile sites and cancer. *Science* 226:1199-204.
- Yurov YB, Iourov IY, Vorsanova SG, Liehr T, Kolotii AD, Kutsev SI, Pellestor F, Beresheva AK, Demidova IA, Kravets VS, et al. 2007. Aneuploidy and confined chromosomal mosaicism in the developing human brain. *PLoS One* 2:e558.
- Zeegers MP, Tan FE, Dorant E, van Den Brandt PA. 2000. The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Cancer* 89:630-9.
- Zhang H, Freudenreich CH. 2007. An AT-rich sequence in human common fragile site FRA16D causes fork stalling and chromosome breakage in *S. cerevisiae*. *Mol. Cell* 27:367-79.
- Zhu Y, Spitz MR, Strom S, Tomlinson GE, Amos CI, Minna JD, Wu X. 2002. A case-control analysis of lymphocytic chromosome 9 aberrations in lung cancer. *Int. J. Cancer* 102:536-40.