

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

**Análisis de microsátelites en el cromosoma
nueve en pacientes con cáncer de vejiga.
Implicaciones pronósticas**

Autor: Díaz García, José Luis

**Directores: David Castro Díaz,
Carlos Hernández Calzadilla
y Felicitas Díaz-Flores Estévez**

Departamento de Cirugía, Oftalmología y Otorrinolaringología

D. DAVID CASTRO DÍAZ, PROFESOR TITULAR DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA.

CERTIFICO:

Que **D. José Luis Díaz García**, licenciado en Medicina y Cirugía ha realizado bajo mi dirección el Trabajo de Investigación correspondiente a la Tesis Doctoral: **“Análisis de microsatélites en el cromosoma nueve en pacientes con cáncer de vejiga. Implicaciones pronósticas”**, que ha terminado con el mayor aprovechamiento.

Revisada la presente memoria, estimo que corresponde fielmente a los resultados obtenidos, y quedo conforme con su presentación para ser juzgada por el tribunal que sea designado para su lectura.

Y para que conste y surta los efectos oportunos en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extiendo y firmo el presente certificado en La Laguna a uno de julio de dos mil dos.

D. CARLOS HERNÁNDEZ CALZADILLA, PROFESOR TITULAR DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA.

CERTIFICO:

Que **D. José Luis Díaz García**, licenciado en Medicina y Cirugía ha realizado bajo mi dirección el Trabajo de Investigación correspondiente a la Tesis Doctoral: **“Análisis de microsatélites en el cromosoma nueve en pacientes con cáncer de vejiga. Implicaciones pronósticas”**, que ha terminado con el mayor aprovechamiento.

Revisada la presente memoria, estimo que corresponde fielmente a los resultados obtenidos, y quedo conforme con su presentación para ser juzgada por el tribunal que sea designado para su lectura.

Y para que conste y surta los efectos oportunos en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extiendo y firmo el presente certificado en La Laguna a uno de julio de dos mil dos.

D^a. FELICITAS DÍAZ-FLORES ESTÉVEZ, DOCTORA EN MEDICINA Y CIRUGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA.

CERTIFICO:

Que **D. José Luis Díaz García**, licenciado en Medicina y Cirugía ha realizado bajo mi dirección el Trabajo de Investigación correspondiente a la Tesis Doctoral: **“Análisis de microsatélites en el cromosoma nueve en pacientes con cáncer de vejiga. Implicaciones pronósticas”**, que ha terminado con el mayor aprovechamiento.

Revisada la presente memoria, estimo que corresponde fielmente a los resultados obtenidos, y quedo conforme con su presentación para ser juzgada por el tribunal que sea designado para su lectura.

Y para que conste y surta los efectos oportunos en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extiendo y firmo el presente certificado en La Laguna a uno de julio de dos mil dos.

A Eva

A Pablo

A mi padre (in memoriam)

A Eva por haber creído siempre en mí, por su paciencia, comprensión e incesante estímulo y por haber soportado estoicamente la pérdida de tiempo de vida familiar, que este proyecto nos ha escatimado.

A Pablo que con su vitalidad y entusiasmo por las pequeñas cosas, me enseña a vivir cada día.

A mis padres que con su esfuerzo y sacrificio me permitieron alcanzar mi deseo de ser médico.

A mis suegros por su constante y desinteresado apoyo en los momentos difíciles.

A todos los miembros de mi familia, especialmente a mis hermanos y cuñados.

A la Sociedad Canaria de Urología, la Consejería de Educación del Gobierno de Canarias, Pharmacia, Schering y Aventis Pharma, por su colaboración económica sin la cual este proyecto no hubiera podido realizarse.

A David Castro Díaz, impulsor de este proyecto, que a pesar de sus múltiples obligaciones siempre tuvo un momento para ayudarme cuando lo necesité.

A Carlos Hernández Calzadilla y a Felicitas Díaz-Flores Estevez por su inestimable ayuda y asesoramiento en las técnicas de laboratorio utilizadas y en la

corrección de la memoria, sin la cual no hubiera sido posible la realización de este estudio.

A Alejandro Jiménez por su ayuda en el procesamiento estadístico de los resultados.

A mis antiguos compañeros del servicio de Urología y de la sección de Biología molecular del Laboratorio Central del Hospital Universitario de Canarias, por su ayuda en la recogida y procesamiento de las muestras especialmente a Tomás Concepción Masip y Pedro Rodríguez Hernández.

A mis compañeros del servicio de Urología del Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria y especialmente a Fernando Galbis Palau por su ánimo incondicional en la elaboración de esta memoria.

A todos ellos y a cuantos han contribuido a hacer posible este proyecto, mi agradecimiento más sincero.

ÍNDICE

I.- Introducción	
Epidemiología del cáncer vesical	12
Etiología del cáncer de vejiga	14
Biología Molecular	17
Citogenética del carcinoma vesical	24
Papel del cromosoma nueve en la génesis del cáncer vesical	25
Papel de otros cromosomas en la génesis del cáncer vesical	31
Oncogenes en el cáncer vesical	33
Genes supresores en el cáncer de vejiga	36
Historia natural del cáncer vesical a nivel genético	44
Terapia génica en el cáncer vesical	46
Microsatélites	55
Mecanismos de reparación del ADN	60
Detección de inestabilidad genómica mediante el análisis de microsatélites	67
Análisis de microsatélites en el cáncer vesical	73
II.- Justificación y Objetivos	75
III.- Material y Métodos	78
Extracción del ADN	80
Cuantificación del ADN	85

Microsatélites	87
Amplificación	90
Electroforesis vertical	92
Electroforesis horizontal	92
Detección	96
Fotografía de los resultados	99
Escaneo de los resultados	100
Uso del programa Uthscsa image tool	101
Análisis estadístico	103
IV.- Resultados	104
V.- Discusión	117
VI.- Conclusiones	133
VII.- Bibliografía	137

INTRODUCCIÓN

Epidemiología del cáncer vesical

El cáncer de vejiga es un tumor relativamente frecuente que supone la segunda neoplasia urológica más frecuente en el varón y la primera en la mujer. En los hombres es el cuarto tumor más frecuente detrás del de pulmón, próstata y colon; mientras que en las mujeres es la octava causa más frecuente de cáncer. En la mayoría de las poblaciones el cáncer vesical es de tres a cuatro veces más frecuente en el varón que en la mujer. Este hecho refleja la exposición más frecuente del varón al tabaquismo y a ocupaciones que involucran contacto con determinados productos químicos, tales como las aminas aromáticas que son los principales factores de riesgo reconocidos para el cáncer vesical.

Su incidencia es mayor entre las personas de raza blanca en comparación con las de raza negra, sin embargo la mortalidad por esta causa es mayor en las personas de raza negra debido a que en el momento del diagnóstico el porcentaje de enfermedad organoconfinada es bastante menor al que tienen los individuos de raza blanca. Las tasas de incidencia más elevadas de esta enfermedad se encuentran en Europa occidental y en Estados Unidos. En España, al igual que en el resto del mundo, se aprecia un aumento progresivo de las tasas de incidencia del cáncer de vejiga (1).

En el epitelio transicional reside el origen de más del 90% de los tumores vesicales. Histológicamente los tumores vesicales se clasifican en función de su estadio y grado. Aproximadamente el 75% tienen un tumor superficial (pTa, pT1) en el momento

del diagnóstico, mientras que un 20% presentan un tumor infiltrante (>T2) y en un 5% de los casos el tumor es metastásico. La tasa de recurrencia de los tumores superficiales es mayor al 60%, mientras que la progresión tumoral a un estadio o grado mayor ocurre en el 42% de los pacientes si los observamos durante un periodo de 10 años. El estadio y el grado histológico son los predictores de recurrencia y progresión clásicamente más utilizados (2).

La enfermedad afecta fundamentalmente a personas mayores de 50 años y cuando aparece en menores de 40 años su comportamiento es menos agresivo.

Etiología del cáncer de vejiga

En su etiología se han implicado varios factores, entre los que se encuentran la exposición profesional a determinadas sustancias del grupo de las anilinas, el tabaquismo, abuso de analgésicos del tipo de la fenacetina, abuso de edulcorantes artificiales como la sacarina y el ciclamato, la elevada tasa de arsénico en el agua de consumo (enfermedad de los pies negros), cistopatías crónicas, radioterapia pélvica, quimioterapia con ciclofosfamida (por la acroleína), aumento del aporte graso en la dieta, disminución de la ingesta hídrica, etc.

Una ingesta hídrica más elevada podría diluir los metabolitos en la orina e incrementar la frecuencia de micción, reduciendo así el contacto de los carcinógenos con el epitelio vesical. Además la fuente de origen del agua potable también parece revestir importancia, porque en algunos estudios se ha encontrado que el agua potable que contiene productos derivados de la cloración puede aumentar el riesgo de aparición del cáncer vesical. (3)

De todas ellas la exposición habitual al humo del tabaco es el factor aislado más importante. Este factor puede contribuir a más de la mitad de los tumores vesicales en algunas regiones del mundo. El riesgo de cáncer vesical en fumadores es entre dos y cuatro veces más alto que en no fumadores y aumenta con el número de cigarrillos y la duración del hábito de fumar. El riesgo es mayor para los fumadores de cigarrillos sin filtro, de alto contenido en nicotina o de tabaco negro que para los consumidores de

cigarrillos con filtro, de bajo contenido en nicotina o de tabaco rubio. No está claro si los fumadores de otros tipos de tabaco aparte de los cigarrillos tienen un riesgo aumentado de cáncer vesical, aunque algunos estudios han descrito un aumento del riesgo en los fumadores de pipa, mientras que la relación con el consumo de puros, rapé y tabaco masticado no se ha concretado todavía. El dejar el hábito tabáquico hace que el riesgo relativo de presentar cáncer de vejiga disminuya, veinte años después de haberlo dejado, aunque nunca disminuirá hasta el nivel de los no fumadores. El riesgo de desarrollar un cáncer vesical relacionado con el consumo del tabaco sufre una variación interindividual, aun cuando la exposición al tabaco sea la misma. Esto está relacionado con la expresión polimórfica de los diferentes mecanismos de detoxificación.

Para ejercer su efecto carcinogénico, las aminas aromáticas, al igual que la mayoría de los carcinógenos químicos, requieren una activación metabólica. La activación de estas aminas corre a cargo de algunas enzimas cuya distribución polimórfica en la población puede dar lugar a diferencias, genéticamente determinadas, en la susceptibilidad individual. Existen dos N-acetiltransferasa (NAT1 y NAT2). Los genes que las codifican se sitúan en la región cromosómica 8p22 que frecuentemente está alterada en los pacientes que presentan un cáncer vesical.

La N-acetiltransferasa 2 (NAT2) es el mayor enzima acetilador y posee seis alelos. Las personas que poseen un fenotipo acetilador lento, debido a que sus enzimas son menos eficientes, tienen un riesgo más elevado de presentar cáncer de vejiga que otras que tengan un fenotipo acetilador rápido, aunque la exposición al tóxico sea la misma.

La exposición profesional puede ocasionar el 18% de los tumores vesicales en el hombre y el 6% en las mujeres. La exposición a ciertas aminas aromáticas y en especial a la 2-naftilamina y la bencidina es el determinante principal del incremento de las tasas de cáncer vesical en estas personas expuestas. Estas personas son aquellas que trabajan en industrias químicas, textiles, del aluminio, de procesado de pieles, de pintura, de automóviles, eléctricas, del caucho, de la alimentación, conductores de camiones, técnicos dentales etc.(4)

Biología molecular

La carcinogénesis es un proceso complejo, en el que pueden intervenir una gran variedad de factores. Como ocurre con muchas otras enfermedades, es fundamental para su control y curación el adquirir un conocimiento preciso acerca de sus mecanismos de producción.

Ultimamente, se está prestando gran atención a los mecanismos íntimos que conducen a la proliferación neoplásica. Esto ha sido posible, gracias al gran avance que ha experimentado la Biología Molecular, con el desarrollo de técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite amplificar fragmentos de ADN de secuencias flanqueantes conocidas; y así poder estudiar las alteraciones producidas en el ADN.

Todas las células, tanto de los organismos vertebrados como de los invertebrados, contienen genes comunes que son homólogos de oncogenes virales (v-onc). Estos genes se denominan proto-oncogenes (c-onc) y han sido altamente preservados a lo largo de la evolución de las especies, a pesar de su potencial oncogénico. Algunos proto-oncogenes presentan una expresión muy importante durante algunas etapas del ciclo celular, y durante algunas fases de la embriogénesis, indicándonos la función crucial de estos genes en el crecimiento y el desarrollo.

Hoy se sabe, que las alteraciones genéticas responsables de la aparición del cáncer afectan a genes celulares implicados en los procesos de proliferación y diferenciación celular, cuya desregulación da lugar a la aparición del fenotipo tumoral. Estos se denominan protooncogenes y su alteración por agentes como virus, radiaciones, agentes químicos, etc., dará lugar a los oncogenes. Los protooncogenes pueden transformarse en oncogenes por varios mecanismos, como el de hipometilación, hipermetilación, mutación, reordenación, supresión o amplificación.

Al nivel del RNA, una regulación alterada de la transcripción puede conducir a un aumento o disminución de un determinado RNA mensajero, lo cual se traduce en fenómenos de sobreexpresión o infraexpresión. Además, alteraciones en la formación del RNA mensajero pueden conducir a cambios en la vida media o en la estructura de la proteína subsecuente, pudiendo originar su inactivación o cambios en su función.

Al activarse los oncogenes la célula producirá proteínas diferentes, dando lugar a una célula cancerosa, que se individualiza en su producción y reproducción del resto de las células programadas por el protooncogén. Los oncogenes actúan de modo dominante, de tal modo que basta con que en alguno de los dos alelos exista el gen alterado para que la célula se transforme en cancerosa.

Otro factor, que puede iniciar la aparición de un tumor, es la desaparición de los genes tumor supresores, los cuales producen una proteína que suprime la susceptibilidad a presentar dicho tumor. Los genes tumor supresores tienen carácter recesivo, por lo que su efecto se consigue por la acción de sus dos alelos; a diferencia de lo que ocurre con los oncogenes, en los que la alteración de uno sólo de ellos es capaz de originar cáncer, en el caso de los tumores inducidos por la pérdida de los genes tumor supresores se

precisa la desaparición de los dos alelos para que el tumor aparezca. En un principio el tumor posee un solo clon de células neoplásicas, pero la inactivación de otros genes tumor supresores o la activación de otros oncogenes inducirá la aparición de múltiples clonas neoplásicas, que le conferirán al tumor propiedades de neoangiogénesis, invasión local, metastatizar, e incluso adquirir resistencias a los agentes quimioterápicos. *(Figura 1)*

Para identificar los genes que normalmente están alterados en el tumor de células transicionales se han utilizado varias propuestas. Se han estudiado varios genes que se sabe que están alterados en otros tipos de tumor. También se han hecho esfuerzos para identificar nuevos genes usando aproximaciones mediante el mapeo del genoma. El uso de estos dos tipos de propuesta han dado como resultado una cantidad considerable de información que finalmente podría llevar al aislamiento de genes clave.

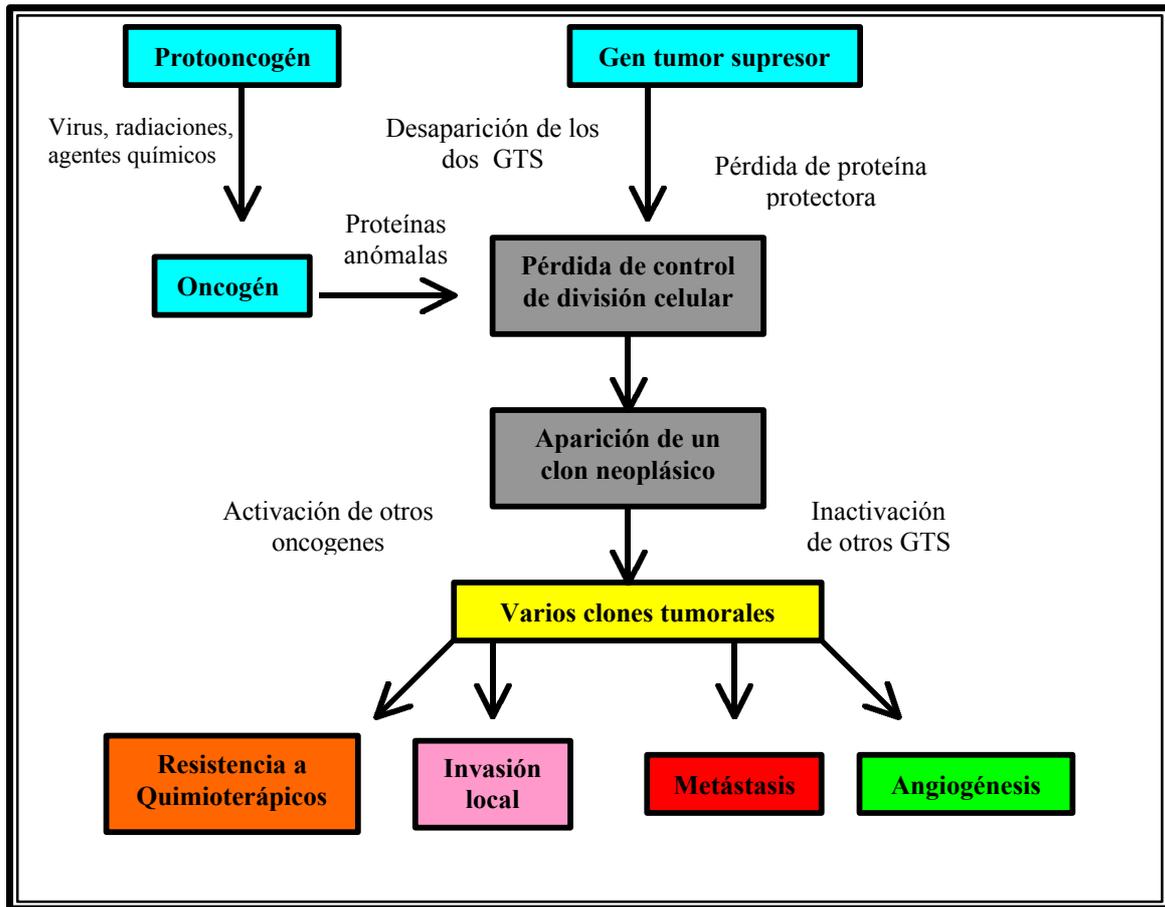


Figura 1: Mecanismos de generación y proliferación neoplásica.

Hoy se conocen una gran variedad de oncogenes, unos 70, entre los más relevantes, dentro de los tumores urológicos, se encuentran:

* Ras: Incluye el K-ras, N-ras, y H-ras. Codifican unas proteínas (p21) con actividad enzimática, que actúan en combinación con las GTP-asas.

* Myc: Incluye el C-myc, N-myc, L-myc, y R-myc. Producen la p58- myc.

* C-erb-1: Produce un receptor del EGF (p175).

* Neu o c-erb-2: Produce una gp185. Es similar al anterior; serológicamente tiene relaciones con el EGFr.

* C-kit.

* Hst-1.

Se han descrito un menor número de genes supresores, en relación con los oncogenes. Entre ellos se encuentran:

WT1 ---- Tumor de Wilms ---- 11p

NF-1 --- Neurofibromatosis tipo 1 --- 17q

FAP ---- Adenomatosis Polipoidea Familiar --- 5q

P53 ---- Proteína p53 ---- 17p

DDC ---- Deleted Colorrectal Carcinoma ----18q

nm23 --- Non Metastatic protein 23 --- 16q

CAR ---- Cell Adhesor Regulator ----16q

RB ----- Retinoblastoma ----- 13q

BRCA1 -- Ca mama y ovario --- 17q

LC1 ---- Ca pulmón -----3p

NB1 ---- Neuroblastoma -----1p

MLM ---- Melanoma -----9p

Cada antioncogén puede estar implicado en la génesis de tumores en distintos órganos del ser humano.

A modo de síntesis, podemos decir, que existiría un equilibrio entre los protooncogenes y los genes supresores, de tal modo que una ruptura de ese equilibrio, bien por alteración de los protooncogenes, o de los genes supresores conducen a la aparición del proceso neoplásico.

Por el momento no podemos predecir con certeza que pacientes que presentan un tumor vesical superficial van a sufrir una progresión hacia un estadio más avanzado y cuales no lo harán. Esta búsqueda de marcadores predictivos ha sido el fin de múltiples estudios, estudiando entre otros factores, el tamaño nuclear, los antígenos de los grupos sanguíneos, la capacidad de adhesión, los receptores del EGF (factor de crecimiento epidérmico), metaloproteinasas de la matriz extracelular, etc. Como quiera que los datos obtenidos de estos estudios no eran satisfactorios se ha estudiado la vía de regulación del crecimiento donde participan la p53 y la pRb además de otras proteínas codificadas por genes como el MDM2, CDKN1A (p21), CDKN2A (p16, p14arf), RB1, E2F y MYCL.

(5)(Figura 2)

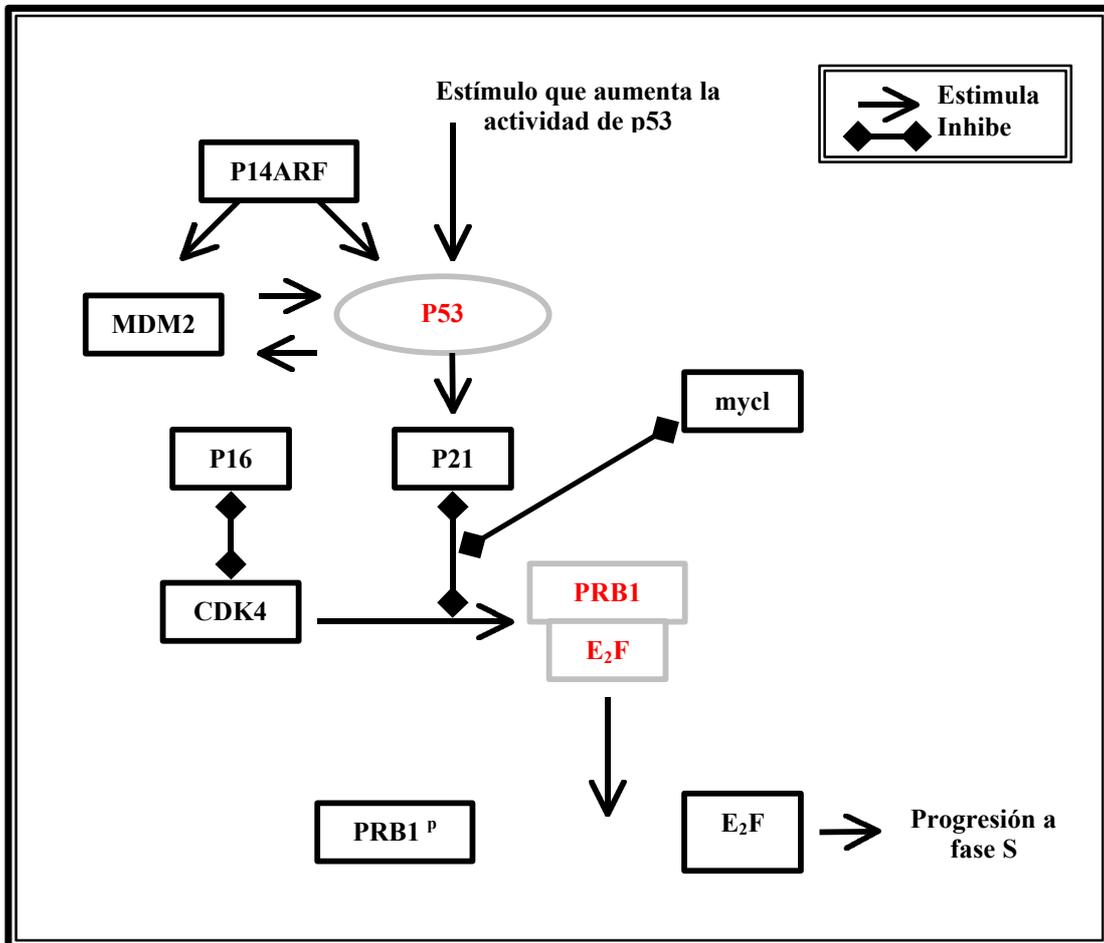
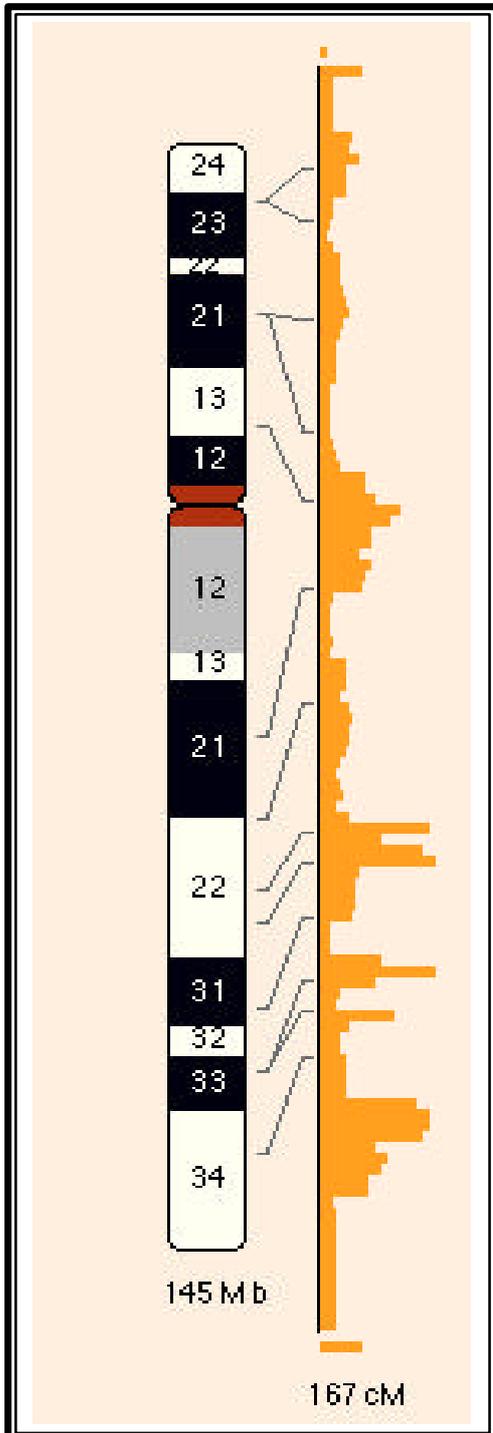


Figura 2: Vías de regulación del ciclo celular.

Citogenética del Carcinoma vesical

Los estudios citogenéticos y moleculares realizados en las neoformaciones vesicales de origen urotelial indican que el desarrollo y progresión de estas lesiones depende de múltiples y complejos reordenamientos genéticos. Los cambios citogenéticos encontrados con mayor frecuencia son la monosomía 9, isocromosomas de 5p y trisomía 7. También se han hallado monosomías 8, isocromosomas de 8q y deleciones de 8p. Los resultados de los estudios moleculares muestran que los sitios más frecuentes donde se aprecia pérdida alélica son los cromosomas 9p, 9q, 11p, 13q, 17p, 4p y 8p. Las regiones cromosómicas que contienen deleciones alélicas manifestadas por pérdida de heterocigosidad (LOH) nos indican la posible localización de genes supresores. La pérdida del cromosoma 9 se ha observado en tumores vesicales de todos los estadios, mientras que la deleción del cromosoma 17p se ha observado sobre todo en tumores vesicales de estadios avanzados.

Papel del cromosoma nueve en la génesis del cáncer vesical



La pérdida de heterocigosidad en los brazos largo y corto del cromosoma 9 es un hallazgo frecuente en el estudio molecular de los tumores uroteliales superficiales e infiltrantes (6). El área de delección más frecuente es la comprendida entre 9p21 y 9q34.1 (figura 3). Las lesiones de estadio más bajo (Ta) parecen tener como hallazgo más común las alteraciones en 9q, mientras que las lesiones de estadio T1 poseen una variedad de alteraciones del cromosoma 9 (9p-, 9q- y 9p-/9q-). Esto sugiere que la pérdida del 9p se asocia con un comportamiento biológico más agresivo. (7)

Las delecciones del cromosoma 9q se encuentran en más de la mitad de los tumores vesicales de células transicionales de todos los grados y estadios.

Figura 3. Cromosoma nueve.

En los tumores de estadio más avanzado esto se acompaña de otras alteraciones genéticas. Por el contrario la mayoría de los tumores superficiales no muestra cambios genéticos detectables aparte de las alteraciones del cromosoma 9. Esto ha llevado a pensar que la inactivación de uno o varios genes en el cromosoma 9 podría representar un paso inicial en la transformación maligna del urotelio.

Se ha sugerido que en la región 9p21-22 existe al menos un gen supresor, cuya delección constituye uno de los eventos iniciales en la génesis de algunos melanomas y puede ser un evento tardío en el desarrollo de otras neoplasias.

Aunque se piensa que en el cromosoma 9 existen más de un gen supresor importantes para el desarrollo y progresión del cáncer de vejiga, parece claro que el gen supresor existente en esta región es fundamental para la oncogénesis de la neoplasia vesical. (8)

La región mínima de delección encontrada en 9p mide 2cM y se encuentra en 9p21 entre los marcadores D9S171 e IFNA. En esta compleja región genómica se codifica la síntesis de tres proteínas diferentes (p16, p14ARF y p15) que son todos ellos reguladores negativos del ciclo celular (*Figura 4*). La p14 y la p14ARF derivan de diferentes exones pero comparten otros dos que son leídos en marcos distintos para generar proteínas sin ninguna relación entre ellas. En esta zona se han identificado con frecuencia delecciones, las cuales normalmente eliminan los tres genes 9p21 y se ha propuesto esto como un mecanismo eficaz para inactivar genéticamente más de una diana en la misma región genómica. Todavía no se han estudiado con detalle las posibles implicaciones pronósticas de la inactivación de alguno o de todos esos genes. No obstante, los estudios de transfección in vitro han demostrado la detención del

crecimiento y la supresión de la tumorigénesis posterior a la introducción de la p16 en las líneas celulares con el gen INK4 suprimido (9)(10)(11).

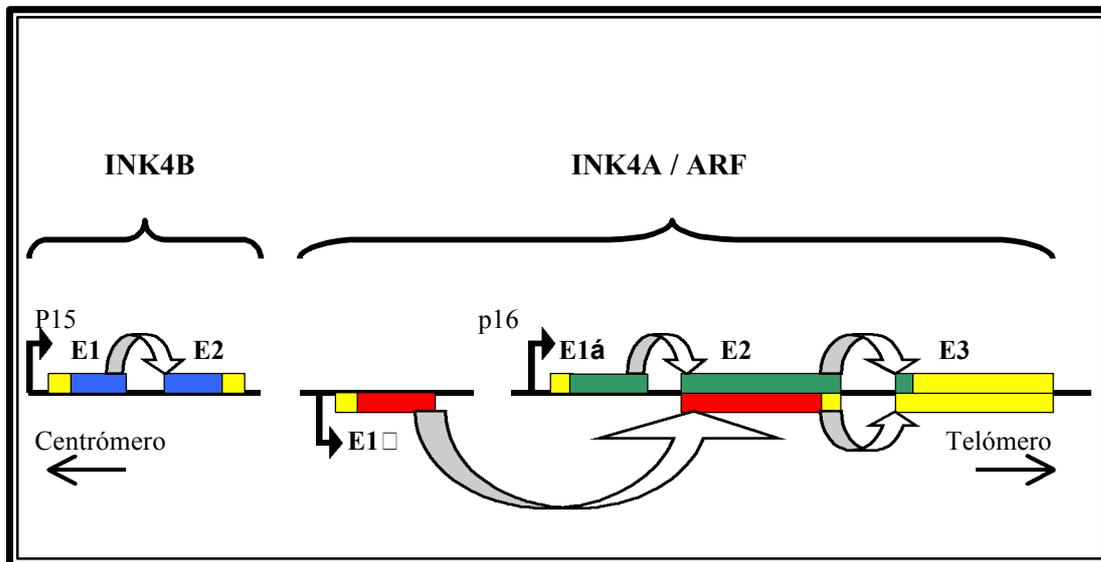


Figura 4: Loci del gen INK4A / ARF y del INK4B. En azul la p15, en verde la p16, en rojo la p14ARF, en amarillo regiones no copiadas. No hay homología de aminoácidos entre la p16 y la p14ARF.

Las moléculas que controlan el ciclo celular tienen complejas interrelaciones a través de las cuales se orquesta el complejo proceso de la reproducción celular. Cualquier anomalía en alguno de estos niveles puede ser un paso de vital importancia en la generación o evolución de una neoplasia.

Los inhibidores de las quinasa ciclina dependientes son una familia de proteínas que actúan inhibiendo la actividad catalítica de los complejos de ciclinas y quinasa ciclina dependientes, los cuales actúan mediante la fosforilación de substratos críticos en el control del ciclo celular, como la pRb. Estos inhibidores pueden ser subdivididos en dos grupos basándonos en la homología de sus secuencias y la similitud de sus funciones (CIP/KIP y INK4). Actualmente en esta familia se incluyen la p21WAF1/Cip1, p27Kip1,

p57Kip2 (grupo Cip/Kip), p15/INK4b, p16/INK4a, p18/INK4c y p19/INK4d (familia INK4 con efecto inhibitorio más selectivo a nivel de los complejos quinasa ciclina dependientes 4 y 6).

La inactivación del INK4A es la segunda alteración más frecuente que encontramos en todos los cánceres humanos, incluido el de vejiga. No obstante se ha apreciado una menor incidencia de alteraciones en este gen en los tumores primarios si los comparamos con los encontrados en las líneas celulares, por lo que algunos autores opinan que la pérdida del p16 puede representar un artefacto por la adaptación al cultivo celular. (12) Se ha relacionado la delección del gen INK4A con una mayor recurrencia en el cáncer vesical superficial. (13) Por esto se ha sugerido el uso de la terapia génica en estos casos. El vector idóneo para el uso de la terapia génica podría ser el adenovirus dada su alta eficiencia y nivel de expresión, aunque debemos tener en cuenta que la expresión del receptor para adenovirus está a menudo disminuida en las células del cáncer de vejiga. Este inconveniente puede solventarse mediante la adición de butirato sódico al medio (14)

Existen otros locus en el cromosoma 9 que se han relacionado con el cáncer de vejiga. Entre ellos esta el que codifica los antígenos sanguíneos ABO, localizado en 9q34.1, cuya expresión se ha visto alterada en pacientes con cáncer vesical. Estos antígenos fueron descritos inicialmente en la superficie celular de los eritrocitos y posteriormente se hallaron en varios tejidos epiteliales, incluyendo el epitelio transicional. Su pérdida se ha asociado con una tasa de recurrencia y progresión a estadios infiltrantes mayor en los pacientes con cáncer superficial de vejiga.

Existen varios factores que han impedido el uso generalizado de la técnica de determinación de antígenos sanguíneos ABO en los tumores vesicales, como son las limitaciones de la técnica de adherencia eritrocitaria con una incidencia significativa de falsos positivos. Además la heterogeneidad en la expresión antigénica de los grupos sanguíneos dentro de un mismo tumor dificulta la interpretación de los resultados. A la hora de interpretar la situación de los antígenos de este grupo debemos tener en cuenta el estado secretor del paciente en cuestión, puesto que aunque la mayor parte del urotelio normal es rico en los antígenos de grupo A, B, O, Lewis^b y Lewis^y, el 20% de los individuos que tienen un urotelio normal no tienen capacidad para expresar estos antígenos. Así pues la pérdida de los antígenos de este grupo sólo será determinante para la evolución del cáncer vesical superficial en los individuos secretores.

El análisis inmunohistoquímico del antígeno de Lewis^x ha demostrado que hasta el 90% de los tumores vesicales expresan este antígeno, lo cual es muy infrecuente en el urotelio sano. Por ello se ha sugerido que podría ser un marcador muy útil para detectar la recurrencia de estos tumores.

En 9q33-34 se localiza el gen de la esclerosis tuberosa (TSC1) y el de la telangiectasia hemorrágica hereditaria (HHT). Ambos están involucrados en síndromes angiogénicos. La angiogénesis es vital para el desarrollo de los tumores, por lo que un gen que regula la angiogénesis puede ser un gen supresor(15). Además algunos estudios evidencian que en el cáncer de vejiga aparecen pérdidas de heterocigosidad en esta región cromosómica (61).

Se han encontrado algunos tumores vesicales con deleciones en el loci 9q32-33, centradas en una región muy pequeña de menos de 800 kb, cerca del marcador D9S195. A este locus se le ha denominado DBC1 (deleted in bladder cancer gene 1).

Se ha apreciado que el mecanismo de producción del síndrome de Gorlin reside en una alteración localizada entre 9q 22.3 y 9q 31. Esta enfermedad se hereda de modo autosómico dominante y existe una especial predisposición a la aparición de carcinomas cutáneos basocelulares y otras neoplasias, entre las que se encuentran las uroteliales. Esto apoyaría la hipótesis que sostiene la existencia de un gen supresor en este cromosoma. (16)

En la región pericentromérica del 9q situada entre los marcadores D9S15 y D9S175 se han encontrado zonas con pérdida de heterocigosidad en pacientes con cáncer vesical, lo que puede sugerir la existencia a dicho nivel de un gen o genes críticos para el inicio de la transformación neoplásica que aún no se han identificado. (17)

Papel de otros cromosomas en la génesis del cáncer vesical

Se han reconocido dos regiones de delección en el cáncer de vejiga en 8p. Estas regiones comúnmente deleccionadas también se han encontrado en otros tumores como los colorrectales y hepatocelulares. Se supone que en estas regiones se encuentran dos genes supresores. La zona más común de delección en 8p mide 8cM y se sitúa en 8p21.3-p22. Los genes candidatos incluyen los que codifican las formas monomórficas y polimórficas de la arilamina N-acetiltransferasa que se localizan en 8p 22. A este respecto se ha demostrado que el fenotipo de acetilación lento, que podría aparecer como consecuencia de la alteración de estos genes, confiere un riesgo aumentado para el desarrollo del cáncer vesical relacionado con el consumo de tabaco y con la ocupación laboral.

La delección del 8p está presente en más del 53% de los tumores vesicales uroteliales infiltrantes por lo que podría ser útil como factor pronóstico. (9)

También se ha descrito un gen homólogo al dominio extracelular del PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas) localizado en la región 8p21.3-22 que podría ser uno de estos genes supresores. (18)

En el cáncer de vejiga, sobre todo en estadios avanzados, se han encontrado alteraciones en el brazo corto del cromosoma 3. En este brazo, concretamente en 3p21-23, se localiza el gen hMLH1 que interviene en el sistema de reparación génica. También se encuentra en este brazo el gen TGFâRII. (19)

Asimismo se han descrito deleciones en 4p, 11p, 14q y 18q; aunque no se han identificado en esas regiones ningún gen que pueda ser sospechoso de inducir la transformación neoplásica de un urotelio de características normales.

Oncogenes en el cáncer vesical

La influencia de los oncogenes en la aparición del cáncer vesical, fue ya sugerida con el descubrimiento del primer oncogén humano, que era un homólogo del oncogén Ha-ras, aislado de la línea T24 de cáncer vesical humano. Este oncogén produce, mediante transfección, la transformación de los fibroblastos murinos, los cuales eran tumorigénicos en los ratones atímicos. Esto hizo pensar que esta familia de oncogenes, que codifican una p21 con actividad GTP-asa, eran el principal factor causal del cáncer de vejiga. Diversos estudios posteriores demostraron que la activación de esta familia de oncogenes sólo se produce del 7-17% de los tumores vesicales.

Algún estudio muestra aumento de la expresión del c-myc en algunos tumores vesicales de alto grado, pero se precisan más estudios a este respecto.

El c-erb-2 es un protooncogén, localizado en el cromosoma 17, que codifica una glicoproteína transmembranosa de estructura similar al EGFr. Se ha encontrado amplificado en un 20% de las neoplasias vesicales, mientras que el aumento de su expresión se puede encontrar en el 60% de estos tumores, correlacionándose ambos hechos con un peor grado histológico.

El interés en averiguar el papel del factor de crecimiento epidérmico (EGF) en las neoplasias uroteliales, ha hecho que se preste mucha atención a la familia de oncogenes erb. El oncogén c-erb-1, localizado en el cromosoma 17, codifica el receptor del EGF (EGFr). Se trata de una glicoproteína transmembrana de 170 Kd que está amplificada en líneas celulares de cáncer de mama y en carcinomas escamosos. Sin embargo, hasta

ahora, sólo se ha podido demostrar su amplificación en un escaso número de neoplasias vesicales.

El cáncer de vejiga constituye un excelente campo de estudio para investigar el papel del EGF en la aparición y crecimiento de neoplasias, por varios motivos:

1. - El cáncer de células transicionales es un tumor frecuente y altamente representativo de las neoplasias humanas.

2. - La orina es una rica fuente de EGF, biológicamente activo.

3. - El epitelio vesical tiene una tasa de división y de recambio lenta, indicando que está protegido, en condiciones normales, de los efectos del EGF urinario.

4. - La aparición del carcinoma de células transicionales está fuertemente unida a la carcinogénesis química, particularmente a la aparición de inductores del crecimiento en orina, y el EGF tiene un papel importante en el crecimiento tumoral.

Los receptores para el EGF, normalmente, sólo se encuentran en la membrana basal de las células epiteliales vesicales, sin embargo en las células neoplásicas estos receptores se expresan también, en gran cantidad, en la zona superficial de la célula. Esta distribución de los receptores en las células malignas permite un mayor acceso del EGF urinario a las células neoplásicas, lo cual podría estar relacionado con su crecimiento. Sin embargo, esta distribución anómala de los receptores también aparece en otras células normales. La explicación a esto debe estar en que barreras poco conocidas evitan el contacto del EGF con su receptor, o que este contacto no es suficiente para inducir la proliferación.

Los últimos estudios realizados para encontrar respuesta a estas cuestiones se han dirigido al proceso de internalización. Una vez que el EGFr se ha unido al EGF, deja

su localización en la membrana y rápidamente pierde su capacidad para iniciar respuestas mitogénicas. De este modo, Sidransky encuentra que las células uroteliales normales internalizan este complejo, EGF-EGFr, más rápidamente que las células uroteliales transformadas. Al no internalizar este complejo rápidamente, el dominio tirosin-quinasa del EGFr, permanece en la posición "on" durante más tiempo, resultando en un periodo de estimulación más prolongado (20).

Estudios en líneas celulares, han demostrado que cuando se reduce el pH del cultivo desde 7.5 a 5, el número de EGFr no cambia, pero la afinidad por el EGF disminuye en un 95%. Asimismo, la estimulación del crecimiento celular, por el EGF, a un pH de 7.5 es suprimida a un pH de 7 o menor; mientras que la tasa de crecimiento en ausencia de EGF no varía a pH bajo. Estos hallazgos sugieren que la acidificación urinaria puede ser útil en el manejo y prevención de las recurrencias en el cáncer vesical. (21)

Existen 3 proto-oncogenes que se sitúan proximalmente en el brazo largo del cromosoma 11 (int-2, hst1 y bcl-2). Int-2 y hst1 codifican productos que forman parte de los factores de crecimiento fibroblástico, mientras que bcl-2 juega un papel importante en la muerte celular programada o apoptosis. El gen p53 induce la apoptosis a través de la activación del gen Bax, cuya proteína interactúa y antagoniza la función de bcl-2. De este modo Bax estimula la apoptosis y bcl-2 la inhibe. La amplificación de estos tres proto-oncogenes se encuentra en el 7-20% de los tumores vesicales, no habiéndose encontrado asociación con el grado del tumor.

Genes supresores en el cáncer de vejiga

Entre los genes supresores tenemos al gen Rb que se localiza en el cromosoma 13q14 y que está inactivado en un tercio de los tumores vesicales. Este gen codifica una fosfoproteína nuclear de 105 Kd cuya función es la regulación del ciclo de replicación celular, mediante el secuestro de proteínas que poseen capacidad de unión al ADN y de transactivación (factor de transcripción E2F). Durante la replicación celular se fosforila por la actuación de los complejos ciclina-quinasa ciclina dependientes (cicl-Cdks), liberando los productos secuestrados que permiten que se realice la transición de G1 a S (*Figura 5*).

La pRb también puede formar complejos que inhiben su función con proteínas oncovirales (E1A de adenovirus, E7 de papilomavirus).

El gen supresor MTS1 (Multiple Tumor Supresor gene 1) también denominado CDK4A o CDKN2, localizado en 9p, codifica una proteína de 148 aminoácidos, llamada p16, que inhibe la fosforilación de la pRb, mediante la formación de complejos de p16 con las quinasas ciclina dependientes (Cdks) Cdk4 y Cdk6 (*Figura 5*). (22) Se han apreciado alteraciones estructurales de este gen en muchos tumores además de los vesicales (cáncer de esófago, páncreas, melanoma, etc.). (23)

El gen MTS2 que codifica la p15 (137 aminoácidos), se sitúa también en el brazo corto del cromosoma 9 y adyacente al anterior y su proteína (homóloga a la p16) actúa también inhibiendo la fosforilación de pRb mediante la inactivación de Cdk4 y Cdk6. Mientras que la p16 parece estar controlada por señales internas la p15 lo está por el

factor de crecimiento tumoral β (TGFB), siendo sus mecanismos de regulación negativa externos. Las alteraciones de estos genes suelen ir asociadas y se correlacionan con estadios tumorales iniciales y grado tumoral bajo. La reintroducción del gen Rb en líneas celulares de cáncer vesical induce una disminución del crecimiento de estas células. Se ha encontrado una disminución de la supervivencia en los pacientes que poseen un cáncer vesical con expresión heterogénea o ausente de Rb, frente a los que presentan expresión positiva.

El gen que produce la p14^{ARF} forma parte de la familia de genes reguladores del ciclo celular y se localiza también en el cromosoma 9p21, cerca del exón 1 del p16. Este gen comparte el mismo exón 2 que p16, pero debido a una estructura de lectura alternativa p16 y p14^{ARF} no tienen una secuencia de aminoácidos similar. De este modo p14^{ARF} no se une a las CDKs. Su sobreexpresión conduce a la detención del ciclo celular en G1 (*figura 5*). Es frecuente encontrar su delección unido al gen de la p16 en los carcinomas vesicales de células escamosas. (24)

Recientemente se ha localizado el gen p18 que se presenta en el cromosoma 1 y que codifica una proteína que forma complejos estables con Cdk4 y Cdk6 inhibiendo así la fosforilación de pRb.

Otro gen de este tipo es el WAF1 o CIP1 que produce la p21, cuya función es inactivar los complejos ciclina A/E cdk2 y ciclina D1/D2/D3-cdk4, impidiendo la entrada de las células en fase S.

El gen WAF1 está sometido al control de la p53 de modo similar a lo que sucede con MDM2.

La proteína p27 (cromosoma 12) responde como p15 a estímulos externos mediados por el TGFB, provocando la detención del ciclo en G1. Posee cierta homología con p21, pero su transcripción no es regulada por la p53. (25)

Las pérdidas del cromosoma 17p son comunes en muchos tipos de tumores. Los primeros estudios, que fueron realizados en el cáncer de colon, revelaron que en este cromosoma (17p13.1) se sitúa un gen supresor que codifica la proteína p53 de 53 Kd, compuesta por 393 aminoácidos, y que se une fuertemente a la subunidad α de la ADN polimerasa, al antígeno E1B de los adenovirus y al antígeno E6 de los poliovirus. Las pérdidas del 17p y las mutaciones del gen P53 se observan, con elevada frecuencia, en tumores vesicales de alto grado; mientras que son más raras en los superficiales.

Sidransky pudo apreciar que estas alteraciones en el gen p53 también podían determinarse analizando las células obtenidas del sedimento urinario. De este modo podríamos disponer de una prueba diagnóstica eficaz para las recidivas de las neoplasias uroteliales. (26)(27)

Una de las funciones primordiales de la p53 es la regulación de la replicación celular identificando posibles errores en este proceso y parando el ciclo en la fase G1 cuando los detecta, para evitar que estos errores se reproduzcan en la fase S. Si los fallos del genoma son irreparables la p53 puede activar la transcripción del gen BAX, que inicia el proceso de la apoptosis celular. Este efecto es el responsable de la baja posibilidad de propagación de las células mutantes, previniendo la formación del cáncer.

La proteína p53 puede ser inactivada por:

1. -Delecciones o mutaciones del gen que la codifica. Las mutaciones conllevan la producción de una proteína anormal, que inactiva la proteína normal (wild), mediante la formación de polímeros con ella. La proteína p53 mutada posee una vida media superior a 20 veces la de la p53 wild y se acumula en el núcleo celular, donde es detectable mediante inmunohistoquímica. Estudios "in vitro" han demostrado que la transfección de la p53 mutada induce el crecimiento tumoral, mientras que la transfección de la p53 normal (wild) suprime la transformación e incluso el crecimiento de muchas líneas celulares.

No se ha demostrado que el humo del cigarro altere significativamente la incidencia de mutaciones del P53, aunque si parece aumentar la extensión del daño en el ADN cuando aparece la mutación.

Las mutaciones del p53 pueden ser endógenas, como en el caso de la deaminación de la 5-metilcitosina a timidina, o por daño directo del ADN producido por exposición a carcinógenos. En los tumores vesicales el mecanismo parece ser mixto.

En el síndrome de Li-Fraumeni, que cursa con la aparición de varios tumores, entre los que se encuentran tumores de mama, sarcomas de tejidos blandos, tumores cerebrales y leucemias, se han encontrado mutaciones de p53 en líneas celulares germinales.

2. - Formación de complejos con proteínas oncovirales (proteína E6 del papilomavirus).

3. - Proteínas celulares como la mdm2, producto del protooncogén MDM2 que se unen al extremo aminoterminal de la p53 en el núcleo formando complejos estables e

inactivando las funciones de la p53 mediante su transporte, formando parte del complejo mdm2 / p53, hasta el citoplasma donde no puede ejercer ninguna influencia sobre la transcripción. Consecuentemente MDM2 protege a las células normales de la sobreexpresión de la p53.

4. - Mutaciones en los genes que codifican a las proteínas reparadoras de los desapareamientos (MMR), son al parecer una de las causas de la aparición de mutaciones a lo largo del genoma. Las mutaciones en estos genes se traducen en alteraciones del número de repeticiones de los microsatélites, originando así su inestabilidad en cuanto al número de repeticiones.

El gen MDM2 se localiza en el brazo largo del cromosoma 12 y está amplificado en algunos tumores, funcionando como un oncogén. La proteína que codifica tiene un PM de 90 KD, por lo que se la denomina p90.

A su vez la transcripción del MDM2 está regulada por la proteína p53. De este modo el daño del genoma aumenta la síntesis de p53, que a su vez inicia la transcripción de MDM2. Cuando se llega a niveles muy altos de p53 ya se ha producido suficiente mdm2 como para detener el proceso. Pero si mdm2 fuera producida, anómalamente, en grandes cantidades (por amplificación génica) la p53 estaría constantemente inactivada por lo que el ciclo celular perdería uno de sus principales reguladores.

Existen dos vías interrelacionadas que involucran varias moléculas comunes para mantener el control del punto G1 y la respuesta al daño en el ADN o a una señal mitogénica inadecuada en la célula normal. El centro neurálgico de estos mecanismos de control es el locus INK4A/ARF y las dos proteínas codificadas por éste, la p16 y la

p14ARF (alternative reading frame). En una vía la p16 inhibe la actividad de los complejos CDK / ciclina que actúan fosforilando la proteína Rb. La pRb fosforilada no puede unirse al factor de transcripción E2F1; y el E2F1 libre inicia la transcripción de los genes necesarios para la entrada en la fase S. En la segunda vía la p14ARF actúa estabilizando la p53. Se ha demostrado que la p53 induce la detención de la fase G1, o la apoptosis dependiendo del tipo celular y esto ocurre mediante la sobreexpresión de otro inhibidor CDK, la p21/WAF1. El mecanismo de estabilización de la p53 por medio de la p14ARF parece ser a través de la unión a MDM2 y promoviendo la degradación de ésta última (una proteína que interactúa con la p53 y se une a ella para una rápida degradación a través de la vía de la ubiquitina). Otro nivel de control se ha puesto de manifiesto con el descubrimiento de que la expresión de p14ARF es regulada por el factor E2F1, proporcionando así un control feedback del complejo CDK4 / ciclina D1 mediante la p53.

Teóricamente se puede escapar del punto de control G1 por la inactivación del gen Rb o INK4a o por sobreexpresión del gen CCND1 (protooncogén situado en 11q13 que produce la ciclina D1). En realidad también es necesaria la inactivación del gen TP53 o de la proteína p14ARF para inutilizar este mecanismo de seguridad. (*figura 5*)

Una de las predicciones de este modelo es que la desregulación completa de estas vías requiere la inactivación del gen p53 o INK4A y del p14/ARF o del TP53. Otra predicción es que la alteración aislada del gen p53 o del Rb conducirá a la misma pérdida de control de crecimiento pero que el fenotipo tumoral creado será menos agresivo que cuando ambas vías están alteradas (10)(28).

Se ha comunicado también que el descenso en la expresión de glicoproteínas transmembrana como la E-caderina, que regulan la adhesión intercelular y de este modo el crecimiento y división celular, puede estar implicado en el desarrollo de la neoplasia y de sus metástasis. La E-caderina se une a las proteínas del citoesqueleto a través de interacciones con un grupo de proteínas citoplasmáticas conocidas como cateninas, que unen la porción intracelular de las caderinas con el citoesqueleto. Además de su función en la adhesión celular también parecen controlar la polaridad celular y la morfología tisular.

Historia natural del cáncer vesical a nivel genético

La aclaración de la historia natural del tumor de células transicionales se hace difícil debido al hallazgo habitual de varias lesiones simultáneamente en la misma vejiga y al desarrollo de tumores nuevos o recurrentes en los mismos o diferentes sitios durante el curso de la enfermedad. La dificultad de interpretar la evolución de tales tumores contrasta con la situación en otros tejidos en los que la norma es un único tumor primario. (29)

La naturaleza multifocal de la enfermedad ha llevado a un grupo de investigadores a afirmar que existiría un “defecto de campo” por el que la exposición de múltiples sitios al mismo carcinógeno conduciría al desarrollo de diferentes lesiones en distintos sitios. Otros investigadores abogan por un modelo de clones en el que una única célula original es alterada y a partir de ahí difunde dentro del epitelio por diversos mecanismos.

Si resumimos cual puede ser la secuencia de eventos, en el ámbito genético en el cáncer de vejiga, la delección del 9q puede representar el factor inicial de la transformación del urotelio normal a tumor transicional superficial y en la progresión del carcinoma in situ a un tumor vesical infiltrante; a partir de ahí, la pérdida del 11p, junto con la del 17p, con lo cual se altera la expresión de p53, puede causar su evolución hacia un tumor invasor. La alteración del 17p partiendo de un tejido urotelial normal puede conducir también a la aparición de un carcinoma in situ (30). Una vez aparecido el tumor urotelial infiltrante las pérdidas del 13q (gen del Rb), 3p, 6q, 18q, o la pérdida del Rb pueden condicionar la aparición de metástasis. (Figura 6)

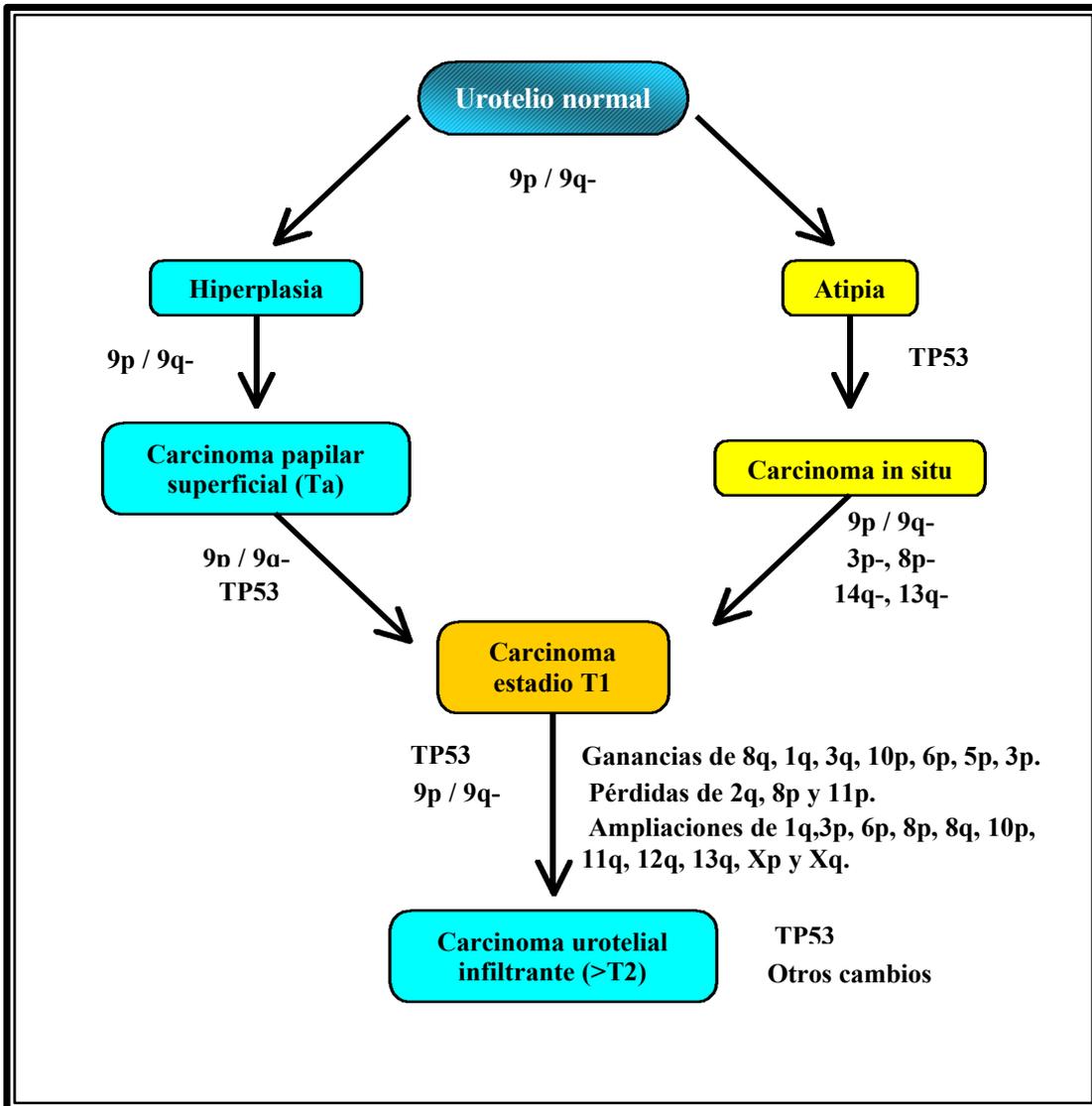


Figura 6: Modelo de progresión de los tumores de células transicionales basado en observaciones histopatológicas y de biología molecular.

Terapia génica en el cáncer vesical

De momento la información obtenida con el estudio en el ámbito molecular de los tumores vesicales se ha utilizado especialmente en el campo del diagnóstico precoz y pronóstico de estas neoplasias, estando en fase de estudio y experimentación la posibilidad de aplicar la terapia génica en el tratamiento rutinario de estos tumores.

El tratamiento ideal contra el cáncer debe eliminar el tejido tumoral sin dañar al tejido circundante. Para conseguirlo el vector usado en la terapia génica debe concentrarse en el tumor, ser activo selectivamente en el tumor, matar específicamente las células neoplásicas, no tener efectos adversos cuando afecta a células normales y ser desactivados una vez que se ha conseguido su propósito. En este sentido el epitelio transicional del urotelio presenta una proteína específica de membrana llamada uroplaquina. El uso del promotor de la uroplaquina puede aumentar la especificidad urotelial de los métodos de terapia génica en el cáncer de vejiga.

Menos del 60% de los pacientes que presentan cáncer de vejiga localmente avanzado tienen una supervivencia de tres años, a pesar de los tratamientos multidisciplinarios con combinaciones de cirugía, quimioterapia y radioterapia. Debido a esto se necesitan nuevas modalidades de tratamiento que nos permitan obtener mejores resultados.

La mejor comprensión de los eventos celulares que conducen al desarrollo y crecimiento neoplásico, junto con los avances experimentados en la tecnología de transferencia genética, han permitido el comienzo del desarrollo de esta modalidad terapéutica.

La terapia génica se basa en la introducción de un gen exógeno en una célula somática con el fin de incrementar la secreción de una proteína específica o reemplazar una proteína anómala. Existe una gran variedad de cascadas moleculares que participan en la tumorigénesis sobre las que se podría actuar mediante la terapia génica. (figura7)

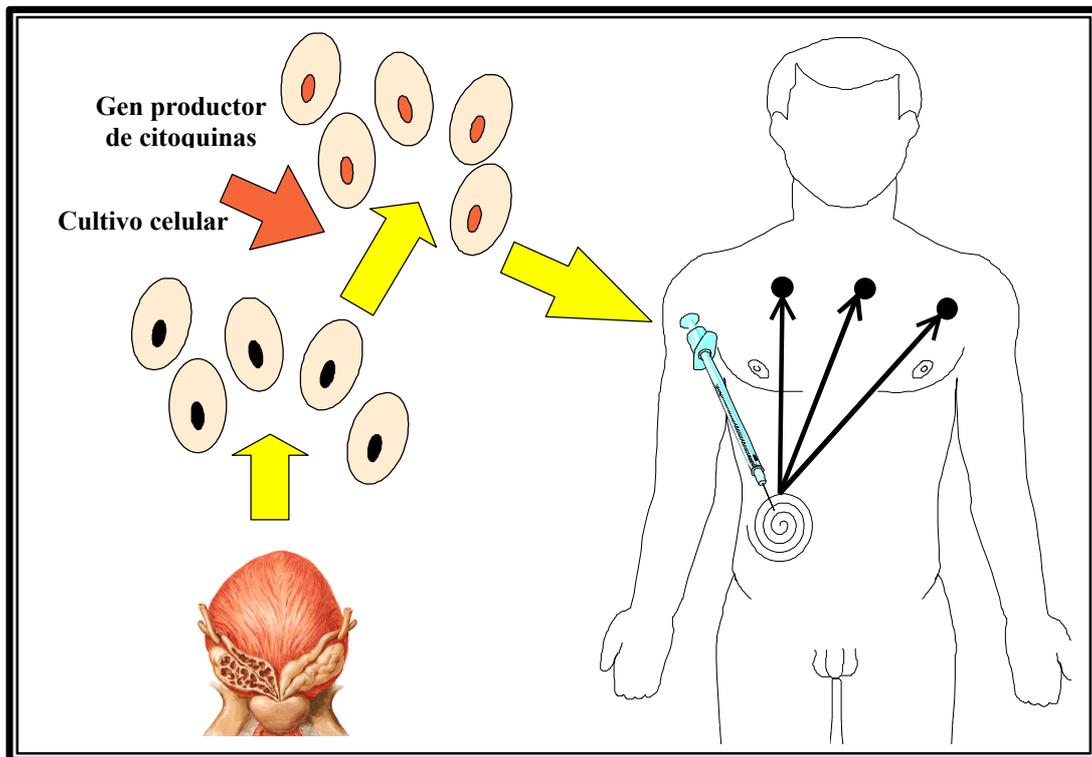


Figura 7: Elaboración de vacunas tumorales mediante la inserción de un gen productor de citoquinas.

Podemos dividir los protocolos clínicos de terapia génica en cinco grupos:

1. Inserción de un gen citotóxico en células tumorales in vitro.

Este sistema usa una vacuna modificada genéticamente para producir citotoxicidad específica antitumoral.

Los linfocitos T8 constituyen la primera barrera antitumoral del sistema inmune. Su activación requiere la presentación del antígeno junto a un receptor del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y la activación de las citoquinas (interleuquina 2, interleuquina 4 e interferón δ) secretadas por los linfocitos T4. La terapia génica persigue la amplificación de este sistema haciendo que las células tumorales secreten citoquinas. Los estudios en modelos tumorales animales han demostrado que estas vacunas modificadas genéticamente pueden producir una potente, específica y prolongada inmunidad antitumoral.

Cuando se obtienen un número suficiente de células tumorales es transferido el gen productor de citoquinas, bien por métodos físicos o víricos. Una vez se ha conseguido un nivel adecuado de expresión génica las células tumorales son irradiadas para prevenir la reproducción del tumor en el sitio de la inyección. Estas células se inoculan en el tejido subcutáneo del paciente (*Figura 7*).

Este tipo de terapia génica, usando el gen productor de interleuquina 2, ha inducido regresión tumoral y aumento de la supervivencia en un modelo de cáncer de vejiga en el ratón. Además, los animales que se curaron fueron resistentes a la inyección posterior de células tumorales de esa línea.

2. Inyección directa de un vector que expresa un antígeno HLA foráneo en el tejido tumoral in situ.

Su objeto es iniciar la respuesta inmune antitumoral. El HLA B7 es el más usado en este tipo de terapia. Las células tumorales expresarán este antígeno con lo que se amplificaría la respuesta inmunológica.

No se han hecho estudios de este tipo en el cáncer de vejiga.

3. Inserción de un gen suicida en las células tumorales.

Se persigue colocar genes en células tumorales que pueden activar selectivamente profármacos no tóxicos, con lo que se generan metabolitos tóxicos que originan la muerte celular.

El gen más usado es el que codifica la timidina quinasa del virus herpes simple. Las células en las que se introduce este gen pueden monofosforilar el profármaco ganciclovir con lo que se generan nucleótidos anormales (el análogo de las purinas ganciclovir trifosfato) que bloquean la síntesis del ADN y originan la muerte celular por apoptosis (*Figura 8*).

Un sistema similar utiliza la citosina deaminasa, que convierte el antifúngico 5-fluorocitosina en el antimetabolito 5-fluorouracilo.

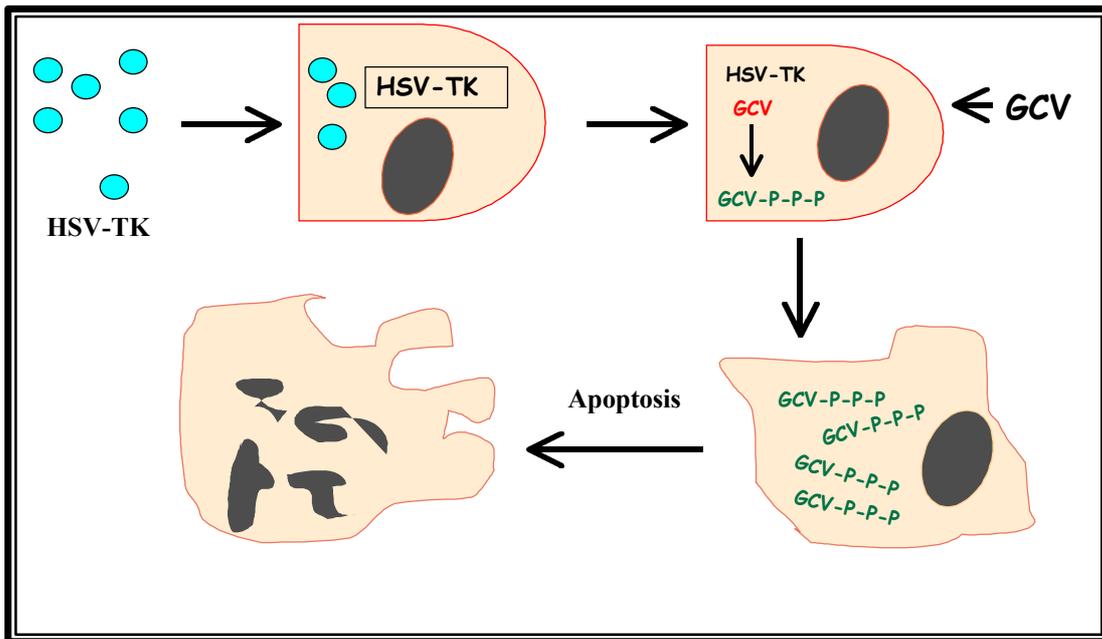


Figura 8: Inserción del gen de la timidina quinasa del virus herpes simple en células neoplásicas.

No es necesaria la incorporación del gen en todas las células tumorales para conseguir una terapia eficaz. Se han descrito respuestas completas en animales en los que sólo existía un 20% de las células tumorales que expresaban el gen introducido. Este fenómeno se denomina efecto bystander. Se ha intentado explicar este comportamiento por varios mecanismos como la transferencia intercelular de productos tóxicos, cooperación metabólica mediante las uniones intercelulares, alteración del árbol de aporte sanguíneo tumoral, apoptosis y respuesta inmunológica celular. (31)

Un problema de este método es que si se inocula el gen a células normales podemos causar su muerte. Para obviar este problema se puede poner la timidina-quinasa bajo el control de un promotor tumor específico, de tal modo que el gen sólo se expresará en la población celular seleccionada.

Se ha realizado este tipo de terapia, usando como vector los adenovirus, en un modelo de cáncer de vejiga en el ratón habiéndose conseguido una significativa inhibición del crecimiento tumoral.

4. Inserción de un gen de resistencia a quimioterápicos en la médula ósea.

Una gran limitación para los regímenes quimioterápicos actuales es la toxicidad medular. El gen MDR-1 (multidrug resistance) codifica una P-glicoproteína de membrana que expulsa los quimioterápicos de la célula con lo que disminuye su concentración intracelular y no alcanzan la dosis tóxica.

La transferencia del MDR-1 en las células normales de la médula ósea de los ratones permite la administración de mayores cantidades de quimioterápicos sin toxicidad asociada.

Aunque no se han hecho ensayos de este tipo en el cáncer de vejiga, si se sabe que el cáncer vesical avanzado es sensible a la doxorubicina, vinblastina y paclitaxel y que el MDR-1 es capaz de expulsar estos quimioterápicos de la célula.

5. Terapia con genes supresores.

Su fin es reemplazar la pérdida de genes supresores o contrarrestar la acción de los oncogenes.

La inoculación de P53 y Rb ha sido eficaz in vitro frente a líneas celulares humanas de cáncer de vejiga. (32)

A pesar de los avances experimentados en la última década en la tecnología de transferencia génica, este paso continua siendo el talón de Aquiles de la terapia génica.

Los métodos de transferencia génica pueden dividirse en físicos y víricos.

1. Entre los víricos se encuentran los retrovirus (los más usados), los adenovirus y el virus del herpes simple, que puede transferir genes de mayor longitud (30 kb de ADN).

Los retrovirus son virus RNA modificados, en los que se han eliminado los genes que codifican las proteínas del retrovirus y se ha implantado el gen elegido para su transferencia. Al no poder sintetizar proteínas virales no son capaces de generar más virus. Son los vectores más usados, porque presentan las siguientes ventajas:

- No son patógenos.
- Se integran en el genoma del huésped.
- Biología bien conocida.
- Eficiencia del 100% en células de rápida división.
- Se puede ensayar en experimentación animal.

Los inconvenientes son la limitada capacidad para insertar ADN del gen elegido (<10Kb de ADN) y su incapacidad para infectar células que no se encuentran en el periodo de división.

Se han usado como medio de transferencia génica en modelos de cáncer de vejiga en ratones.

Dentro del grupo de los adenovirus el más usado es el adenovirus tipo 5. En este virus se reemplazan las regiones E1A y E1B por el gen que ha de ser transferido. La ausencia de estas regiones permite que el virus no se multiplique en la célula huésped.

En el caso de los adenovirus el genoma del virus no permanece mucho tiempo en el genoma del huésped, por lo que su efecto es breve. Su eficiencia en la infección es muy alta, puesto que infectan células tanto las células que están en proceso de división, como las que no lo están, por lo que pueden infectar células refractarias a los retrovirus. Otra ventaja es que este grupo de virus presenta un tropismo especial por el epitelio

vesical. Su mayor desventaja es la creación de una reacción inmunológica que dificulta la repetición de la transfección.

Se han descrito respuestas muy favorables tras la terapia génica con adenovirus en líneas de cáncer de vejiga en ratones.

La inserción puede realizarse in vivo, siendo menos eficiente que la forma in vitro, pues produce una mayor reacción inmunológica. La forma in vitro es la más usada y permite la manipulación genética.

2. Como vectores físicos se usan:

- La electrotransfección.
- Los proyectiles génicos.
- Los liposomas.

La electrotransfección consiste en someter a las células a un intenso campo eléctrico en breve tiempo con lo que se altera la permeabilidad de la membrana y permite que el ADN deseado penetre en la célula.

Para el uso de los proyectiles génicos nos basamos en que el oro y el tungsteno se unen al ADN espontáneamente, formando microesferas metálicas que al ser impulsadas sobre un cultivo celular, pueden integrar el ADN en el genoma celular.

La lipotransfección es el método físico de transferencia génica más usado. El ADN forma complejos con los liposomas mediante interacciones de carga eléctrica y estos se unen a la membrana celular, que está cargada negativamente, permitiendo la introducción del ADN en la célula. Los liposomas cargados positivamente (catiónicos) son más efectivos que los que no están cargados. Las ventajas de este método son su simplicidad y capacidad de uso con una gran variedad de células tumorales in vitro.

Entre sus desventajas están la eficiencia variable de transfección y su baja tasa de eficiencia in vivo.

Se ha realizado la transfección mediante liposomas del gen productor de interleuquina 2 en una línea de cáncer de vejiga en el ratón obteniendo un aumento de su supervivencia. Sin embargo, la eficacia de la transfección es baja posiblemente por la presencia de glicosaminoglicanos bajo el epitelio transicional, los cuales inhiben este tipo de transfección

Aunque hemos experimentado un gran avance en el conocimiento de la biología molecular del cáncer, han de producirse aún grandes adelantos en el conocimiento de los diversos oncogenes y genes supresores, y como se interrelacionan, antes de que estos descubrimientos nos sirvan para desarrollar nuevas terapias para luchar contra el cáncer. De cualquier modo, los conocimientos adquiridos hasta ahora nos permiten usar estos hallazgos como factores pronósticos en la evolución de estos tumores, lo cual facilita la elección de una terapia más o menos radical en cada caso.

Microsatélites

El descubrimiento de los microsatélites ha permitido realizar grandes avances en el estudio del genoma humano. Los microsatélites son repeticiones en tándem, habitualmente entre 15 y 30 veces, de cortas secuencias de nucleótidos. (33)

Los microsatélites pertenecen al grupo del ADN no codificante, que comprende:

- Secuencias satélite: repeticiones de nucleótidos que oscilan en un rango entre 5 y 100 bases y se organizan en grupos de 100 megabases. Se localizan en la heterocromatina, cerca de los centrómeros y los telómeros, y no varían su tamaño dentro de la población como los otros miembros de su familia.
- Secuencias minisatélite: repeticiones de nucleótidos que oscilan en un rango entre 15 y 70 bases y se organizan en grupos de 0.5 a 30 kilobases. Se encuentran en las regiones eucromáticas del genoma y tienen alta variabilidad de su tamaño dentro de la población.
- Secuencias microsatélite: repeticiones de nucleótidos que oscilan en un rango entre 2 y 6 bases y se organizan en grupos de tamaño variable (media de 100 bp). Se localizan en la zona eucromática del genoma como extensiones de secuencias alternantes dT-dG de longitud variable. Siguen una transmisión de tipo Mendeliano codominante. En orden decreciente según su abundancia nos encontramos con dA, dA-dC, dA-dA-dA-dN, dA-dA-dN y dA-dG. Forman una parte importante de la creciente familia de secuencias

repetitivas de ADN, ampliamente representadas en el genoma humano. Debido a su ubicuidad, tipabilidad mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa), tipo de herencia y gran polimorfismo, los microsatélites han asumido un papel, cada vez más importante, como marcadores en el genoma.

Teóricamente existen 4, 16, 64, 256, 1024 y 4096 posibilidades para obtener mononucleótidos, dinucleótidos, trinucleótidos, tetranucleótidos, pentanucleótidos y hexanucleótidos diferentes, respectivamente. Sin embargo, como los microsatélites se repiten en tándem, algunas de estas combinaciones son equivalentes a otras, por lo cual las posibilidades se reducen a 2 mononucleótidos, 4 dinucleótidos, 10 trinucleótidos, 33 tetranucleótidos y 102 pentanucleótidos. (34) (tabla1)

Sin tener en cuenta los multímeros (dA)_n, cuyo tamaño es difícil de tipificar por PCR, los microsatélites (dC-dA)_n, tienen entre 35000 y 100000 copias en el genoma humano, pudiendo encontrar una de ellas cada 100000 bp.

Lista de posibles combinaciones de nucleótidos para la formación de microsatélites:

1. **Mononucleótidos (2)**
A C
2. **Dinucleótidos (4)**
AC AG AT CG
3. **Trinucleótidos (10)**
AAC AAG AAT ACC ACG ACT AGC AGG ATC CCG
4. **Tetranucleótidos (33)**
AAAC AAAG AAAT AACC AACG AACT AAGC AAGG AAGT AATC
AATG AATT ACAG ACAT ACCC ACCG ACCT ACGC ACGG ACGT
ACTC ACTG AGAT AGCC AGCG AGCT AGGC ATCC ATCG ATGC
CCCG CCGG
5. **Pentanucleótidos (102)**
AAAAC AAAAG AAAAT AAACC AAACG
AAACT AAAGC AAAGG AAAGT AAATC
AAATG AAATT AACAC AACAG AACAT
AACCC AACCG AACCT AACGC
AACGG AACGT AACTC AACTG AACTT
AAGAC AAGAG AAGAT AAGCC AAGCG
AAGCT AAGGC AAGGG AAGGT AAGTC
AAGTG AATAC AATAG AATAT AATCC
AATCG AATCT AATGC AATGG AATGT
AATTC ACACC ACACG ACACT
ACAGC ACAGG ACAGT ACATC ACATG
ACCAG ACCAT ACCCC ACCCG ACCCT
ACCGC ACCGG ACCGT ACCTC
ACCTG ACGAG ACGAT ACGCC ACGCG
ACGCT ACGGC ACGGG ACGTC ACTAG
ACTAT ACTCC ACTCG ACTCT ACTGC
ACTGG AGAGC AGAGG AGATC AGATG
AGCAT AGCCC AGCCG AGCCT AGCGC
AGCGG AGCTC AGGAT AGGCC AGGCG
AGGGC AGGGG ATATC ATCCC ATCCG
ATCGC ATGCC CCCC G CCGG CCGCG

Tabla 1: posibles combinaciones de nucleótidos para la formación de microsatélites

Aunque están ampliamente distribuidos, no se distribuyen uniformemente en el cromosoma, encontrándose con menor frecuencia en las regiones subteloméricas.

El origen y la función de estas secuencias repetidas no está muy claro. La primera aparición de estas secuencias pudo ser debida al azar (en una secuencia aleatoria la probabilidad de una repetición (dC-dA)₃ es de 1/256) o a partir de una mutación de las secuencias (dA)_n. La prevalencia de las secuencias (dC-dA)_n pueden ser explicadas por la metilación de los residuos dC en la posición 5' de las secuencias dG-dC. Los residuos dC metilados pueden ser desaminados, produciendo la transición de dC a dT. Este proceso puede conducir al aumento de las secuencias 5' dG-dT 3' y por lo tanto de sus secuencias complementarias 5' dC-dA 3'.

La frecuencia con que los cambios en el número de repeticiones aparecen en los locus de los microsatélites es mucho más elevada que las tasas normales de mutación, oscilando entre 10⁻² y 10⁻⁵ por generación.

En un inicio se pensó que estas secuencias tenían un papel funcional en el genoma mejorando gracias a su potencial mutagénico el potencial evolutivo a largo plazo de las especies, bien directamente regulando los genes, o bien indirectamente actuando como dianas para la recombinación génica. Mientras que, generalmente, no se ha adscrito una función específica a estas secuencias de microsatélites, en casos concretos las repeticiones de trinucleótidos CAG son transcritas y se han identificado proteínas que se unen específicamente a repeticiones de di y trinucleótidos.

El estudio de los microsatélites tiene implicaciones muy importantes en varios campos de la ciencia, como son la creación del mapa del genoma humano, el análisis de la pérdida de heterocigosidad en determinadas regiones cromosómicas la identificación personal en el área de la medicina forense y la construcción de árboles evolutivos

humanos. El diseño de buenos microsatélites depende del fin perseguido, y un microsatélite bueno para una finalidad puede ser muy inadecuado para otra. Entre los criterios de su selección destacan su tamaño, su tasa de mutación, su polimorfismo, su abundancia en el genoma, su robustez, la facilidad para integrarse y la ausencia de artefactos inespecíficos. Los microsatélites están implicados en las enfermedades, no sólo como marcadores de riesgo, sino en su etiopatogenia, aportando nuevas ideas en los campos de la herencia no mendeliana; la replicación, reparación y mutación del ADN eucariótico; la regulación de la transcripción génica; y las interacciones entre las proteínas. Estas innovaciones han creado nuevos paradigmas en algunas áreas del conocimiento, entre las que se encuentra la Oncología. (35)

Mecanismos de reparación del ADN

El ADN está continuamente sufriendo daños que, en última instancia, causan el 80-90% de los tumores que aparecen en el ser humano. Habitualmente las células eliminan estas lesiones mediante los mecanismos reparadores del ADN que poseen.

Estos mecanismos fueron descritos originalmente por Kelner y Dulbecco en 1949, quienes apreciaron que la luz visible protegía a los microorganismos de los efectos letales de la radiación ultravioleta. En 1958 Rupert demostró que este fenómeno, denominado fotorreactivación, era catalizado por un enzima que llamó ADN fotoliasa. La función de este enzima era corregir los daños producidos en el ADN por la luz UV (formación de dímeros de timina) mediante la transformación de la energía luminosa en química. Sin embargo, la fotoliasa no es imprescindible para la supervivencia de las especies, pues muchas de ellas, incluyendo la humana, no la producen. Por otro lado existe otro mecanismo reparador del ADN, descubierto en 1964 por Setlow y Carrier, que está presente en todos los organismos vivos y se denomina reparación por excisión de nucleótido.

Mediante la reparación por excisión se elimina el nucleótido dañado y se sustituye por uno normal usando la cadena complementaria a modo de molde.

La extirpación de la base anómala se realiza en dos fases. En la primera el nucleótido es liberado por una ADN glicosilasa y posteriormente el terminal AP es escindido por una AP endonucleasa.

Los nucleótidos escindidos son liberados de la doble cadena de ADN y los huecos resultantes son llenados para completar la reparación del ADN. Esta reacción de

reparación tiene un campo de acción limitado, porque la ADN glicosilasa que inicia la reacción debe estar en íntimo contacto con la lesión durante la catálisis.

El patrón de incisión e incluso el tamaño de los fragmentos extirpados es diferente dependiendo de si se trata de un organismo procariótico o de un organismo eucariótico. Tanto los eucariotas como los procariotas hidrolizan el quinto enlace fosfodiéster en el terminal 3'. Sobre el terminal 5' los procariotas hidrolizan el octavo enlace fosfodiéster y los eucariotas el vigesimocuarto. Esta actividad nucleásica se ha llamado excinucleásica para diferenciarla de las actividades endo y exonucleásica.

En los humanos y en la *Escherichia Coli* la excinucleasa es el único sistema enzimático capaz de remover estos segmentos de ADN; que incluyen los dímeros carcinógenos de ciclobutano de los dímeros de timina inducidos por la radiación ultravioleta, los de benzopireno y guanina originados por el humo del tabaco y los de psoraleno, guanina y cisplatino inducidos por la quimioterapia. Estas lesiones importantes no son el único sustrato de la excinucleasa, sino que también actúa sobre otras lesiones que no distorsionan la hélice del ADN, como la O⁶ metilguanina y otras bases metiladas. Un efecto secundario de su amplio espectro de acción es que la excinucleasa puede escindir el nucleótido desapareado de ambas cadenas de ADN, por lo que a veces pueden fijar la mutación más que evitarla. Es decir, la excinucleasa lo repara todo causando en algunas ocasiones como resultado una acción perjudicial para la célula. Afortunadamente la acción de la excinucleasa en los desapareamientos es bastante ineficaz si la comparamos con las del verdadero sistema reparador de desapareamientos, por lo que las posibles mutaciones causadas por la excinucleasa no aumentan significativamente la carga mutacional de las células.

Aunque las excinucleasas eucarióticas y procarióticas realizan la misma función sus subunidades no son en absoluto homólogas. En la *Escherichia Coli* son necesarias tres proteínas para realizar esta función (UvrA, UvrB y UvrC). La UvrA es una adenosina trifosfatasa que actúa a modo de proteína reconocedora del daño génico y como promotor molecular. La UvrA forma un complejo A2B1 con la UvrB y se une a la zona de ADN lesionada, desenrollando el ADN y causando un cambio conformacional en la UvrB que le permite formar un complejo con la zona lesionada. Posteriormente la UvrA se separa del complejo entre la UvrB y el ADN, el cual constituiría un sitio específico de unión para el UvrC. Después de la unión de la UvrC, la UvrB realiza una incisión en el extremo 3' del complejo que causa un cambio en la conformación de éste, permitiendo a la UvrC realizar una incisión en el extremo 5'. La helicasa II (UvrD) libera, a continuación, el oligómero escindido. Posteriormente la ADN polimerasa I desplaza la UvrB y rellena la zona extirpada.

El mecanismo de acción de la excinucleasa humana es más complejo y requiere de la participación de al menos 17 polipéptidos. La XPA es la proteína que reconoce el daño génico y se une al heterodímero XPF-ERCC1 y a la proteína HSSB, que se une al sitio dañado. La XPB y la XPD poseen una actividad helicasa y son subunidades del factor de transcripción TFIIH, el cual es reclutado hasta la zona dañada por la XPA. La XPC y la XPG están también asociados al TFIIH. La hélice es desenrollada por el TFIIH, permitiendo así a la XPG y a la XPF hacer las incisiones en los extremos 3' y 5' respectivamente. La zona escindida será rellenada por las enzimas Pol α y Pol δ . (*Figura 9*)

Existen tres enfermedades relacionadas con la aparición de defectos en este sistema de reparación en los humanos. Tales enfermedades son el xeroderma pigmentoso, la tricotodistrofia y el síndrome de Cockayne. (36)

El estudio molecular de los sistemas responsables del mantenimiento de la integridad genética comenzó hace más de 20 años con la identificación de unos mutantes de *Escherichia Coli* que tenían una elevada tasa de mutaciones espontáneas. Los defectos genéticos que poseían estas cepas inactivaban los sistemas encargados de evitar estas mutaciones que son fundamentales para mantener la estabilidad genética. Las proteínas MutH, MutL, MutS y MutU son el producto de la transcripción de cuatro genes que forman parte de este sistema protector de la *E. Coli* y que le aseguran la precisión de la replicación y recombinación genética.

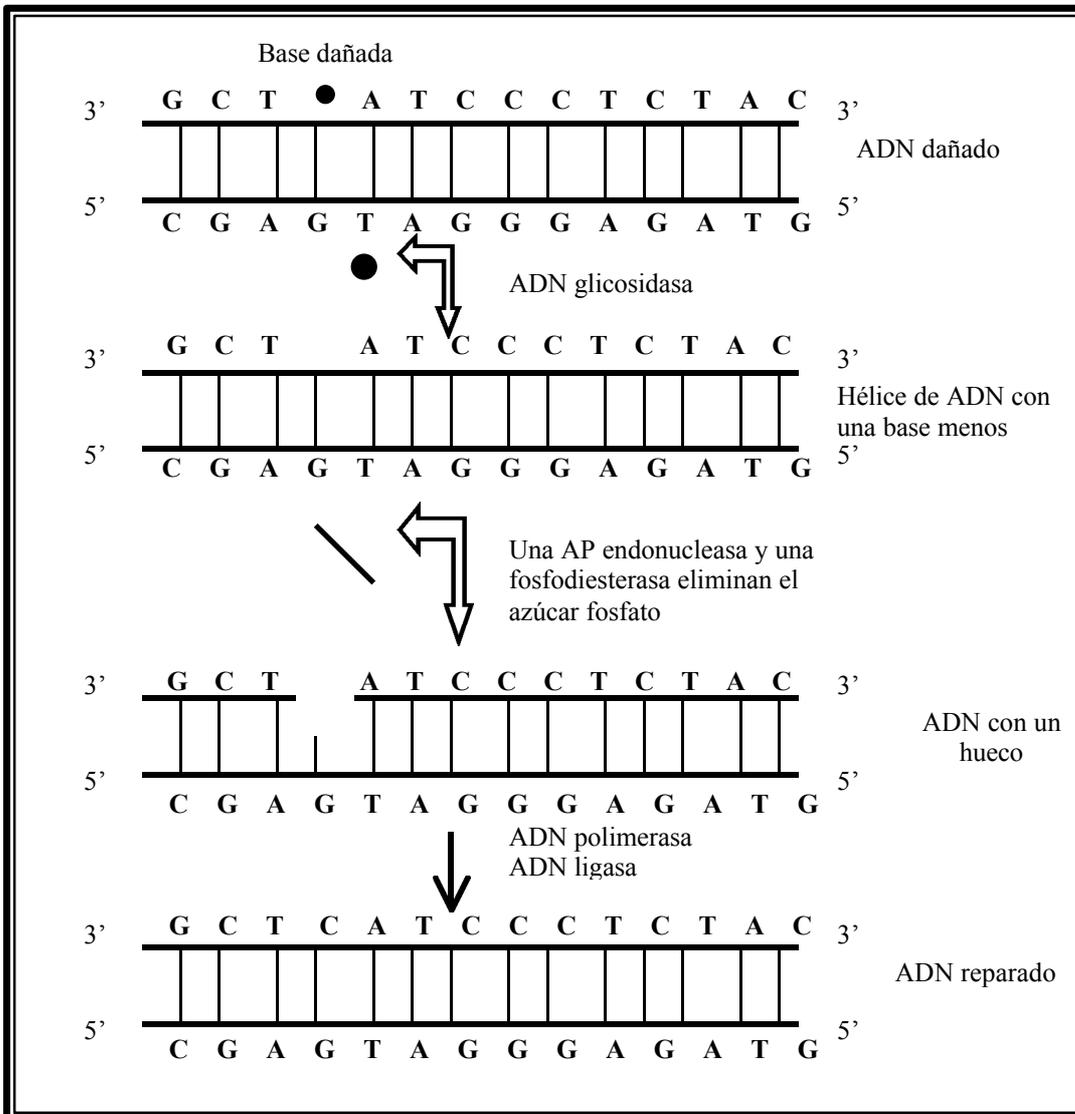


Figura 9: Reparación por excisión de base (eucariotas).

Las células humanas reparan con mayor rapidez las regiones transcritas que las no transcritas y en ellas más la cadena de ADN que sirve de molde a dicho proceso que la cadena de ADN complementaria. Esta reparación preferencial se denomina reparación asociada a la transcripción.

Los errores en la replicación y recombinación producen anomalías en el apareamiento de bases dentro de la hélice de ADN. Estas anomalías violan las leyes de apareamiento de Watson y Crick que especifican que las bases púricas, adenina y guanina, de una cadena deben alinearse con las pirimidínicas, Timina o Citosina respectivamente, en la cadena complementaria.

Es relativamente frecuente la presencia de errores en la cadena de ADN, tales como la inserción de una base no complementaria o la inserción de algún nucleótido extra. El sistema reparador de los desapareamientos de base debe reconocer estos errores y eliminarlos.

En *E. Coli* este proceso es iniciado por la unión de la proteína MutS a la zona del ADN que contiene el error. A continuación se une la MutL formando un complejo que conduce a la activación de una GATC endonucleasa asociada a la proteína MthH. Esta endonucleasa reconoce el sitio GATC hemimetilado y produce una mella en una, o las dos secuencias hemimetiladas que flanquean el desapareamiento. Posteriormente una ADN helicasa II (MutU) desplaza el fragmento erróneo del ADN y la ADN polimerasa I rellena el hueco en el ADN.

Además de su papel en la corrección de errores en el ADN las proteínas MutS y MutL también aseguran la fiabilidad de la recombinación genética. (37)

Dada la importancia de estos sistemas de reparación de desapareamientos para la estabilidad del genoma bacteriano, no es sorprendente que se hayan identificado sistemas homólogos en células de organismos superiores, entre las cuales se encuentran las humanas. En este sentido se han cultivado líneas celulares humanas con un gran índice de mutaciones que poseían un defecto en este sistema reparador.

Se observó, también, que ciertos tumores esporádicos (colon, páncreas, estómago, mama, próstata, intestino delgado y vejiga) y prácticamente todos los tumores asociados con el síndrome de Lynch o HNPCC (síndrome de cáncer colorrectal hereditario) tenían una gran tendencia a acumular mutaciones en un rango que superaba al de las células normales en más del 100%. (38)

Detección de inestabilidad genómica mediante el análisis de microsatélites

La detección de una alteración genética, ya sea pérdida de heterocigosidad, inestabilidad de microsatélites, o ambas, en una muestra de ADN demuestra la presencia de un clon celular que porta una información genética alterada, lo cual es característico de las células cancerígenas. (39)

La mayoría de las células cancerosas, si no todas, comparten una profunda inestabilidad genómica que puede inducirse a través de dos vías moleculares, la vía supresora y la vía mutadora. A la vía supresora le acompaña una inestabilidad cromosómica; a la vía mutadora, una inestabilidad de microsatélites.

La inestabilidad cromosómica se manifiesta por el desarrollo de tumores aneuploides, es decir, que han perdido su constitución diploide. Estos tumores se caracterizan por presentar pérdidas frecuentes de heterocigosidad en múltiples locus, así como mutaciones que activan oncogenes o inactivan genes supresores.

Los tumores de la vía mutadora se caracterizan por la acumulación de millones de mutaciones en microsatélites, manifestando el fenotipo mutador de microsatélites (microsatellite mutator phenotype o MMP). Este concepto fue introducido por Loeb para explicar la presencia en las células tumorales de un número de mutaciones muy superior del que cabría atribuir a la frecuencia espontánea de mutaciones de las células normales. (40)

La presencia de esta cantidad elevada de mutaciones que aparecían en todas las células del tumor condujo a la conclusión de que los mecanismos de reparación de estas

células estaban alterados. De todo esto se deducía que las mutaciones en los microsatélites eran consecuencia de otras mutaciones en otros genes que se ocupaban de la reparación del genoma. Por esto las mutaciones en los microsatélites fueron denominadas mutaciones mutadoras.

La tasa de mutación de los microsatélites es muy superior a la encontrada en otras zonas del genoma. Por esto ante la presencia de una alteración en los genes que se ocupan de la reparación del ADN los microsatélites serán un buen marcador de esta situación de inestabilidad genética; presentando en estos casos una alta tasa de expansión y contracción de sus secuencias. (41)

Se observó que las inserciones o deleciones de una sólo unidad de repetición, por ejemplo en microsatélites de mononucleótidos (A) o dinucleótidos (CA), eran más frecuentes que las de dos unidades de repetición (AA o CACA) y éstas más frecuentes que las inserciones o deleciones de tres, y así sucesivamente.

Esto confirmaba que estos errores se originaban por un fallo de corrección de los errores cometidos espontáneamente durante la replicación de las secuencias repetidas. Concretamente se produce una alineación desigual al deslizarse una cadena sobre la complementaria. Este fenómeno de deslizamiento (slippage) fue descubierto por Streisinger en 1966. El desapareamiento de las dos cadenas suele producir bucles de una unidad de repetición cuando la hebra de ADN volvía a plegarse. Estos bucles de nucleótidos originaban la aparición de mutaciones cuando estas formas intermedias desapareadas se replicaban. Estos desapareamientos originaban inserciones si el bucle se originaba en la cadena de ADN que hacía de molde o deleciones si se formaba en la cadena copiada. (42) (43) (figura 10)

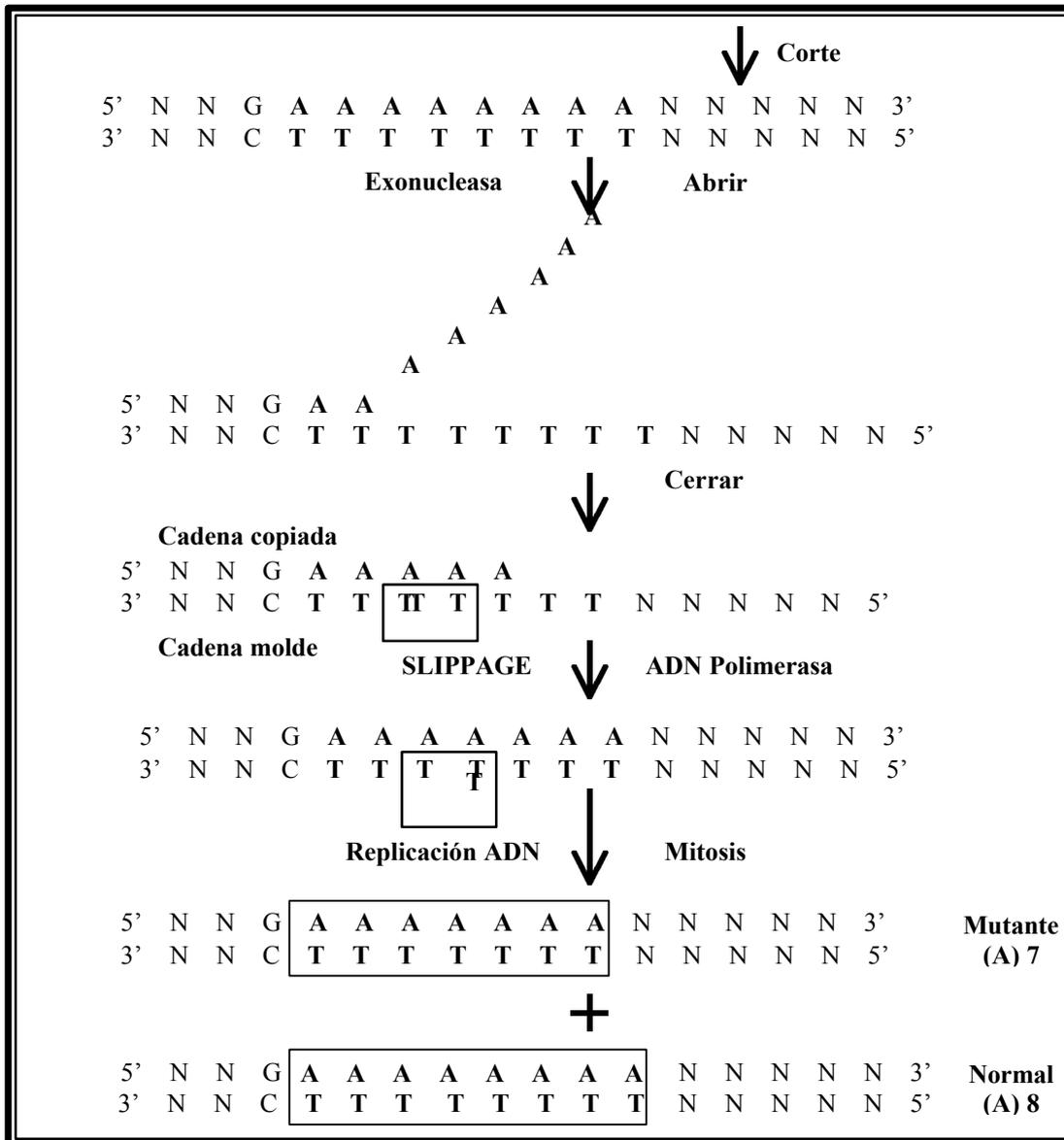


Figura 10: Modelo de Streisinger de mutaciones de inserción y deleción por errores espontáneos de apareamiento producidos por deslizamiento (slippage) durante la replicación del ADN.

La presencia de inestabilidad dentro de estas secuencias de microsatélites fue descrita por primera vez por tres grupos de investigadores que estudiaban el cáncer colorrectal. Encontraron que la longitud de los microsatélites estudiados variaba entre el tejido tumoral y el tejido normal. Esta variación era consecuencia de un proceso

mutacional producido por deleciones o inserciones en el ADN del tumor. Fortuitamente, trabajando en el sistema de reparación de ADN de bacterias y levaduras, los investigadores descubrieron que este patrón de inestabilidad de los microsatélites era similar al que se producía cuando el sistema de reparación de las bacterias y levaduras no funcionaba. De este modo convergieron estos dos campos de investigación y se descubrieron los homólogos humanos de los genes reparadores de las bacterias y levaduras. (44)

La mayor parte de los casos del síndrome de HNPCC, heredado de modo autosómico dominante, eran atribuidos a un defecto en los locus de los genes que formaban parte de este sistema reparador. (45) El gen hMSH2 (human MutS homologue), localizado en el cromosoma 2p16, codifica un homólogo de la proteína bacteriana MutS, mientras que los genes hMLH1, hPMS1 y hPMS2, localizados en el cromosoma 3, codifican diferentes homólogos de MutL. (46)(47)(48)

Aunque aproximadamente un 90% de los cánceres de colon de los pacientes que presentan el síndrome de Lynch tienen inestabilidad de sus microsatélites, sólo el 50% tienen mutaciones en los genes conocidos de este sistema de reparación génica. Por lo tanto hemos de pensar que existen otros genes, dentro de este grupo, que deben jugar un papel en el desarrollo de la inestabilidad de los microsatélites; o bien que no todas las inestabilidades producidas en los microsatélites están originadas por defectos de este sistema reparador génico.

La inactivación permanente o transitoria de un gen como el hMLH1 u otro equivalente, provocada por una mutación inactivadora o debilitante, genera un primer nivel de inestabilidad. Este primer nivel conduce a mutaciones mutadoras secundarias en

hMSH3 y hMSH6. La inestabilidad genómica se incrementa por los mutadores secundarios, al aumentar la frecuencia de mutaciones del fenotipo mutador. Se acelera así la acumulación de mutaciones en los genes tumorales que aceleran el proceso de carcinogénesis. Se requiere un gran número de eventos mutacionales para destruir los mecanismos que controlan el crecimiento y la supervivencia celulares, es decir, para que se produzca la transformación neoplásica.

El gen del receptor del factor transformante beta tipo II (TGF β RII) y el gen pro-apoptótico BAX fueron los primeros genes tumorales cuya mutación se atribuyó al fenotipo mutador de microsatélites. Estas mutaciones brillan por su ausencia en la vía supresora.

Las mutaciones en el gen BAX ayudan a explicar la paradójica asociación negativa entre los tumores del fenotipo mutador de microsatélites y las mutaciones en el gen supresor p53. Desde este punto de vista es sorprendente que un tumor que acumula millones de mutaciones en microsatélites carezca de mutaciones en el gen p53, conocido por ser el que con mayor frecuencia muta en el ser humano.

Las mutaciones ocurren antes en el gen BAX que en el p53, porque éste no tiene en su región codificante secuencias repetidas tan largas como la del BAX. Una vez el fenotipo mutador de microsatélites se manifiesta, los episodios que conducen al cáncer se suceden de acuerdo con las leyes de la probabilidad. (49)

También se ha demostrado la presencia de inestabilidad en los microsatélites en algunas enfermedades degenerativas del sistema nervioso como la enfermedad de Huntington, el síndrome del cromosoma X frágil y la distrofia miotónica. Sin embargo, la inestabilidad que aparece en estos procesos se diferencia de la que encontramos en las

neoplasias, puesto que en las enfermedades neurodegenerativas la inestabilidad se manifiesta como repeticiones de trinucleótidos y afecta a genes específicos, mientras que en las neoplasias suelen aparecer repeticiones de dinucleótidos y la inestabilidad es más generalizada. (41) Menos frecuente es que aparezcan repeticiones de mononucleótidos, tri y tetranucleótidos en las neoplasias.

La inestabilidad de microsatélites parece ocurrir predominantemente en tejidos de origen endodérmico (colon, endometrio, páncreas, estómago, etc.).

Aunque se han usado varios cientos de marcadores para microsatélites diferentes, para analizar la presencia o no de inestabilidad, aún no está claro el número de marcadores, los locus que deben ser evaluados y que porcentaje de microsatélites alterados debe tener un tumor para que presente inestabilidad de microsatélites. (50)

El número de divisiones que presenta el tejido a estudiar influencia la expresión de inestabilidad génica. De tal modo que una alta tasa de células en división puede simular un fenotipo mutador. Así pues, si con anterioridad a la expansión macroscópica existe una elevada tasa de divisiones en el tejido neoplásico, incluso los tumores que presentan una tasa de mutación baja o normal pueden tener alteraciones en una minoría de los locus de sus microsatélites. (51)

Curiosamente se ha observado que las neoplasias colónicas que presentan inestabilidad de microsatélites en dos o más locus parecen tener un mejor pronóstico.

Análisis de microsatélites en el cáncer vesical

Los tumores uroteliales a menudo presentan deleciones cromosómicas en locus relacionados con genes supresores y que se manifiestan como una pérdida de heterocigosidad (LOH), que puede ser detectada mediante el análisis de microsatélites. Mao analizó la presencia de LOH en muestras tumorales y en el sedimento de la orina recogida de esos pacientes, encontrando alteraciones en las muestras del sedimento que se correspondían con las encontradas en las muestras neoplásicas. (55)

Gonzalez-Zulueta observó la presencia de LOH en el 3% de los tumores vesicales que analizó. Esta LOH se presentó sólo en tumores vesicales superficiales en esta serie, no obstante en estudios posteriores se apreció que estaba asociada a la agresividad del tumor. (52) Orlow demostró la presencia de LOH en el 41% de las muestras analizadas. (7) Mao encontró un 28'1% de LOH en su estudio. (53)

En estos estudios se observó que la pérdida de heterocigosidad en los tumores uroteliales podía acelerar su progresión y constituirían un evento molecular tardío en su desarrollo.

Uchida encontró en su serie que no existía relación entre el hábito de fumar y la aparición de alteraciones en el patrón de los microsatélites estudiados. Sin embargo, cuando la LOH se presentaba, la incidencia de alteraciones en los microsatélites estudiados era significativamente mayor en los pacientes fumadores si se los comparaba con los no fumadores. (54)

Steiner intentó usar el análisis de la presencia de LOH en orina como prueba diagnóstica de la presencia de una neoplasia urotelial en una muestra de 20 pacientes,

encontrando que el análisis de la presencia de LOH mediante el estudio de unos microsatélites preseleccionados en orina permitía llegar al diagnóstico en el 95% de estos pacientes. Estos autores encontraron LOH en el sedimento urinario tanto en los pacientes con lesiones superficiales como en los infiltrantes. Si estas impresiones se confirmaran el análisis de la presencia de LOH en orina constituiría un elemento fundamental en el diagnóstico precoz y el seguimiento de las recidivas de las neoplasias uroteliales(56)(71). Este hecho se vería favorecido porque el 50% del ADN obtenido de la orina pertenece a las células neoplásicas de descamación en el caso de que existiera una neoformación vesical (39).

No se ha encontrado hasta ahora algún microsatélite en particular cuya alteración singular estuviera asociada al fenotipo tumoral. Si existen muy pocos estudios que demuestran esta asociación pero no con un microsatélite en particular sino con la alteración de al menos uno de los microsatélites con los que mapean la región cromosómica deseada, en particular la región 9p21-22.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Dos carcinomas transicionales, indistinguibles morfológicamente, pueden comportarse de manera radicalmente diferente. Esto dificulta enormemente el predecir de modo adecuado la evolución clínica de estos pacientes.

La elevada tasa de recurrencia de los tumores superficiales, que es mayor al 60%, y su tasa de progresión tumoral a un estadio o grado mayor, que es del 42% de los pacientes si los observamos durante un periodo de 10 años, hace que se haya planteado desde hace mucho tiempo la búsqueda de un factor que pueda diferenciarnos a los pacientes que van a presentar una evolución favorable de su enfermedad, con menos recidivas y sin progresión de grado y estadio, de aquellos que va a evolucionar de un modo desfavorable; de modo que en estos últimos se puedan realizar tratamientos más agresivos o realizar un seguimiento más exhaustivo y cercano.

Este es un empeño en el que en los últimos tiempos se ha avanzado muchísimo, sobre todo gracias a los nuevos medios que la gran evolución de las ciencias básicas, fundamentalmente la biología molecular, ha puesto a nuestra disposición.

Los objetivos que nos propusimos en el presente trabajo fueron básicamente :

1. Analizar la incidencia de alteraciones en el patrón de los microsatélites estudiados. Todos estos microsatélites están ubicados en el cromosoma nueve (tres en el brazo largo y otros tres en el brazo corto).
2. Comprobar si la aparición de alteraciones en los microsatélites estudiados se corresponden con marcadores de pronóstico favorable o desfavorable en la evolución de los pacientes que han presentado un tumor vesical.

3. Observar si estas alteraciones en los microsátélites analizados guardan relación con los antecedentes personales o la historia de exposición profesional o consumo de tóxicos del paciente.

MATERIAL Y METODOS

En este trabajo se utilizan los microsatélites como herramienta diagnóstica, con una doble vertiente, por una parte la detección de inestabilidad de microsatélites y por otra el estudio de las pérdidas de heterocigosidad.

Se han analizado un total de 69 muestras, procedentes de 23 pacientes que presentaban cáncer de vejiga.

Las muestras de control normal del ADN constitucional fueron constituidas por las muestras de mucosa vesical sana y por la sangre periférica de cada paciente. Las muestras de ADN tumoral se obtuvieron del tejido neoplásico vesical más homogéneo y sólido posible, evitando las zonas necróticas o hemorrágicas.

En todos los casos se estudió tanto la pieza del tumor, como la de la mucosa normal lejana al tumor, obtenidas bien mediante resección transuretral o bien de los especímenes de cistectomía. Las piezas después de su extracción fueron congeladas inmediatamente a menos 80°C, con un paso previo por nitrógeno líquido.

Se analizaron muestras de sangre total anticoagulada con EDTA K₃ y extraída por venopunción en todos los pacientes.

Todas las muestras procedían de pacientes diagnosticados (según criterios clínicos y anatomopatológicos) y tratados en el servicio de Urología del Hospital Universitario de Canarias.

Se estudió el historial clínico del paciente, en busca de antecedentes personales y familiares de interés; las exploraciones complementarias realizadas, los hallazgos quirúrgicos, la anatomía patológica para establecer el estadio anatomopatológico según la clasificación TNM para los tumores de vejiga, y la evolución posterior del paciente.

Extracción del ADN

1. - Reactivos y soluciones

REACTIVOS

Ficoll-Paque (Farmacia). Proteinasa K (Boehringer). Etanol absoluto (Merck). Acetato de amonio (Merck). Fenol (Merck). Cloroformo (Merck). Alcohol isoamílico (Merck). NaCl (Merck). TrisHCl (Merck). EDTA (Merck). SDS (Merck). RNAasa libre de DNAasa (Boëringher). Suero fisiológico 0.9%.

SOLUCIONES

Buffer Tens: NaCl 4M, TrisHCl 1M, EDTA 0.5 M, SDS 10%.

TE: TrisHCl 10mM, EDTA 1 mM.

Fenol-cloroformo-isoamílico: Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico 25:24:1,
TrisHCl 0.1 M a pH 8.

Cloroformo isoamílico: cloroformo: alcohol isoamílico 24:1.

Buffer de extracción de ADN: 10 mM de TrisHCl (pH 8), 100 mM EDTA (pH 8), 20 µg/mL RNAasa libre de DNAasa, 0.5% de SDS.

2. - Protocolos

2.1. Sangre

Los linfocitos fueron separados de los hematíes mediante preparación de un colchón de Ficoll en un tubo cónico de 10 mL según el método de *Fontino 1971*, que consiste en:

Añadir 2-3 mL de Ficoll-Paque (Pharmacia) en el tubo de centrifuga.

Cuidadosamente añadir la muestra de sangre (4-5 mL) dejándola resbalar por las paredes del tubo, de manera que no traspase el colchón formado por el Ficoll.

Centrifugar de 10 a 15 minutos a 3500 r.p.m. a temperatura ambiente.

Tras la centrifugación se obtienen distintas capas que contienen diferentes tipos celulares. De abajo a arriba, eritrocitos, granulocitos, Ficoll, linfocitos, monocitos, plaquetas y por último el plasma.

Con una pipeta Pasteur aspirar la nube de Linfocitos y transferir a un nuevo tubo al que se le añade al menos tres volúmenes de solución salina.

Centrifugar 10 minutos a 3500 r.p.m. y a temperatura ambiente.

Retirar el sobrenadante.

Se obtiene así un pellet de linfocitos para extracción del ADN.

En los casos que se obtengan pellets macroscópicamente hemáticos, resuspender el pellet en un mL de TE, utilizado como hemolizante, volviendo a centrifugar durante 10 minutos a 3500 r.p.m. y desechando luego el sobrenadante.

La obtención del ADN de los linfocitos se realizó mediante lisis celular seguida de digestión de los núcleos con proteinasa K y extracción fenólica según los protocolos descritos por Erlich y Sambrook (64):

Resuspender los Pellets de linfocitos con 500 μ L de Buffer TENS, al realizar esta maniobra, la solución se hace muy viscosa debido a la liberación del ADN, agitar suavemente.

Añadir 50-100 μ L de proteinasa K a 10 mg/mL (según el tamaño del pellet). Incubar a 55 ° C durante al menos dos horas (puede incubarse durante toda la noche).

Incubar 10 minutos a 90 ° C para inactivar la proteinasa (puede interferir la PCR).

Separar la muestra en dos Eppendorf, añadiendo a cada uno de ellos igual volumen de Fenol-Cloroformo, invertir los tubos varias veces para mezclar las fases.

Centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 10 minutos a temperatura ambiente.

La fase superior donde se encuentra el ADN se lleva a dos nuevos tubos, teniendo cuidado de no tomar restos celulares de la interfase.

El ADN precipita añadiendo 1/10 del volumen de Acetato Amónico 3M y a continuación el doble de volumen de etanol absoluto (a -20°C). Al invertir suavemente se aprecia la formación de pequeñas hebras blanquecinas de ADN.

Centrifugar a 13000 r.p.m. durante 5 minutos, decantar el sobrenadante y lavar los pellets con 1 mL de etanol al 70% (refrigerado). En este paso, se puede almacenar uno de los tubos en congelador a -20°C. El otro se centrifuga a 13000 r.p.m. durante 5 minutos decantando el etanol y dejando secar totalmente el pellet de ADN, resuspendiéndolo después en 100 μ L de TE.

La muestra de ADN se conserva en congelador a -20°C.

2.2. Tejido

Se corta finamente el tejido con un bisturí en la base de un mortero.

Añadir nitrógeno líquido y golpear hasta pulverizar el tejido. Dejar evaporar el nitrógeno y esperar hasta que el tejido se descongele. Añadir poco a poco 5 mL de Buffer de extracción de ADN. Mezclar bien.

Cuando todo el material esté resuspendido pasarlo a un tubo cónico e incubar durante una hora a 37 °C en baño con agitación.

Añadir 100 µL de Proteinasa K a concentración final de 100 µg/mL. Mezclar por inversión lentamente.

Incubar el lisado celular en un baño de agua a 50°C durante tres horas o toda la noche.

Extracción fenólica:

Enfriar la solución a temperatura ambiente. Añadir igual volumen de fenol equilibrado. Mezclar las dos fases suavemente durante 10 minutos.

Centrifugar a 4000 r.p.m. durante 15 minutos a temperatura ambiente para separar las fases. Parar sin freno. Transferir suavemente, para no mover la interfase, a un tubo de centrifuga limpio.

Añadir un volumen igual de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1). Mezclar las dos fases suavemente durante 10 minutos.

Centrifugar a 4000 r.p.m., 15 minutos, a temperatura ambiente, para separar las fases. Parar sin freno. Transferir suavemente, para no mover la interfase, a un tubo de centrifuga nuevo.

Añadir un volumen igual de cloroformo-isoamílico (24:1). Mezclar las dos fases suavemente durante 10 minutos.

Centrifugar a 4000 r.p.m. durante 15 minutos a temperatura ambiente para separar las fases. Parar sin freno. Transferir suavemente, para no mover la interfase, la fase acuosa, a un tubo de centrifuga nuevo.

Añadir 0.2 volúmenes de acetato amónico 10 M y 2 volúmenes de etanol absoluto. Agitar suavemente por inversión del tubo.

En este momento el ADN precipita y se puede observar la madeja. Si la madeja aparece fragmentada centrifugar a 4000 r.p.m., 5 minutos a temperatura ambiente. Recoger el ADN con un asa y pasarlo a un tubo eppendorf.

Lavar el ADN con 1 mL de etanol al 70%, centrifugándolo durante 5 minutos a 13000 r.p.m. Repetir esta operación dos veces.

Pasar la madeja a un tubo etiquetado, eliminando el etanol y dejando secar durante unos minutos. Es conveniente no dejar secar el etanol durante mucho tiempo porque es difícil disolver si está muy seco.

Añadir 0.5 mL de agua estéril y dejarlo a 37 ° C durante dos horas.

En este momento se termina el proceso y podemos dejar el ADN extraído a 4 ° C.

Cuantificación del ADN

Con el método de extracción de ADN usado (extracción fenólica y purificación mediante precipitación con etanol) el ADN obtenido es lo suficientemente puro para su cuantificación mediante espectrofotometría.

La técnica se basa en que el espectro de absorción de ADN presenta un máximo a una longitud de onda de 260 nm de modo que la lectura a esa longitud permite calcular la cantidad de ADN presente en la muestra.

A 260 nm una absorbancia de 1 corresponde aproximadamente a 50 $\mu\text{g/mL}$ en el caso de ADN de doble cadena, a 40 $\mu\text{g/mL}$ para ADN de cadena sencilla y RNA y 20 $\mu\text{g/mL}$ para oligonucleótidos.

De nuestras muestras, resuspendidas en agua estéril, se preparó una dilución al 1/50 (10 μL de la muestra en 490 de agua estéril) y se cuantificó la concentración de ADN en un espectrofotómetro Lambda II Uv/Vis espectrofotometer de Perkin Elmer en una cubeta de 1 mL.

Las lecturas se hicieron a 260 y 280 nm.

Para calcular la concentración de ADN de la muestra aplicamos la expresión:

$$\text{ADN (ng/mL)} = 2.5 \times \text{Absorbancia a 260 nm.}$$

Para estimar el grado de contaminación del ADN se utilizó como criterio de pureza la relación de absorbancias:

Abs 260 nm./ Abs 280 nm.

- Abs 260 / Abs 280 mayor de 1.75, se corresponde a un grado de pureza adecuado.
- Abs 260 / Abs 280 menor de 1.75, la preparación está contaminada con proteínas. En este caso añadir SDS a una concentración final de 0.5% y volver a precipitar.

Microsatélites

Cebadores usados y síntesis.

Se estudiaron los microsatélites D9S126, D9S736, D9S66, D9S171, D9S1793 y D9S1848, todos ellos situados en el cromosoma 9. (*Figura 1*)

Los cebadores usados para la amplificación de los microsatélites D9S126, D9S736, D9S66, D9S171, D9S1793 y D9S1848, fueron adquiridos a GENSET SA. Las secuencias fueron obtenidas de la publicación de T Takahashi (29).

Las secuencias de los seis microsatélites empleados se recoge en la tabla adjunta. (*Tabla 1*)

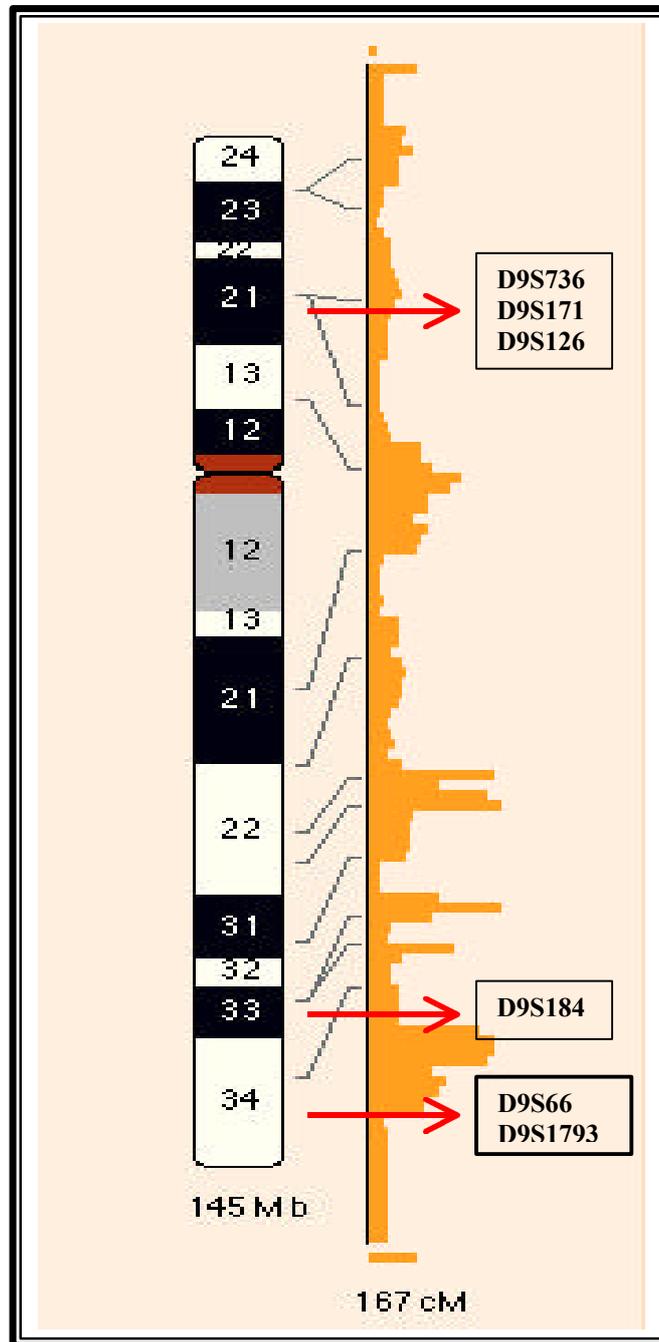


Figura 1: Microsatélites analizados en el cromosoma 9.

MICROSATELITE	SECUENCIA	LOCALIZACION	TAMAÑO
D9S736	5' TTCTAgACCTCTCagCagAC ₃ ' 5' gATAgTgTTggAgACACCag ₃ '	9p21	140bp
D9S171	5' AgCTAAgTgAACCTCATCTCTgTCT ₃ ' 5' ACCCTAgCACTgATgCTATAgTCT ₃ '	9p21	158-177 bp
D9S126	5' ATTgAAACTCTgCTgAATTTTCTg ₃ ' 5' CAACTCCTCTTgggAACTgC ₃ '	9p21	238 bp
D9S1848	5' TAATAAgTTCAggAgACCTATTgC ₃ ' 5' ATCAAgCTAgTTAgCCTCACAC ₃ '	9q33	163-171 bp
D9S1793	5' ggTgTggAACCAggACTAAC ₃ ' 5' CAgAgCgAgTgTAATCCg ₃ '	9q34	168-190 bp
D9S66	5' CAgACCaggAATgCATgAAg ₃ ' 5' CACgggCACACATgTATgC ₃ '	9q34	109 bp

Tabla 1. Secuencias y localización de los microsatélites estudiados

Amplificación

1. Reactivos y soluciones.

Tampón PCR 10x: 500 mM Tris-HCL, 100 mM TRIS CH, 1% Tritón X-100, 15 mM MgCL₂.

Taq-Polimerasa (Promega).

Cebadores.

dNTPs: dATP, dGTP, dCTP, dTTP (Boëhringer Manheim).

Agua destilada.

ADN muestra.

Aceite mineral (Perkin-Elmer).

2. Material.

Termociclador: DNA Thermalcycler de Perkin-Elmer.

3. Mezcla.

Las reacciones fueron hechas a un volumen final de 25 µL

Para todos los microsátélites estudiados mezclamos en un eppendorf de 0.5 mL:

Tampón de reacción 10 X.....2.5 µL

dNTP a una concentración final de 200 µmolar.....2 µL

Cebadores a una concentración final de 1 µmolar.....3 µL

Taq polimerasa (1 unidad).....2 µL

Cloruro de magnesio a 1.5 mM.....3 µL

Muestra de ADN a 100 ng/ μ L.....2 μ L

Agua estéril.....10.5 μ L

Se agita para obtener una buena mezcla. Se añaden 1 ó 2 gotas de aceite mineral.

4. Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa.

Se lleva la mezcla al termociclador, en el que tenemos programadas las condiciones para la amplificación de los microsátélites.

Desnaturalización: 60 segundos a 95 ° C.
--

Unión de cebadores: 60 segundos a 55 ° C.

28 ciclos

Extensión de las cadenas: 90 segundos a 72 ° C.

Después de los 28 ciclos se realiza una extensión final de 5 minutos a 72°C, conservamos en la placa a 4 °C hasta retirarlo.

Los productos de amplificación se almacenan en nevera a 4 ° C hasta su detección electroforética posterior.

Electroforesis vertical

La separación electroforética de los productos amplificados fue realizada en geles de poliacrilamida al 8% siguiendo el procedimiento descrito por *Sambroock y cols (64)*. La concentración de acrilamida total $T = 8\%$ y el grado de entrecruzamiento $c = 3.33$ se determinaron mediante la fórmula $T = (a + b) \times 100 / V \%$ y $C = b \times 100 / (a + b) \%$, donde a es la masa de acrilamida en gramos, b es la masa de metilbisacrilamida en gramos y V el volumen en mL.

1. Reactivos y soluciones.

Acrilamida (Merck): bisacrilamida (Merck) en una relación 29:1.

Tampón TBE 5X que consta de:

Trizma base (Sigma): 54 gr.

EDTA disódico (Merck): 3.7 gr.

Acido bórico (Merck): 27.5 gr.

Agua ultrapura hasta 1000 mL

Persulfato amónico (Merck) al 10% (p/v)

TEMED (Merck)

Tampón de electroforesis: TBE 1X

Tampón de carga, 50% de glicerol en TBE 1 X, conteniendo 0.25% de bromofenol azul.

Standard de pesos moleculares: mezcla de fragmentos resultado del corte enzimático del plásmido pBR 322 con Hae III (Boehringer Maheim)

2. Procedimiento

Se prepara un gel de poliacrilamida a 8%, justo antes de su uso, de la siguiente forma:

Acrilamida-bisacrilamida al 30%.....	12 mL
TBE 5X.....	9 mL
Agua estéril hasta 45 mL.....	24 mL

Cuando usamos la cubeta de BioRad las cantidades citadas se duplicaron pues el tamaño del gel y por lo tanto el volumen de mezcla necesario para fabricarlo era mucho mayor.

Se calienta la mezcla en el microondas durante 15 segundos aproximadamente (30 en el caso de BioRad) y se añaden posteriormente 100 μ L de persulfato amónico y 20 μ L de TEMED (el doble en el caso de BioRad).

Esta mezcla se vierte entre las placas de cristal y se coloca rápidamente el peine para la formación de los pocillos donde colocaremos el producto de la amplificación para su separación.

Se cargan de 10 a 15 μ L del producto de amplificación en cada pocillo. Las electroforesis se realizan a un voltaje constante de 200 voltios, durante dos horas y media aproximadamente.

Electroforesis horizontal

Los geles también fueron preparados al 8 % como en el caso anterior.

1. Reactivos y soluciones.

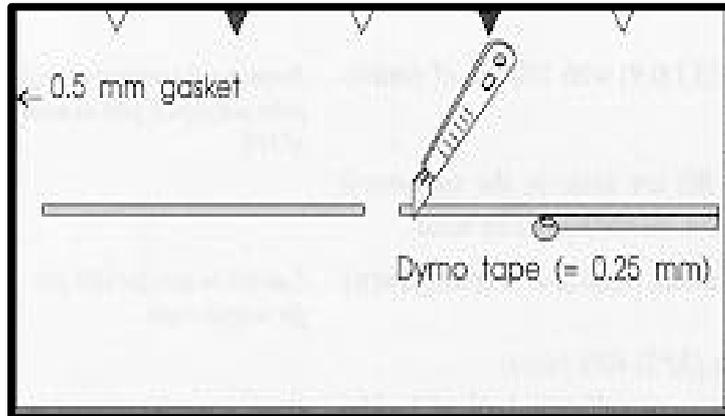
Los reactivos y soluciones empleados fueron los mismos que para la electroforesis vertical con la excepción del Repel Silane de Pharmacia.

2. Procedimiento.

Se prepara la mezcla de la misma forma que en el caso anterior para preparar un gel al 8 %.

Para la preparación del molde del gel, se coloca en uno de los cristales un soporte especial para geles de poliacrilamida, GelBond PAG film (Pharmacia). Este soporte consta de dos caras, una de ellas hidrofílica, sobre la cual se polimeriza el gel, y la otra hidrofóbica que se coloca en contacto íntimo con el cristal, separados por una delgada capa de agua que hará de puente para su posterior separación. En el otro cristal formamos los moldes de los pocillos con cinta de Dymo de 0.20 mm de grosor, de tal forma que debemos colocar una doble capa para que tenga menor grosor que los separadores laterales existentes en el cristal, que tienen 0.5 mm, pero suficientemente profundos para que mantengan la muestra a separar.

Se empapa la zona de los moldes de los pocillos con Repel Silane con el fin de que la acrilamida no se quede pegada a la cinta Dymo y se puedan formar bien éstos.



Los dos cristales, el que tiene el GelBond unido y el que tiene separadores y los moldes de los pocillos, se unen por medio de unas pinzas especiales para tal fin y se vierte el contenido de la mezcla en su interior dejándolo en posición vertical hasta su total polimerización.

Una vez polimerizado el gel se retira de los cristales en su soporte y se lleva a la cubeta de electroforesis. El gel se coloca sobre la base de la cubeta y se crea un puente entre los dos extremos del mismo y el tampón mediante papel de filtro empapado en el mismo.

Se realiza un prerecorrido en vacío de 10 a 15 minutos a 300 voltios.

Se cargan unos 10 μ L de producto de amplificación en cada pocillo y se corre a un voltaje constante de 300 Voltios durante 3 horas a 3 horas y media.

Detección

1. - Tinción con Bromuro de Etidio.

1.a. Reactivos y soluciones.

TBE 1X.

Bromuro de Etidio a 1 mg/mL. (Se prepara una solución para la tinción con 0.5 µL de Bromuro de Etidio por cada mL de TBE 1X).

1.b. Procedimiento.

Después de haber finalizado la electroforesis se sumerge el gel en la solución de Bromuro de Etidio. Se tiñe durante 10 a 15 minutos en agitación de 120 unidades por minuto y se lava con agua durante otros 10 a 15 minutos. Se lleva a continuación el gel al transiluminador ultravioleta para ver los resultados y fotografiarlos.

2. Tinción con plata.

2.a. Reactivos y soluciones.

REACTIVOS

Acido acético glacial (Merck)

Nitrato de Plata (Merck)

Formaldehído 37% (Panreac)

Tiosulfato sódico (Merck)

Carbonato sódico (Merck)

EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck)

SOLUCIONES

Para el tamaño de nuestros geles necesitamos un volumen de unos 250 mL de cada solución.

- Solución de Fijación: Acido acético glacial al 10% (se mezclan 25 mL de ácido acético glacial y 225 mL de agua MilliQ)

- Solución de Tinción: 25 mL de Nitrato de Plata al 1% (1 gramo de nitrato de plata con 100 mL de agua) hasta 250 mL con agua; se añaden 250 μL de formaldehído al 37%.

- Solución de Revelado: se mezclan 6.25 gramos de carbonato sódico con 250 mL de agua y se añaden 250 μL de formaldehído al 37% y 250 μL de Tiosulfato sódico al 0.2% (2 gramos de Tiosulfato sódico en 10 mL de agua).

- Solución de Parada: 3.65 gramos de EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 250 mL de agua.

2.b. Procedimiento.

- Fijación: 30 minutos, en agitación, en 250 mL de la solución de lavado.
- Lavado: 3 lavados de dos minutos, con agitación, en 250 ml de agua.
- Tinción: 20 minutos, en agitación, en 250 mL de la solución de tinción.
- Lavado: un lavado de 30 segundos, con agitación, en 250 mL de agua.
- Revelado: Un primer lavado de 1 ó 2 minutos, con agitación, en 100 mL de la solución de revelado, para precipitación.

Un segundo lavado de 10 a 15 minutos, con agitación, en 250 mL de la solución de revelado durante el cual van apareciendo los productos de amplificación teñidos con la plata.

- Parada: 10 minutos, en agitación, en 250 mL de la solución de parada.

Una vez terminado todo el proceso el gel se conserva entre dos láminas de plástico duro hasta su escaneo posterior.

Fotografía de los resultados

La fotografía de los geles teñidos con Bromuro de Etidio se realizó utilizando una cámara Polaroid MP4. Se usó luz UV transmitida a 300 nm. que proporciona una mayor fluorescencia del Bromuro de Etidio.

1. Material.

Cámara fotográfica Polaroid MP4

Película fotográfica Polaroid 667 y 665 provista de negativo.

Filtro para luz ultravioleta JESSOP 49 mm Y A 2.

2. Soluciones.

Solución de bisulfito sódico al 18% para la fijación de los negativos.

Agua.

3. Procedimiento.

El gel una vez teñido se coloca sobre el transiluminador UV, se encuadra y se enfoca para una correcta resolución de las bandas obtenidas.

El tiempo de exposición varía según la intensidad de fluorescencia de las bandas y del tipo de película usado para la fotografía. En general se usó la tipo 665 provista de negativo y el tiempo de exposición fue de 2 minutos.

Escaneado de los resultados

Los geles una vez teñidos con plata y conservados en unos casos en un soporte de plástico duro y en otros sobre un GelBond se escanearon guardándose los resultados obtenidos para su posterior análisis.

1. Material.

Scanner de sobremesa modelo Snapscan 1212 de AGFA, acoplado a un ordenador IBM.

2. Procedimiento.

Se lleva el gel al transiluminador del Scanner y se procesa siguiendo el programa de escaneo para fotografías, modificando claros y oscuros hasta obtener una óptima resolución de las bandas. Realizamos el escaneo de los geles con una doble finalidad, por una parte, el correcto análisis visual de los productos obtenidos, y por otra, la aplicación del programa de análisis de imagen 'UTHSCSA Image Tool'.

Uso del programa Uthscsa Image Tool

Cuando usamos repeticiones de dinucleótidos, $(CA)_n$, una problemática asociada frecuentemente es la aparición de bandas 'stutter' causadas por fallos de la Taq polimerasa en su lectura sobre las zonas de repetición, dando como lugar a la aparición de estos fragmentos más pequeños.

Estas bandas en muchas ocasiones hacen difícil la interpretación de los geles y aquellas que representan a los verdaderos productos alélicos no pueden identificarse y cuantificarse sin el uso de otras herramientas como la densitometría que hace el estudio de pérdida de heterocigosidad menos arduo.

Una vez escaneados todos los geles se analizaron utilizando el programa UTHSCSA Image Tool para windows versión 2.00, para análisis de imagen, el cual ofrece, entre otros, resultados numéricos de cada una de las bandas estudiadas, en términos de altura de pico. Cada banda de tejido normal se somete a un cuádruple análisis densitométrico en cuatro zonas diferentes de la misma y se compara con el mismo análisis realizado en tejido tumoral.

El ratio alélico se calcula según la fórmula:

$$\boxed{T1:T2 / N1:N2}$$

Donde T1 y N1 son los valores de altura de pico de los productos alélicos más pequeños y T2 y N2 corresponden a las alturas de pico de los productos mayores.

Antes de comenzar el estudio, hemos definido como pérdida de heterocigosidad a ratios alélicos iguales o inferiores a **0.50**

NOTA: El UTHSCSA Image Tool es un procesador de imágenes y un programa analizador para Microsoft Windows 95 TM o Windows NT™ y puede adquirir, desplegar, editar, analizar, procesar, comparar, salvar y escribir en los 22 formatos más comunes de ficheros, incluyendo, BMP, PCX, TIF y JPEG.

Fue desarrollado en la Universidad de Tejas en el Centro de Ciencias de Salud de San Antonio, Tejas, por el *Dr C. Donald Wilcox y cols.*

Análisis estadístico

Se creó una base de datos en Excel que reunía todos los parámetros recogidos. Se analizó la relación entre la presencia o no de anomalías en los microsátélites estudiados con cada una de las categorías recogidas para cada paciente. Los análisis estadísticos se realizaron en el paquete estadístico StatXact 5.0 para Windows 2000 (56).

Se realizaron combinaciones entre los diversos parámetros recogidos y se estudió su significación estadística mediante la realización de pruebas asintóticas primero y pruebas exactas posteriormente para conseguir ajustar el error tipo I al tamaño muestral.

RESULTADOS

Estudiamos prospectivamente el curso evolutivo de 23 pacientes (21 hombres y 2 mujeres). La edad media de los pacientes fue de $65.39 \pm 11, 22$ años ($x \pm dt$). El 91.4% de los pacientes fueron hombres y el 8.6% mujeres.

El tiempo medio de seguimiento fue de 70 meses $\pm 16, 69$ (5, 83 años).

Todos ellos habían sido intervenidos quirúrgicamente en el Hospital Universitario de Canarias por haber presentado una neoplasia vesical. De todos ellos se obtuvo una muestra de tejido vesical sano, otra del tumor vesical y otra de sangre periférica, con el objeto de analizar la existencia o no de alteraciones en el patrón de los microsatélites elegidos.

Se analizaron múltiples parámetros relacionados con sus antecedentes personales, profesiones o conductas de riesgo, síntomas urológicos, procedimiento diagnóstico y pruebas complementarias, estadio anatomopatológico, existencia y número de recidivas, evolución y progresión de la enfermedad. Estos parámetros fueron la edad, sexo, hábito tabáquico, profesión, zona de residencia habitual, hematuria, síntomas irritativos miccionales, citología urinaria, urografía endovenosa, cistoscopia, tamaño del tumor, tipo de tumor, estadio patológico, grado tumoral, presencia de metástasis, recidiva, número de recidivas, aumento de estadio patológico, éxitus, meses de seguimiento y presencia de alteraciones en cada uno de los seis microsatélites analizados.

El 78.26% (18) de los pacientes fumaban al menos 20 cigarrillos al día y dentro de este grupo el 44.4% (8) eran fumadores de más de 40 cigarrillos al día.

La profesión predominante dentro de la muestra fue la de agricultor con un 36.36% (8). El 95.65% (22) de los pacientes presentaron hematuria como síntoma inicial

que condujo al diagnóstico. Sólo el 4.34% (1) de los pacientes tenía enfermedad metastásica en el momento de su diagnóstico.

El 34.78% (9) de los pacientes de la muestra presentaron una citología urinaria positiva para carcinoma vesical en el estudio prequirúrgico. El 72.72% (16) de los pacientes tenían una urografía endovenosa patológica, sugestiva de neoformación vesical en el momento de su diagnóstico.

De estos tumores vesicales el 50% (11) se presentaron como un implante único en el momento de su primer diagnóstico mientras que el 50% (11) restante presentaba implantes múltiples. El 68.18% (16) de los tumores tenían un tamaño mayor a dos centímetros en el momento de su diagnóstico y el 27.27% (6) de los tumores tenía un aspecto papilar.

De este grupo de pacientes el 52.17% (12) de los casos tuvieron un estadio Ta, el 21.73% (5) fueron T1 y el 26.1% (6) tuvieron un estadio T2 o superior. En cuanto a los grados, el 13.04% (3) fueron GI, el 52.17% (12) fueron GII y el 34.79% (8) GIII.

El 57.14% (12) de los pacientes presento al menos una recidiva durante el periodo de seguimiento. Dentro de este subgrupo de pacientes el 58.33% (7) presentó dos o más recidivas, y el 16.67% (2) sufrieron un aumento de estadio de su enfermedad neoplásica.

En cuanto al análisis de los microsatélites estudiados, el 4.76% (1) presento alteraciones en el microsatélite D9S126, el 5% (1) en el microsatélite D9S736, el 28.5% (6) en el microsatélite D9S66, el 36.3% (8) en el microsatélite D9S171, el 27.27% (6) en el microsatélite D9S1793 y el 15% (3) en el microsatélite D9S1848.

Si consideramos la presencia de alteraciones en el patrón de los microsatélites estudiados observamos que el 59% (13) de los pacientes presentó anomalías en al menos 1 de los microsatélites estudiados. El 27.27% sólo presenta anomalías en uno de los microsatélites, mientras que el 31.81% tuvo anomalías en dos o más de los microsatélites analizados.

Si analizamos los resultados de pérdida de heterocigosidad en función de los brazos cromosómicos obtenemos que el 36.36% de los pacientes estudiados tenían LOH de al menos un marcador situado en el brazo corto del cromosoma nueve. El 45.45% de los pacientes del estudio presentaban LOH de al menos un marcador situado en el brazo largo del cromosoma nueve, por lo que la incidencia de las alteraciones del brazo largo fue superior a las del brazo corto.

El único tipo de anomalías encontradas en el análisis de estos microsatélites de los pacientes que componían la muestra fue la pérdida de heterocigosidad (LOH) (*figuras 1a, 1b, 1c y 1d*).

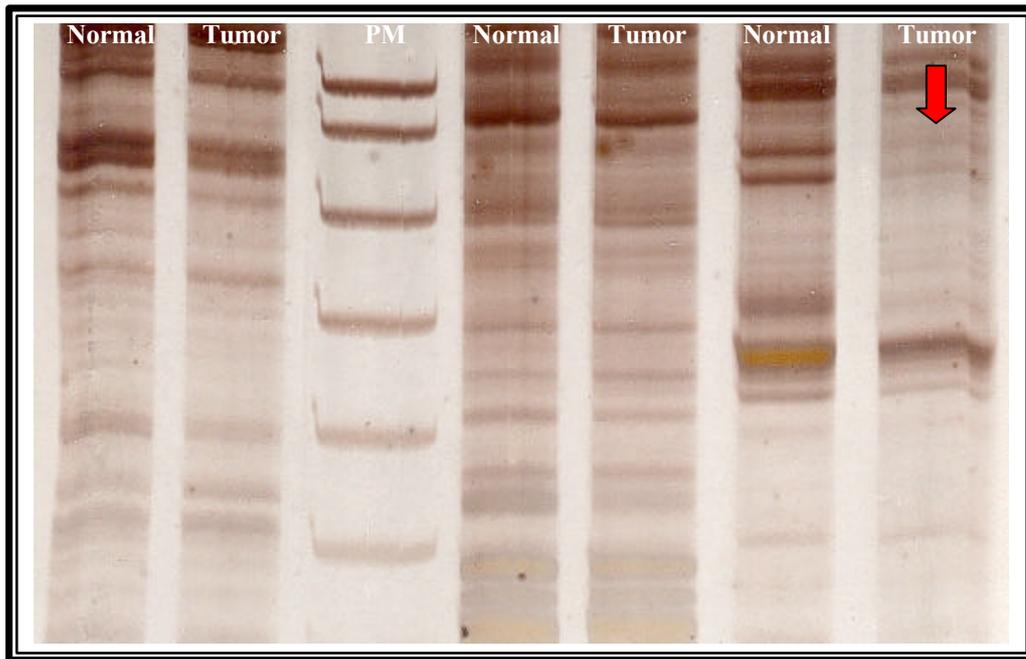


Figura 1a: LOH del microsatélite D9S66 en tejido neoplásico de paciente afecto de cáncer vesical.

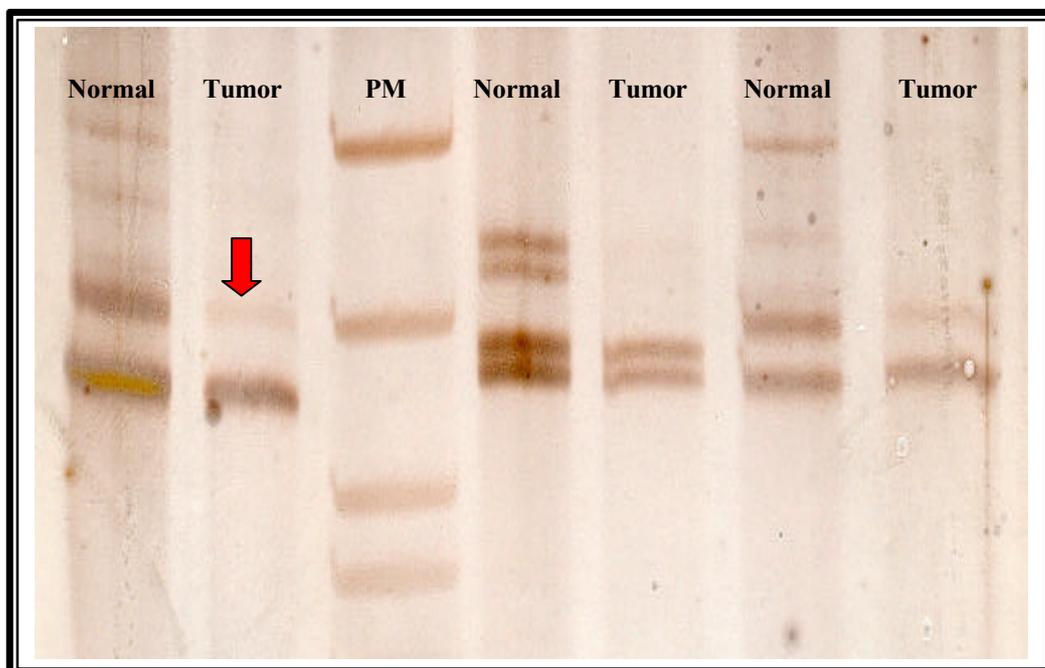


Figura 1b: LOH del microsatélite D9S171 en tejido neoplásico de paciente afecto de cáncer vesical.

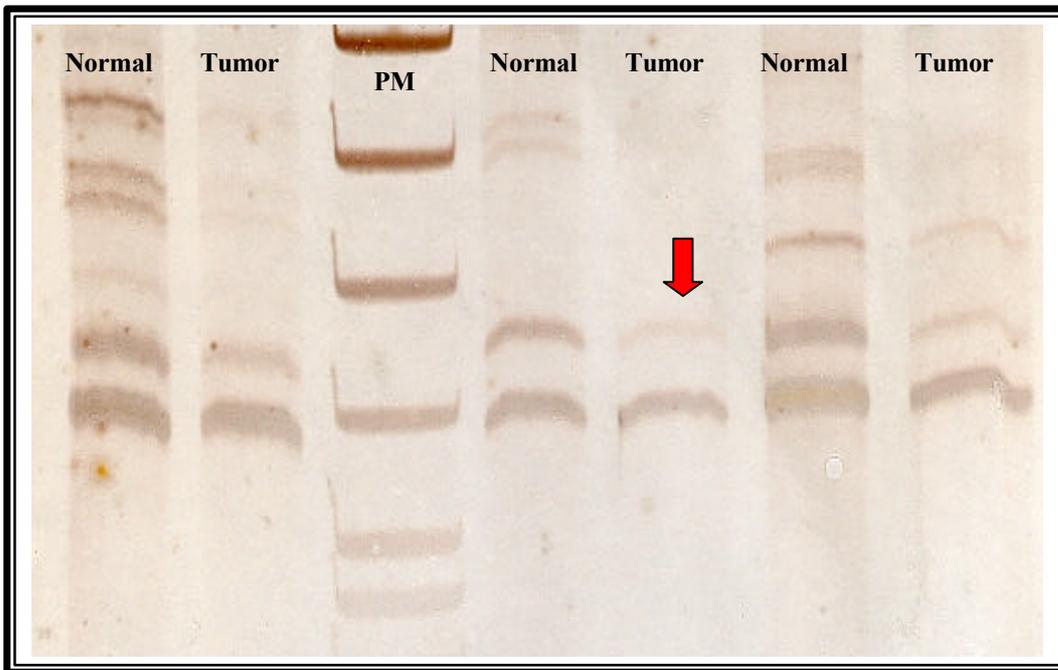


Figura 1c: LOH del microsatélite D9S1793 en tejido neoplásico de paciente afecto de cáncer vesical.

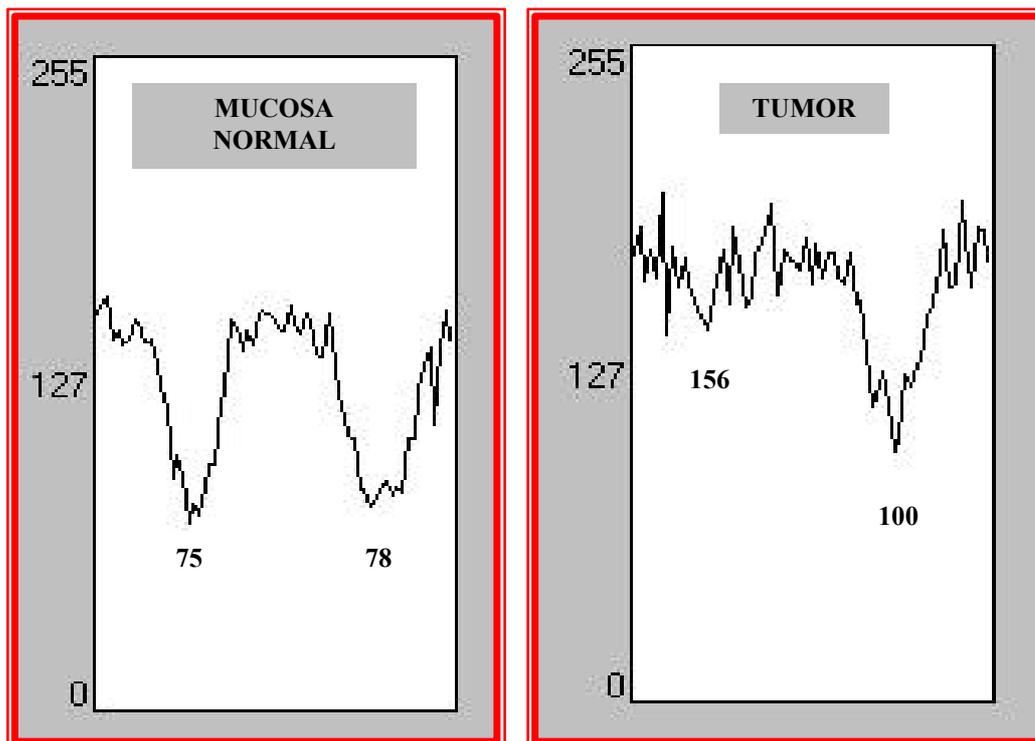


Figura 1d: Análisis densitométrico del paciente de la figura 1c mediante el programa Uthscsa image tool. Comparación entre el resultado de la banda de tejido normal y la banda de tejido tumoral, donde ya a simple vista se aprecia una LOH.

En el periodo de seguimiento el 4.5% (1) de los pacientes de la muestra falleció como consecuencia directa de su neoplasia vesical. Este paciente presentaba pérdida de heterocigosidad en los microsatélites D9S171 y D9S1793.

Cuando analizamos la relación entre la presencia de alteraciones en alguno de los tres microsatélites que presentaron un mayor índice de pérdida de heterocigosidad (D9S66, D9S171, y D9S1793) y la existencia de un comportamiento biológico agresivo de los tumores estudiados (es decir la presencia de un estadio patológico avanzado y/o la existencia de recidivas) resultó estadísticamente significativa; de tal modo que los pacientes que presentaban pérdida de heterocigosidad en estos microsatélites tenían una neoplasia con un comportamiento biológico más agresivo. Cuando realizamos la prueba asintótica, basada en la distribución Chi cuadrado, a estos parámetros obtuvimos una significación estadística con una **p de 0.0096**. Cuando a estos parámetros le realizamos la prueba exacta, con el fin de alcanzar un mayor poder estadístico, obtuvimos también una significación estadística con una **p de 0.0201** (*figura 2*). En el grupo de pacientes que tenía un fenotipo agresivo pero no presentaban ninguna alteración en el patrón de los microsatélites estudiados este fenotipo se manifestó únicamente como la presencia de recidivas que nunca fueron superiores a dos.

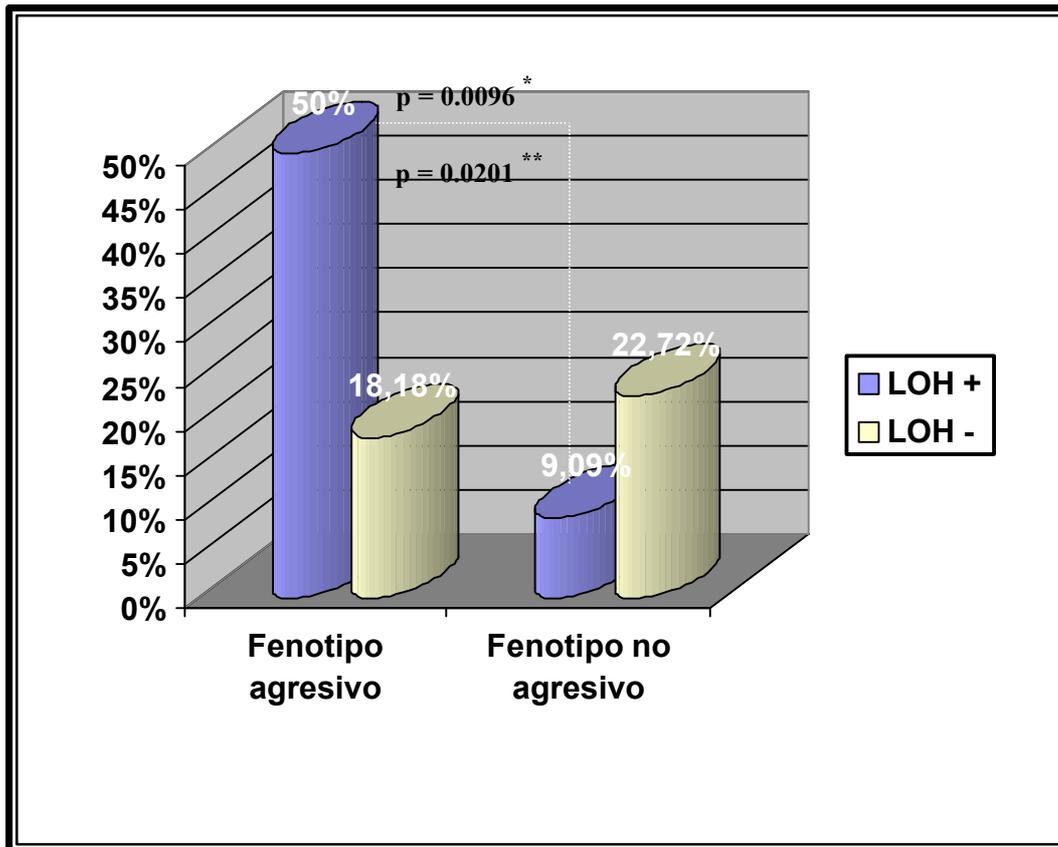


Figura 2: Relación entre la presencia de LOH de alguno de los microsatélites D9S66, D9S171, y D9S1793 y la existencia de un fenotipo tumoral agresivo.

Detectamos una relación estadísticamente significativa, con una p de 0.018, entre la existencia de hábito tabáquico, fundamentalmente en el grupo de pacientes que fuman más de 40 cigarrillos al día, y la presencia de pérdida de heterocigosidad en el microsatélite D9S66 (figura 3). De este modo podríamos inferir que el hábito tabáquico, fundamentalmente cuando la cantidad de tabaco consumida supera los 40 cigarrillos al día, podría original la aparición de la pérdida de heterocigosidad en el microsatélite D9S66.

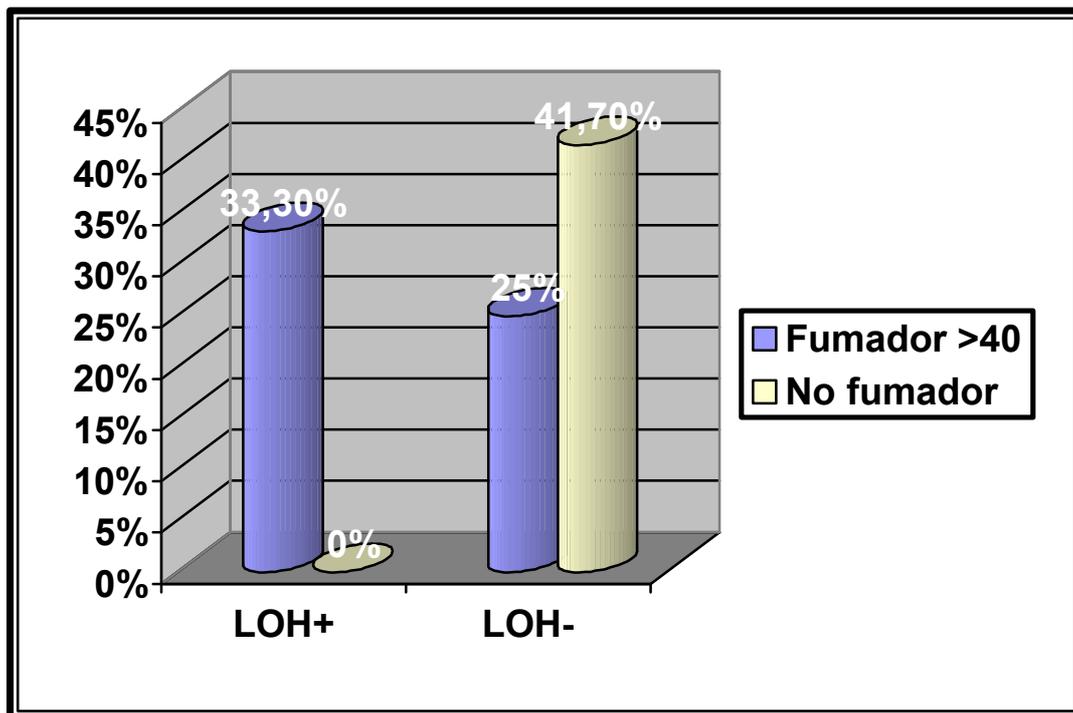


Figura 3: Relación entre la existencia de LOH del microsatélite D9S66 y el hábito tabáquico.

A pesar que un elevado porcentaje de los pacientes incluidos en este estudio se dedicaban a la agricultura (36.36%) no se pudo demostrar ninguna relación entre este hecho y la presencia de alteraciones en el patrón de los microsatélites analizados. Si debemos reseñar que solamente el 8.7% (2) de los agricultores presentaron pérdida de heterocigosidad de los microsatélites estudiados, frente al 47.82% (11) de frecuencia de LOH entre los pacientes que no eran agricultores (*Figura 4*). Este es un resultado paradójico, pues en la literatura médica esta bien documentado que la agricultura es una profesión de riesgo para el desarrollo del cáncer de vejiga debido al contacto continuado de los agricultores con agentes químicos carcinógenos (advirtamos que, concordando con esta idea, el 36.36% de nuestra población muestral de pacientes con cáncer de vejiga eran agricultores, constituyendo así la profesión predominante); sin embargo los resultados del análisis de los microsatélites estudiados reflejan que la pérdida de

heterocigosidad de estos microsatélites era menos frecuente en los pacientes que tenían cáncer de vejiga siendo agricultores, que en aquellos que tenían también un tumor vesical y no eran agricultores. El análisis estadístico de estos parámetros no ha resultado significativo, probablemente por el discreto tamaño de la muestra, aunque si se aprecia una tendencia hacia ello. Esto no nos debe hacer pensar que el ser agricultor protegería de la aparición de un tumor vesical, dada la aplastante evidencia de los datos epidemiológicos que contradicen esta suposición, pero si podemos deducir que la aparición del cáncer de vejiga en los agricultores se realiza a través de una vía molecular diferente a la que hemos analizado en este estudio.

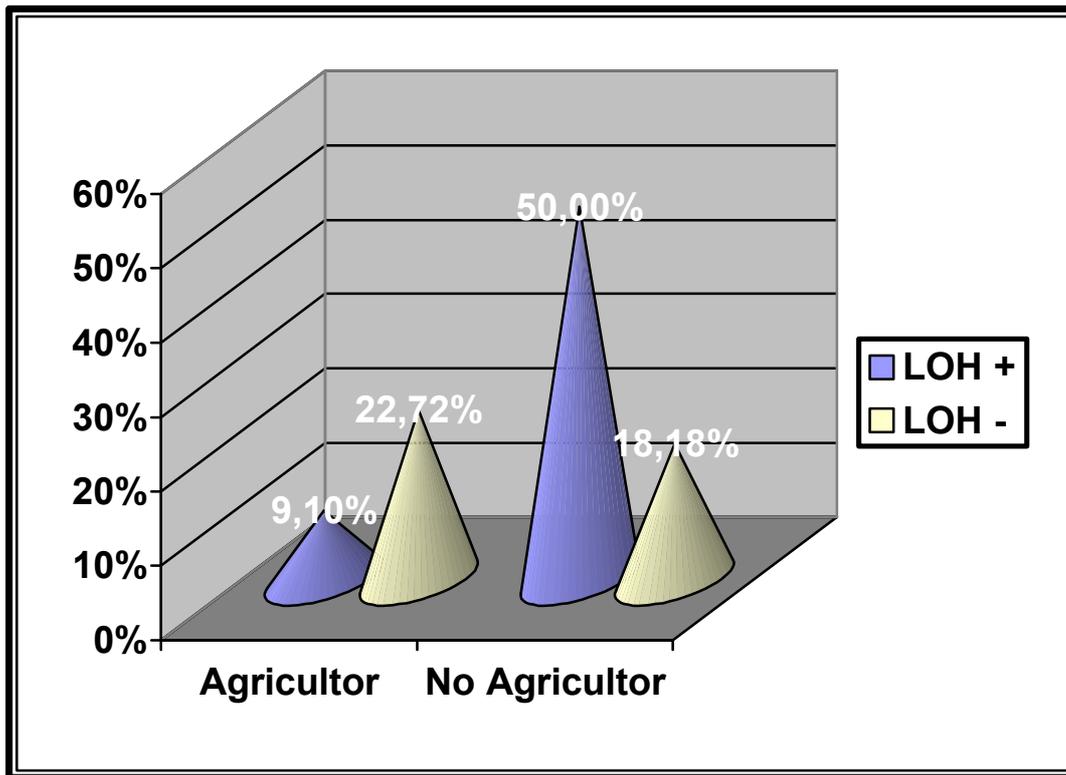


Figura 4: Relación entre la presencia de LOH de alguno de los microsatélites D9S66, D9S171, y D9S1793 y la profesión del paciente.

Al analizar la relación entre la presencia de alteraciones en alguno de los tres microsatélites que presentaron un mayor índice de pérdida de heterocigosidad (D9S66, D9S171, y D9S1793) y el tamaño del tumor vesical en el momento de su diagnóstico, encontramos una relación estadísticamente significativa entre la presencia de alteraciones en los microsatélites analizados y un tamaño tumoral mayor de dos centímetros. Cuando realizamos la prueba asintótica, basada en la distribución Chi cuadrado, a estos parámetros obtuvimos una significación estadística con una **p de 0.0096**. Cuando a estos parámetros le realizamos la prueba exacta, con el fin de alcanzar un mayor poder estadístico, obtuvimos también una significación estadística con una **p de 0.0201** (figura 5).

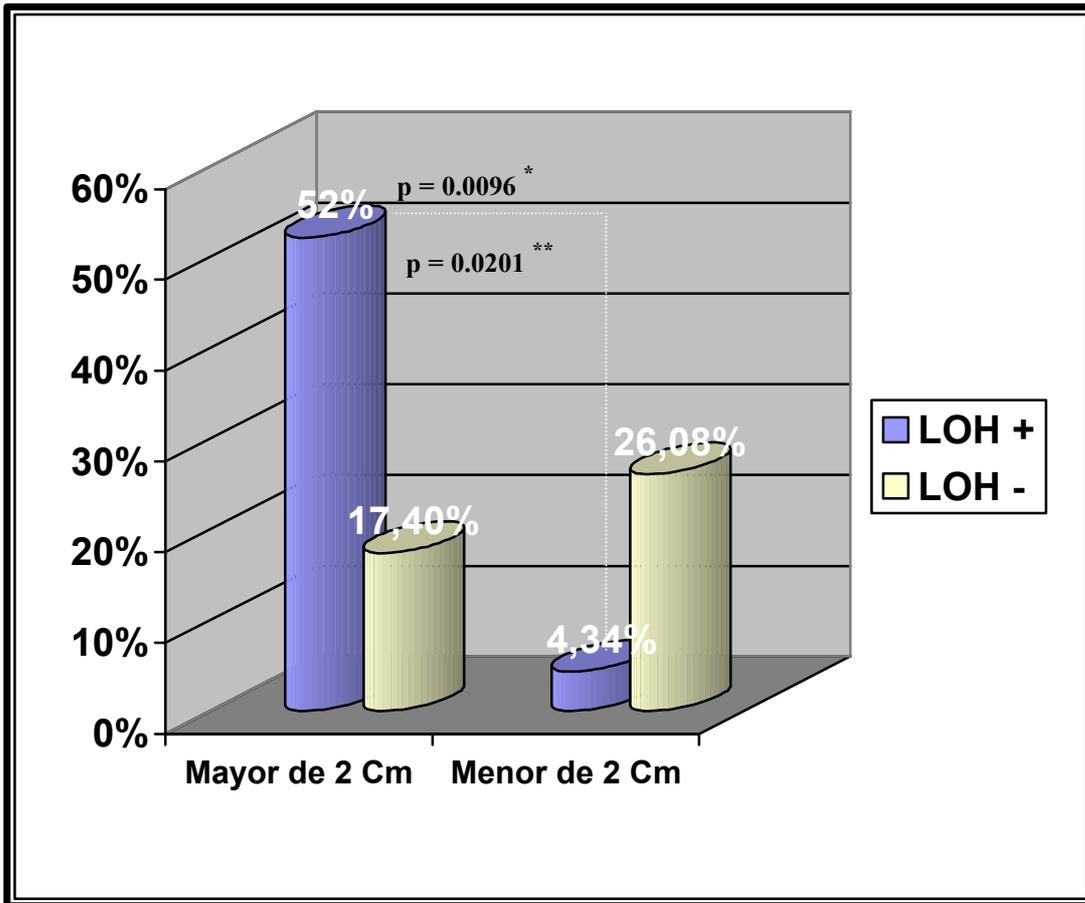


Figura 5: Relación entre la presencia de LOH de alguno de los microsatélites D9S66, D9S171, y D9S1793 y el tamaño de la neoplasia vesical en el momento del diagnóstico.

Se detectó también una relación estadísticamente significativa entre la existencia de un tumor vesical infiltrante (estadio patológico mayor o igual a T2) y la existencia de pérdida de heterocigosidad en el microsatélite D9S1793 (9q). Para comprobar la relación de estos parámetros se realizó un test exacto de Fisher. Cuando realizamos la prueba asintótica, basada en la distribución Chi cuadrado, a estos parámetros obtuvimos una significación estadística con una **p de 0.0164**. Cuando a estos parámetros le realizamos la prueba exacta, con el fin de alcanzar un mayor poder estadístico, obtuvimos también una significación estadística con una **p de 0.0254** (figura 6).

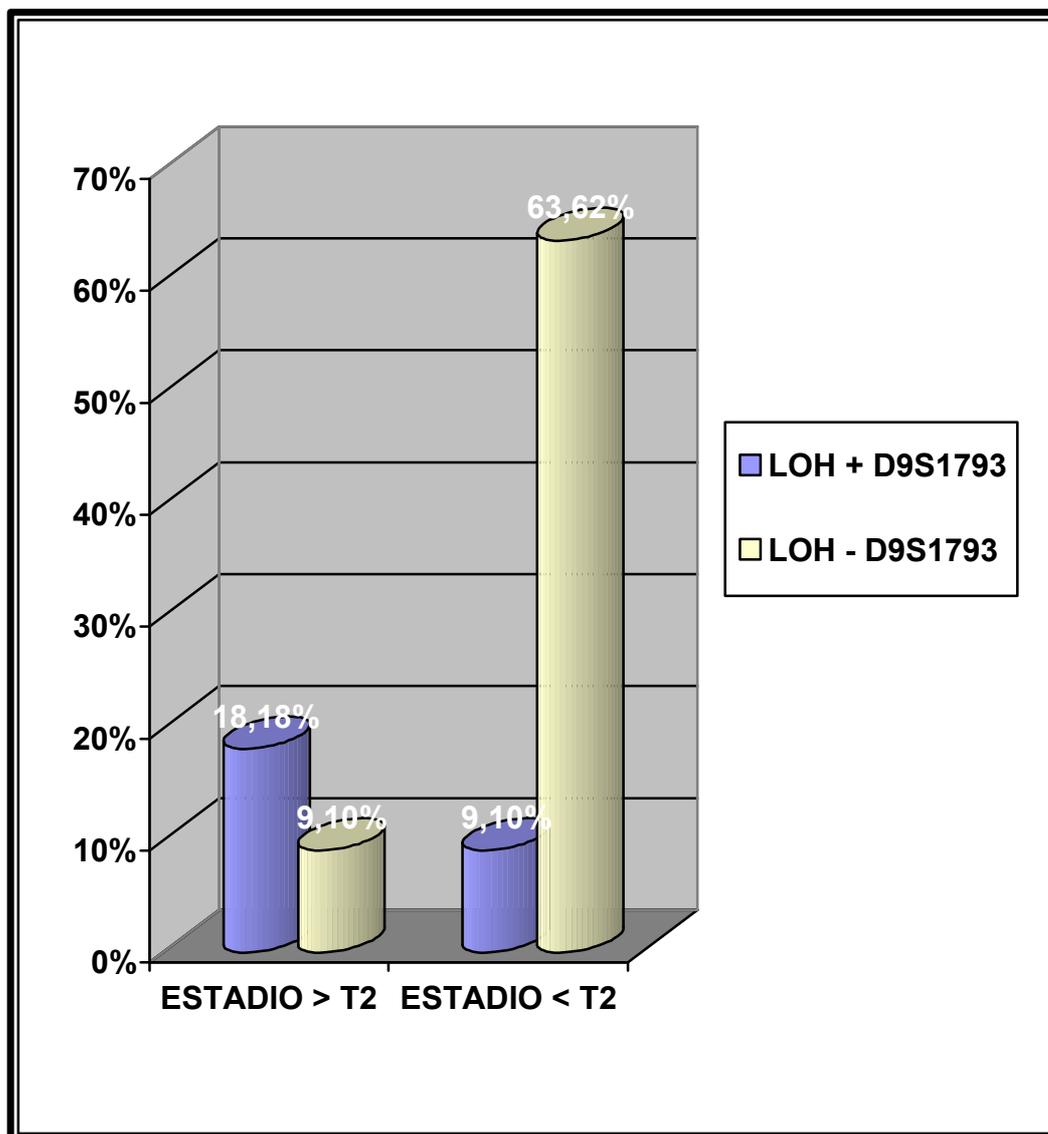


Figura 6: Relación entre la presencia de LOH del microsatélite D9S1793 y el estadio anatomopatológico de la neoforcación vesical.

DISCUSSION

La elección de estos marcadores se fundamentó en las numerosas comunicaciones que notificaban la frecuente presencia de alteraciones en el cromosoma nueve en las muestras de cáncer vesical, habiéndose descrito la pérdida de heterocigosidad del cromosoma nueve en más del 60% de los tumores de células transicionales de la vejiga. Las deleciones descritas del 9q son extensas y suelen constituir la mayor parte del brazo. Sin embargo las deleciones que afectan al 9p son más pequeñas y suelen localizarse en la región 9p21 (57). Debido a estos hallazgos se sospecha que existen dos o más genes supresores que participan en la génesis y evolución de los tumores de la vejiga urinaria en esta región cromosómica (9p21). Con el objeto de analizar las posibles alteraciones existentes en esa zona se eligieron tres microsatélites que se encuentran en su interior (D9S171, D9S126 y D9S736). (Figura 1).

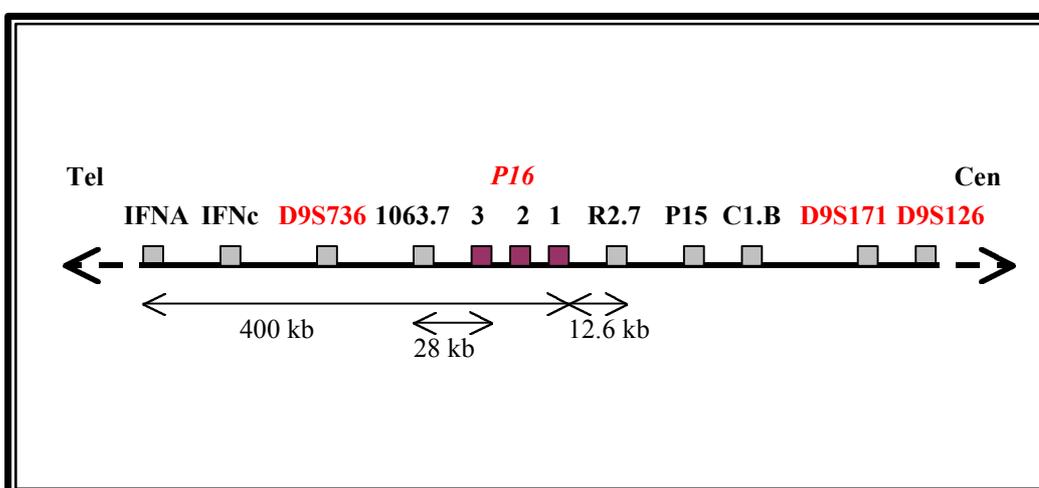


Figura 1: Mapa de la región cromosómica 9p21 (en rojo los microsatélites analizados en este estudio).

Como ya se expuso en la introducción, se ha sugerido también la influencia de los genes de los grupos sanguíneos (ABO) en la aparición y evolución posterior del cáncer

de vejiga. Estos genes se localizan en la región cromosómica 9q34; por esto se eligió para este estudio los microsatélites D9S66 y D9S1793 que también se localizan en esa región. (Figura 2)

El microsatélite D9S1848 se sitúa en la región cromosómica 9q33. En 9q33-34 se localiza el gen de la esclerosis tuberosa (TSC1) y el de la telangiectasia hemorrágica hereditaria (HHT). Ambos están involucrados en síndromes angiodisgénicos. La angiogénesis es vital para el desarrollo de los tumores, por lo que un gen que regula la angiogénesis puede ser un gen supresor. (15)

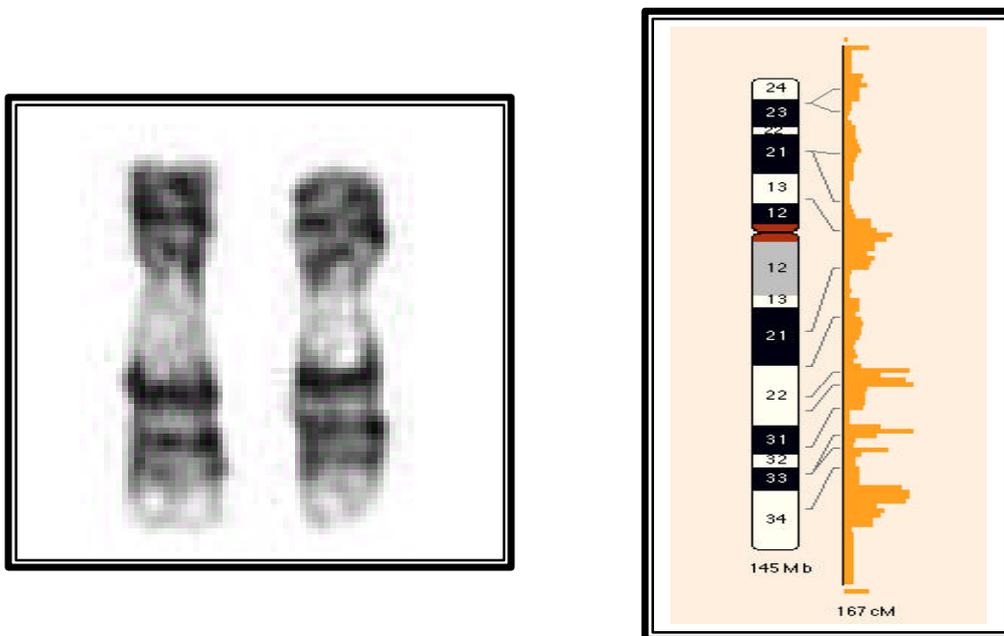


Figura 2. Cromosoma nueve.

La elección como técnica de la amplificación de microsatélites de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) frente al uso convencional de digestión con enzimas de restricción y Southern Blot para detectar fragmentos de restricción polimórficos (RFLP) la justificamos en:

La necesidad, por parte del Southern Blot, de grandes cantidades de ADN de alto peso molecular, lo cual limita el análisis de piezas de biopsia que normalmente son pequeñas, además de tener que trabajar con tejido fresco y nunca parafinado, que aunque no es nuestro caso, limita el estudio retrospectivo. Asimismo trabajar con grandes cantidades de tejido, incrementa el problema de la posible contaminación del tejido tumoral con tejido normal, la cual si sobrepasa unos límites puede enmascarar una probable pérdida alélica.

El tiempo consumido durante todo el proceso es mucho mayor (a veces una semana) que cuando trabajamos con microsatélites.

Muchas de las sondas de RFLP están limitadas por bajos grados de polimorfismo.

La técnica es dependiente del uso de enzimas de restricción, lo cual deriva en muchos casos en digestión incompleta y un alto grado de casos no informativos.

El análisis radioactivo de los RFLP, presenta también el inconveniente del uso de isótopos con la problemática que, en términos de seguridad, lleva asociada.

Por el contrario el uso de PCR y microsatélites proporciona un elevado polimorfismo, podemos usar tejido fresco y parafinado y obtenemos resultados en 48 horas.

Al estudiar los geles en algunos casos se planteó el problema de muy baja señal de amplificación, la mayor parte de las veces en el ADN procedente de la mucosa sana y otras en el del tumor. Por ello se amplificó este material con dos exones del gen de la distrofina, comprobando así si las muestras problema tenían una concentración de ADN adecuada (pues no se observaban diferencias en la intensidad de la señal del producto de amplificación entre mucosa sana y tumor) o por el contrario el ADN de partida era más

bajo con respecto a lo calculado (pues la intensidad de la señal entre la mucosa sana y el tumor seguía exhibiendo las mismas diferencias que para el caso de los microsatélites amplificados).

La mezcla de la reacción para PCR se realizó desde el principio y se llevó al termociclador para su amplificación. Se probaron diferentes medios para aumentar la especificidad, especialmente en aquellos casos en que la concentración del ADN de partida no era la óptima:

- En primer lugar la “hot start” PCR, en la cual, la mezcla del molde, los dNTPs y los cebadores se calentaban a 80-85°C antes de añadir la Taq polimerasa.
- Por otra parte la “heat soaked” PCR en la cual, se hace una desnaturalización previa del ADN molde y posteriormente añadimos el resto de la mezcla de los dNTPs, CL_2Mg , tampones, cebadores y Taq polimerasa. Tanto en este caso como en el anterior, ni el rendimiento ni la especificidad de la reacción se vieron incrementados.

Se probaron dos sistemas electroforéticos, por una parte electroforesis vertical y por otra horizontal, ambas en geles de poliacrilamida.

La concentración de poliacrilamida fue del 8%, (la literatura consultada refiere el uso de geles al 6%) con la cual los productos de amplificación se separaron mucho mejor, un aumento de la concentración de poliacrilamida al 12% no mejoró la resolución de los resultados.

En cuanto a la decisión de optar por uno u otro sistema electroforético, se valoraron diferentes factores como la menor o mayor dificultad de ejecución, la duración

del proceso (preparación y tiempo de electroforesis), la cantidad y diversidad de tampones y reactivos necesarios, la calidad de las bandas dependiente de la electroforesis después de la tinción y la disponibilidad de los geles a posteriori.

Después de probar repetidamente ambos sistemas, se prefirió la electroforesis vertical, por su más fácil ejecución, la menor duración (2h y 30 minutos frente a 3h y 30 minutos) del proceso, la necesidad de menor cantidad de tampones y ningún reactivo adicional (como en el caso de la horizontal que necesita Reppel silane para que no se adhiera el gel a los pocillos).

La calidad del producto final en ambos casos es similar, siempre sujetos a las variaciones fortuitas de la técnica.

Un tema de controversia fue la disponibilidad de los geles a largo plazo. En un principio se vio como un inconveniente de la electroforesis vertical, pues el gel al no disponer del soporte era imposible de conservar. Desarrollamos un sistema para preservarlos entre dos láminas de plástico y, a la larga, la conservación fue mejor que el del Gelbond pues éste último se iba resquebrajando con la manipulación. En cualquier caso tanto uno como otro fueron escaneados y guardada la información en un diskette.

La detección de los productos de amplificación en geles de poliacrilamida y tinción con bromuro de etidio es el medio de visualización más simple pero con las desventajas de su baja sensibilidad (sólo se pueden detectar más de 10 ng de ADN de doble cadena) y de una cuantificación subjetiva, sin olvidar su poder cancerígeno.

La tinción con plata para visualizar los productos de amplificación, ofrece las ventajas de su mayor sensibilidad (detectando cantidades de ADN del orden de picogramos) y la posibilidad de su uso en el estudio cualitativo de bandas alélicas de

microsatélites, aunque también presenta problemas por la presencia de background variable y disposición no lineal de la plata. Algunos autores usan este método para cuantificación alélica, aunque nunca puede correlacionarse con la cuantificación por RFLP radioactivo.

Un problema común a todos los métodos de detección empleados especialmente con el uso de repeticiones de dinucleótidos, es la aparición de bandas “stutter” junto a las bandas correspondientes a los microsatélites, diferenciándose de ellas en sólo 1 ó 2 bp. El mecanismo de producción de tales bandas se piensa que es debido a fallos en la lectura de la Taq polimerasa, por deslizamiento durante la reacción, a través de la región de repetición, generando así fragmentos más pequeños. Este hecho puede producirse incluso en el lugar de la pérdida alélica. Podemos aminorarlo disminuyendo el tiempo de exposición o la cantidad de ADN cargado en el gel, consiguiendo así detectar únicamente los verdaderos alelos prominentes pero con el riesgo de no detectar alelos verdaderos pero menos intensos.

La problemática de las bandas “stutter” representa una dificultad muy seria de los estudios de inestabilidad de microsatélites, confundiéndonos en la determinación alélica especialmente cuando se usan métodos de detección convencionales como radiografía o tinción con plata.

Una segunda fuente de confusión es la presencia de bandas débiles en el lugar de la posible pérdida alélica, lo cual normalmente representa contaminación con ADN constitucional, es decir, presencia variable de pequeñas cantidades de genotipo

constitucional procedente de células endoteliales o inflamatorias en el tumor. También se ha relacionado la presencia de estas diminutas bandas a la existencia dentro del tumor de subclones que todavía tienen ambas copias del alelo hipotéticamente perdido.

Numerosos autores, experimentaron con cambios en el número de ciclos durante la amplificación del material a estudiar y observaron que no se producían cambios sustanciales en la intensidad alélica entre los 25 y 30 ciclos. Williamson et al (22) encuentran una mayor sensibilidad para la detección de pérdida de heterocigosidad de los microsatélites estudiados cuando realizan más de 25 ciclos de PCR.

En lo referente al criterio de pérdida de heterocigosidad (LOH), lo hemos establecido como pérdida total o de al menos un 50% de un alelo en tejido tumoral con respecto al tejido constitucional. Debido a la subjetividad del análisis y a las dificultades técnicas (bandas “stutter”) al escaneo de los geles teñidos con plata hemos acoplado un método densitométrico, el cual nos permite de manera objetiva calcular la altura de pico correspondiente a cada uno de los productos y la comparación entre tejido constitucional y tumoral. Es un método rápido y proporciona un tamaño bastante exacto del alelo. Hemos utilizado un programa de análisis densitométrico (UTHSCSA Image tool) con estudio matemático posterior de los resultados. Establecimos desde el principio del estudio que ratios menores o iguales a 0.50 eran indicativos de pérdida de heterocigosidad. (65-66-67)

Esta técnica nos permite detectar y analizar las repeticiones CA y hace más fácil la identificación y posterior cuantificación de los alelos entre las bandas “stutter” no

específicas. Es más rápido que el uso de los RFLP o la detección radioactiva y permite la cuantificación automática de las bandas.

Willers (68), define LOH como la ausencia o la disminución de la intensidad de las señales autorradiográficas en al menos dos veces cuando se compara el ADN tumoral con el correspondiente del tejido normal.

Trapman (69) establece LOH por comparación únicamente visual de la intensidad de las bandas alélicas obtenidas en tumor y mucosa, siendo juzgados estos patrones por al menos tres investigadores diferentes.

Cawkwell (67), establece el término de pérdida de heterocigosidad después de calcular el ratio alélico entre tejido tumoral y normal tras PCR fluorescente y análisis densitométrico posterior, en términos de tamaño de pico (altura y área)

D'Errico (70), define LOH como la reducción de al menos 50% de la señal de un alelo al compararlo con el correspondiente alelo normal.

Por lo tanto hemos utilizado para asignar el carácter de LOH a un tumor, criterios no solamente subjetivos (análisis visual de las bandas por parte de tres investigadores), sino también el análisis densitométrico, mediante el programa UTHSCSA Image tool para windows 2.00.

Aunque el número de pacientes estudiado es pequeño, los resultados obtenidos nos facilitan una perspectiva de la utilidad potencial del análisis de estos microsatélites en los pacientes que tienen cáncer vesical.

No hemos encontrado en la literatura médica ningún trabajo que analice las relaciones entre la presencia de alteraciones en el patrón de estos microsatélites y la evolución de los pacientes en los que se demuestre una significación estadística entre la aparición de LOH y el pronóstico. Únicamente T Takahashi (29) realizó un estudio de inestabilidad de microsatélites en pacientes con cáncer de vejiga en el que se incluían los mismos microsatélites, entre otros, que en este estudio pero no analizó en concreto las anomalías de cada microsatélite sino que los agrupó en función del brazo cromosómico en el que se encontraban y los estudió con el fin de demostrar el origen clonal de los tumores multifocales del tracto urinario.

El 59% de los pacientes analizados presentó anomalías en al menos 1 de los microsatélites estudiados. El 27.27% sólo presenta anomalías en uno de los microsatélites, mientras que el 31.81% tuvo anomalías en dos o más de los microsatélites analizados.

El único tipo de anomalías encontradas en el análisis de estos microsatélites de los pacientes que componían la muestra fue la pérdida de heterocigosidad (LOH). Así pues no pudimos detectar la presencia de inestabilidad de microsatélites, coincidiendo con otros autores que no han podido demostrar esta anomalía ni en la orina ni en el tejido tumoral de los pacientes con cáncer de vejiga (71)(72)(27).

Si analizamos los resultados de pérdida de heterocigosidad en función de los brazos cromosómicos obtenemos que el 36.36% de los pacientes estudiados tenían LOH de al menos un marcador situado en el brazo corto del cromosoma nueve. El 45.45% de los pacientes del estudio presentaban LOH de al menos un marcador situado en el brazo

largo del cromosoma nueve, por lo que la incidencia de las alteraciones del brazo largo fue superior a las del brazo corto.

Gonzalez-Zulueta et al (52) analizaron la existencia de alteraciones en el patrón de microsatélites (D9S59, D9S63, D9S64, D9S146, D9S156 y D17S513) de pacientes afectos de cáncer vesical. Estos autores sólo apreciaron LOH de alguno de estos marcadores en el 3% de los enfermos y en todos los casos se correspondían con pacientes que presentaban tumores superficiales.

Mao et al (53) demostraron la presencia de inestabilidad de los microsatélites estudiados en el 28.1% de los tumores que analizaron.

A su vez Uchida et al (54) encontraron alteraciones en los microsatélites analizados en el 21.1% de los tumores vesicales.

Estas diferencias entre los autores podrían explicarse por las desiguales cantidades y tipos de microsatélites analizados en cada estudio.

Orlow et al (7) encontraron que el 41% de los tumores de vejiga que analizaron presentaban alteraciones en el microsatélite D9S54, que se localiza en el brazo corto del cromosoma 9.

Williamson et al (22) analizan los microsatélites IFNA, D9S162, **D9S736**, **D9S171** y **D9S126** en 16 líneas celulares de cáncer de vejiga. En el caso del D9S736 encuentran

una frecuencia del 81.25% de pérdida de heterocigosidad. Para el D9S171 encontraron una frecuencia de LOH del 56.25%, y para el D9S126 de un 75%. Los resultados en cuanto a la pérdida de heterocigosidad en nuestro estudio muestran unas frecuencias del 38.09 para el microsatélite D9S171, 4.76% para el D9S736 y un 4.76% para el D9S126.

Devlin et al (57) en una serie de 16 tumores uroteliales de vejiga encuentran una incidencia de pérdida de heterocigosidad para el microsatélite **D9S171** del 43.75%, para el **D9S66** del 31.25%, para el **D9S736** del 18.75% y para el **D9S126** del 56.25%; pero no analiza estos resultados en función de las características biológicas del tumor y la evolución de los pacientes.

Cheng et al (58) analizan el microsatélite **D9S171** en nueve pacientes afectados de cáncer vesical obteniendo un 67% de LOH de este marcador en el tejido tumoral.

Uchida et al (62) analizan, entre otros el microsatélite **D9S171** en veintiséis pacientes afectados de cáncer vesical, obteniendo un 23.07% de LOH para este marcador. Además apreciaron que el 71% (12) de los pacientes que poseían un tumor vesical infiltrante presentaban al menos una LOH en al menos uno de los microsatélites usados como marcadores de la región cromosómica 9p21-22, resultando esta asociación estadísticamente significativa. En nuestro estudio el 50% de los tumores infiltrantes presento una LOH en al menos uno de los microsatélites que analizaba esa misma región cromosómica, pero esta relación no resultó estadísticamente significativa, pues el 50%

restante de los pacientes que presentaban LOH en al menos un microsatélite de la región 9p21-22 presentaban un tumor vesical superficial.

Zhang et al (63) encuentran que, mientras que el **D9S171** es un marcador con un alto índice de pérdida de heterocigosidad en los pacientes occidentales afectos de cáncer de vejiga, en los pacientes chinos afectos de esta neoplasia su índice de LOH es muy inferior, del orden del 2.63%.

Estas diferencias en las frecuencias de aparición de pérdida de heterocigosidad cuando comparamos líneas celulares de cáncer vesical con las muestras obtenidas directamente del paciente con tumor vesical son también constatadas por otros autores como Cairns (59) y Spruck (60). Estos autores han sugerido que las altas tasas de LOH presentes en las líneas celulares pueden representar un artefacto, consecuencia de su manipulación in vitro, y que otro gen supresor cercano puede ser la auténtica diana in vivo. Este gen supresor cercano podría ser el p15, o incluso algún otro gen desconocido y situado en la región 9p21.

Orlow (7) encuentra que las alteraciones en los microsatélites del brazo corto del cromosoma nueve son más frecuentes en los tumores vesicales de mayor estadio (este autor analiza los microsatélites D9S54, IFNA y D9S3 situados en el brazo corto del cromosoma nueve y los marcadores D9S7, D9S10, ASS, ABL y D9S28 situados en el brazo largo del cromosoma 9; que no coinciden con los de este estudio) por lo que supone que las pérdidas de heterocigosidad en el brazo corto del cromosoma nueve ocurren con posterioridad a las que aparecen en el brazo largo en la evolución del cáncer

vesical y le confieren al tumor propiedades más agresivas. Sin embargo en nuestro estudio apreciamos que el único microsatélite cuya alteración fue estadísticamente significativa cuando se analizó su relación con la aparición de un cáncer vesical infiltrante fue el D9S1793, que se localiza en el brazo largo del cromosoma nueve (9q). Así pues podríamos deducir, en contraposición con la opinión de Orlow (7) y de Simoneau (15) que, según los datos emanados de nuestro estudio las pérdidas de heterocigosidad en el brazo largo del cromosoma nueve son posteriores evolutivamente a las localizadas en el brazo corto y confieren al tumor vesical un fenotipo más agresivo. Sin embargo para afirmar esto deben realizarse series más numerosas en las que se estudien un mayor número de microsatélites en los brazos implicados, que confirmen estos hallazgos.

La importancia de las alteraciones en el cromosoma nueve, ya no sólo en la aparición del cáncer vesical, sino también en su evolución hacia un tumor vesical infiltrante fue también observada por Spruck (30).

Simoneau et al (15) analizaron, entre otros marcadores el microsatélite **D9S171**, pero en su comunicación no desglosa sus resultados en cuanto a cada marcador analizado en concreto, por lo que no podemos comparar nuestros resultados con este marcador, que por otro lado es el único que coincide con alguno de los estudiados por nosotros.

Mao et al (55) analizan entre otros marcadores el **D9S171** en la orina de pacientes con cáncer de vejiga, encontrando para este marcador una pérdida de heterocigosidad en el 20% de una población muestral de 20 pacientes. Luego analiza las

muestras de tejido tumoral obtenidas de esos pacientes y comprueba que el 100% de los pacientes analizados que tenían LOH en orina la mantenían en el tejido tumoral (excepto uno que no se pudo analizar porque se extravió la muestra de tejido). De este modo concluye que la determinación de LOH de estos microsatélites en orina puede ser un arma de gran valor en el diagnóstico de las recidivas tumorales, e incluso en un intento de screening de pacientes afectados de cáncer de vejiga.

Uchida et al (54) estudiaron la presencia de alteraciones en los microsatélites D3S128, D3S643, APC, D5S107, LPL5GT, D9S63, D17S261, P53 y DCC y analizó su relación con la presencia de hábito tabáquico en esos pacientes. Aunque la frecuencia de alteraciones era mayor en el grupo de fumadores con respecto a los no fumadores, no pudo demostrar que existiera una relación estadísticamente significativa entre el hábito de fumar y la alteración de alguno de los marcadores estudiados.

En nuestro estudio hemos demostrado una relación estadísticamente significativa entre el hábito tabáquico y la presencia de pérdida de heterocigosidad del microsatélite D9S66 (situado en la región 9q34) con una p de 0.018. Estos resultados nos hacen pensar que el factor inductor que tiene el tabaco sobre el cáncer vesical puede pasar por la pérdida de heterocigosidad en esta región cromosómica donde se localiza el gen que codifica los antígenos sanguíneos ABO y cuya pérdida se ha asociado con una tasa de recurrencia y progresión a estadios infiltrantes mayor en los pacientes con cáncer superficial de vejiga. En esta región se encuentra también el gen de la esclerosis tuberosa (TSC1) y el de la telangiectasia hemorrágica hereditaria (HHT) que también se

ha considerado por algunos autores como un gen supresor en la génesis del cáncer de vejiga (61).

CONCLUSIONES

1. El uso de un programa de análisis densitométrico como el UTHSCSA Image Tool, objetiviza el análisis, permitiendo detectar y analizar las repeticiones CA de una manera sencilla y rápida, y facilita la identificación y posterior cuantificación de los alelos.
2. Del estudio de los microsatélites D9S126, D9S736 y D9S1848 no se obtuvo ninguna relación significativa con los datos de exposición a tóxicos, estadio tumoral y evolución de la enfermedad, en los enfermos estudiados.
3. En concordancia con los hallazgos de otros autores no hemos apreciado la existencia de fenómenos de inestabilidad de microsatélites en los marcadores que hemos analizado.
4. Hemos observado que existe una asociación estadísticamente significativa entre la existencia de pérdida de heterocigosidad de al menos alguno de los microsatélites D9S66, D9S171 y D9S1793 y la existencia de un fenotipo tumoral más agresivo. Este hallazgo podría ser muy útil a la hora de aplicar un tratamiento más radical, o hacer un seguimiento más cercano a los pacientes que cumplen estas características.
5. Hemos observado una asociación estadísticamente significativa entre la existencia de un hábito tabáquico, sobre todo cuando el consumo excede de los 40 cigarrillos al

día, y la presencia de pérdida de heterocigosidad del microsatélite D9S66 en las muestras tumorales provenientes de estos pacientes.

6. Hemos encontrado una asociación estadísticamente significativa entre la existencia de pérdida de heterocigosidad de al menos alguno de los microsatélites D9S66, D9S171 y D9S1793 y el tamaño del tumor en el momento del diagnóstico, de modo que esta circunstancia es más frecuente en los tumores cuyo tamaño es mayor de 2 cm.

7. Hemos apreciado que sólo el 8.7% (2) de los agricultores presentaron pérdida de heterocigosidad de los microsatélites estudiados, frente al 47.82% (11) de frecuencia de LOH entre los pacientes que no eran agricultores. El análisis estadístico de estos parámetros no ha resultado significativo, probablemente por el discreto tamaño de la muestra, aunque si se aprecia una tendencia hacia ello. Podríamos deducir que la aparición del cáncer de vejiga en los agricultores se realiza a través de una vía molecular diferente a la que hemos analizado en este estudio.

8. Hemos observado una asociación estadísticamente significativa entre la existencia de un tumor vesical infiltrante y la existencia de pérdida de heterocigosidad en el microsatélite D9S1793.

9. El hecho de que el marcador D9S1793 se localice en el brazo largo del cromosoma nueve y la circunstancia de que su alteración se asocie a la existencia de un cáncer vesical infiltrante, nos hace pensar que las alteraciones que conducen a la aparición del cáncer vesical ocurren con anterioridad en el brazo corto del cromosoma nueve y que cuando afectan al brazo largo pueden condicionar un comportamiento más agresivo de este tumor vesical. Esto debe ser confirmado con otros estudios pues otros autores encuentran que la alteración del brazo corto del cromosoma nueve es más frecuente en los tumores más agresivos.

10. De los resultados de este estudio se desprende que la pérdida de heterocigosidad de los microsatélites D9S66, D9S171 y D9S1793 constituye un marcador de mal pronóstico en la evolución del cáncer vesical, siendo capaz de diferenciar aquellos tumores vesicales de mejor pronóstico de los que tendrán una evolución más desfavorable; por lo que nos permitiría realizar un seguimiento más cercano y/o aplicar un tratamiento más agresivo a este último grupo de neoplasias.

BIBLIOGRAFIA

1. Lopez-Abente G. Bladder cancer in Spain. Mortality trends (1955-1975). *Cancer*. 1983; 51:2367.
2. HW Herr. Natural history of superficial bladder tumors: 10 to 20 year follow up of treated patients. *World J Urol* 15: 84-8, 1997.
3. KP Cantor. Drinking water and cancer. *Cancer Causes Control* 8: 292-308, 1997.
4. RF Jones, MD Rychter, CY Wang. Chemical carcinogenesis of the urinary bladder – a status report. *Cancer Res Clin Oncol* 118: 411-419, 1992.
5. H Primdahl, H Maase, M Christensen, H Wolf y TF Orntoft. Allelic deletions of cell growth regulators during progression of bladder cancer. *Cancer Res* 60: 6623-6629, 2000.
6. P Cairns, ME Shaw, MA Knowles. Initiation of bladder cancer may involve deletion of a tumour-supressor gene on chromosome 9. *Oncogene* 8: 1083-1085, 1993.
7. I Orlow, P Lianes, L Lacombe, G Dalbagni, VE Reuter, C Cordon-Cardo. Chromosome 9 allelic losses and microsatellite alterations in human bladder tumors. *Cancer Res* 54: 2848-2851, 1994.

8. WM Stadler, J Sherman, SK Bohlander, D Roulston, M Dreyling, D Rukstalis, OI Olopade. Homozygous deletions within chromosomal bands 9p21-22 in bladder cancer. *Cancer Res* 54: 2060-2063, 1994.
9. MA Knowles. La genética del carcinoma de células transicionales: progresión y aplicación clínica potencial. *BJU International* 84: 412-427, 1999.
10. HB Grossman, M Liebert, M Antelo et al. P53 and Rb expression predict progression in T1 bladder cancer. *Clin Cancer Res* 4: 829-834, 1998.
11. J Southgate, J Proffitt, P Roberts, B Smith, P Selby. Loss of cyclin-dependent kinase inhibitor genes and chromosome 9 karyotypic abnormalities in human bladder cancer cell lines. *Br J Cancer* 72: 1214-1218, 1995.
12. P Korkolopoulou, P Christodoulou, A Lazaris, ET Tsagli, P Kapralos, A Papanikolaou, I Kalliteraki, P Davaris. Prognostic implications of aberrations in p16/pRb pathway in urothelial bladder carcinomas: A multivariate analysis including p53 expression and proliferation markers. *Eur Urol* 39: 167-177, 2001.
13. I Orlow, H La Rue, I Osman, L Lacombe, L Moore, F Rabbani, F Meyer, Y Fradet, C Cordon-Cardo. Deletions of the INK4A gene en superficial bladder tumors. Association with recurrence. *Am J Pathol* 155: 105-113, 1999.

14. CT Lee, JY Seol, KH Park, CG Yoo, YW Kim, C Ahn, YW Song, SK Han, JS Han, S Kim, JS Lee, YS Shim. Differential effects of Adenovirus-p16 on Bladder Cancer cell lines can be overcome by the addition of butyrate. *Clin Cancer Res* 7: 210 – 214, 2001.

15. AR Simoneau, CH Spruck, M Gonzalez-Zulueta, ML Gonzalgo, MF Chan, YC Tsai, M Dean, K Steven, T Horn, PA Jones. Evidence for two tumor suppressor loci associated with proximal chromosome 9p to q and distal chromosome 9q in bladder cancer and the initial screening for GAS1 and PTC mutations. *Cancer Res* 56: 5039-5043, 1996.

16. PA Farndon, RG Del Mastro, DGR Evans, MW Kilpatrick. Location of gene for Gorlin syndrome. *Lancet* 339: 581-582, 1992.

17. B Czerniak, V Chaturvedi, L Li, S Hodges, D Johnston, JY Ro, R Luthra, C Logothetis, AC von Eschenbach, HB Grossman, WF Benedict, JG Batsakis. Superimposed histologic and genetic mapping of chromosome 9 in progression of human urinary bladder neoplasia: implications for a genetic model of multistep urothelial carcinogenesis and early detection of urinary bladder cancer. *Oncogene* 18: 1185-1196, 1999.

18. LA Takle, MA Knowles. Deletion mapping implicates two tumor suppressor genes on chromosome 8p in the development of bladder cancer. *Oncogene* 12: 1083-1087, 1996.

- 19.** M Li, Z Zhang, VE Reuter, C Cordon-Cardo. Chromosoma 3 allelic losses and microsatellite alterations in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Am J Pathol* 149: 229-237, 1996.
- 20.** DE Neal, K Mellon. Epidermal growth factor receptor and bladder cancer: A review. *Urol Int* 48: 365-371, 1992.
- 21.** D Sidransky, E Messing. Molecular genetics and biochemical mechanisms in bladder cancer. Oncogenes, tumor suppressor genes and growth factors. *Urologic clinics of north america* Vol 19, N°4, 629 – 746, 1992.
- 22.** MP Williamson, PA Elder, ME Shaw, J Devlin, MA Knowles. P16 (CDKN2) is a major deletion target at 9p21 in bladder cancer. *Hum Mol Genet* 4: 1569-1577, 1995.
- 23.** H Miyamoto, Y Kubota, K Fujinami, Y Dobashi, K Kondo, M Yao, T Shuin, M Hosaka. Infrequent somatic mutations of the p16 and p15 genes in human bladder cancer: p16 mutations occur only in low grade and superficial bladder cancers. *Oncol Res* 7: 327-330, 1995.
- 24.** M Tsutsumi, YC Tsai, ML Gonzalgo, PW Nichols, PA Jones. Early acquisition of homozygous deletions of p16/p19 during squamous cell carcinogenesis and genetic mosaicism in bladder cancer. *Oncogene* 17: 3021-3027, 1998.

- 25.** P Korkolopoulou, P Christodoulou, AE Konstantinidou, ET Tsagli, P Kapralos, P Davaris. Cell cycle regulators in bladder cancer: A multivariate survival study with emphasis on p27Kip1. *Hum Pathol* 31: 751-760, 2000.
- 26.** D Sidransky, AV Eschenbach, YC Tsai, P Jones, I Summerhayes, F Marshall, M Paul, P Green, SR Hamilton, P Frost, B Vogelstein. Identificacion of p53 gene mutations in bladder cancer and urine samples. *Science* 252: 706-709, 1991.
- 27.** G Sourvinos, I Kazzanis, D Delakas, A Cranidis, DA Spandidos. Genetic detection of bladder cancer by microsatellite analysis of p16,Rb1 and p53 tumor supressor genes. *J Urol* 165: 249-252, 2001.
- 28.** S Sarkar, KP Jülicher, MS Burger, VD Valle, CJ Larsen, TR Yeager, TB Grossman, RW Nickells, C Protzel, DF Jarrard, CA Reznikoff. Different combinations of genetic/epigenetic alterations inactivate the p53 and pRb pathways in invasive human bladder cancers. *Cancer Res* 60: 3862-3871, 2000.
- 29.** T Takahashi, T Habuchi, Y Takehi, K Mitsumori, T Akao, T Terachi, O Yoshida. Clonal and cronological genetic analysis of multifocal cancers of the bladder and upper urinary tract. *Cancer Res* 58: 5835-5841, 1998.
- 30.** CH Spruck III, PF Ohneseit, M Gonzalez-Zulueta, D Esrig, N Miyao, YC Tsai, SP Lerner, C Schmüte, AS Yang, R Cote, L Dubeau, PW Nichols, GG Hermann, K Steven, T

Horn, DG Skinner, PA Jones. Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* 54: 784-788, 1994.

31. MA Sutton, SA Berkman, S Chen, A Block, TD Dang, MW Kattan, TM Wheeler, DR Rowley, S Woo, SP Lerner. Adenovirus mediated suicide gene therapy for experimental bladder cancer. *Urology* 49: 173-180, 1997.

32. JD Seigne. Gene therapy of bladder cancer. *Cancer Control: JMCC* 3: 428-433, 1996.

33. W Messier, S Li, C Stewart. The birth of microsatellites. *Nature* 381: 483, 1996.

34. Li Jin, Yixi Zhong, Ranajit Chakraborty. The exact number of possible microsatellite motifs. *Am. J. Hum. Genet.* 55: 582-583, 1994.

35. John Koreth, John J. O' Leary, James O' D. McGee. Microsatellites and PCR genomic analysis. *J. Pathol.* 178, 239-248, 1996.

36. Aziz Sancar. Mechanisms of DNA excision repair. *Science* 266: 1954-1956, 1994.

37. Paul Modrich. Mismatch repair, genetic stability, and cancer. *Science* 266: 1959-1960, 1994.

- 38.** JR Eshleman, SD Markowitz, PS Donover, EZ Lang, JD Lutterbaugh, G Li, M Longley, P Modrich, ML Veigl, WD Sedwick. Diverse hypermutability of multiple expressed sequence motifs present in a cancer with microsatellite instability. *Oncogene* 12: 1425-1432, 1996.
- 39.** D Sidransky. Nucleic acid-based methods for the detection of cancer. *Science* 278: 1054-1059, 1997.
- 40.** LA loeb. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* 51: 3075-3079, 1991.
- 41.** K McCarthy. Microsatellites: heroes and villains. *Lancet* 346: 1177, 1995.
- 42.** M Strand, TA Prolla, RM Liskay, TD Petes. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* 365: 274-276, 1993.
- 43.** G Streisinger, Y Okada, J Emrich, J Newton, A Tsugita, E Terzaghi, YN Inouye. Frameshift mutations and the genetic code. *Quant. Biol.* 31: 77-84, 1966.
- 44.** TA Brentnall. Microsatellite instability. Shifting concepts in tumorigenesis. *Am J Pathol* 147: 561-564, 1995.
- 45.** F Palombo, M Hughes, J Jiricny. Mismatch repair and cancer. *Nature* 367: 417, 1994.

- 46.** C E Bronner et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 368: 258-261, 1994.
- 47.** R Parsons et al. Mismatch repair deficiency in phenotypically normal human cells. *Science* 268: 738-740, 1995.
- 48.** R Fischel, A Ewel, S Lee, MK Lescoe, J Griffith. Binding of mismatched microsatellite DNA sequences by the human MSH2 protein. *Science* 266: 1403-1405, 1994.
- 49.** M Perucho. Cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Biological Chem* 377: 675-684, 1996.
- 50.** Wolfgang Dietmaier, Sabine Wallinger, Tina Bocker, Frank Kullmann, Richard Fishel, and Josef Rüschoff. Diagnostic Microsatellite Instability: Definition and Correlation with Mismatch Repair Protein Expression. *Cancer Research* 57: 4749-4756, 1997.
- 51.** Z Li, LA Aaltonen, Q Shu, S Srivastasa, W Grizzle, D Shibata. Effects of mutation and growth rates on patterns of microsatellite instability. *Am J Pathol* 148: 1757-1761, 1996.
- 52.** M Gonzalez-Zulueta, JM Ruppert, K Tokino, YC Tsai, CH Spruck III, N Miyao, PW Nichols, GG Hermann, T Horn, K Steven, IC Summerhayes, D Sidransky, PA Jones. Microsatellite instability in bladder cancer. *Cancer Res* 53: 5620-5623, 1993.

- 53.** L Mao, DJ Lee, MS Tockman, YS Erozan, F Askin, D Sidransky. Microsatellite alterations as clonal markers for the deletion of human cancer. *Proc Nat Acad Sci* 91: 9871-9875, 1994.
- 54.** T Uchida, C Wang, C Wada, M Iwamura, S Egawa, K Koshihara. Microsatellite instability in transitional cell carcinoma of the urinary tract and its relationship to clinicopathological variables and smoking. *Int J Cancer* 69: 142-145, 1996.
- 55.** L Mao, MP Schoenberg, M Scicchitano, YS Erozan, A Merlo, D Schwab, D Sidransky. Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis. *Science* 271: 659-662, 1996.
- 56.** G Steiner, MP Schoenberg, JF Linn, L Mao, D Sidransky. Detection of bladder cancer recurrence by microsatellite analysis of urine. *Nature Medicine* 3: 621-624, 1997.
- 57.** J Devlin, AJ Keen, MA Knowles. Homozygous deletion mapping at 9p21 in bladder carcinoma defines a critical region within 2cM of IFNA. *Oncogene* 9: 2757-2760, 1994.
- 58.** L Cheng, DG Bostwick, G Li, S Zhang, AO Vortmeyer, Z Zhuang. Conserved genetic findings in metastatic bladder cancer: a possible utility of allelic loss of chromosomes 9p21 and 17p13 in diagnosis. *Arch Patol Lab Med* 9: 1197-1199, 2001.

- 59.** P Cairns, L Mao, A Merlo, DJ Lee, D Schwab, Y Eby, K Tokino, P Van der Riet, JE Blaugrund, D Sidransky. Rates of p16 (MTS1) mutations in primary tumors with 9p loss. *Science* 265: 415-416, 1994.
- 60.** CH Spruck III, M Gonzalez-Zulueta, A Shibata, AR Simoneau, MF Lin, F Gonzales, YC Tsai, PA Jones. P16 gene in uncultured tumors. *Nature* 370: 183-184, 1994.
- 61.** N Hornigold, J Devlin, AM Davies, JS Aveyard, T Habuchi, MA Knowles. Mutation of the 9q34 gene TSC1 in sporadic bladder cancer. *Oncogene* 16: 2657-2661, 1999.
- 62.** A Uchida, M Tachibana, A Miyakawa, K Nakamura, M Murai. Microsatellite analysis in multiple chromosomal regions as a prognostic indicator of primary bladder cancer. *Urol Res* 28: 297-303, 2000.
- 63.** J Zhang, Z Fan, Y Gao, Z Xiao, C Li, Q An, S Cheng. Detecting bladder cancer in the chinese by microsatellite analysis: Ethnic and etiologic considerations. *J Natl Cancer Inst* 93: 45-50, 2001.
- 64.** J Sambroock y cols. *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2nd edition. CSH laboratory press, Cold Spring Harbor, New York. 1989.

- 65.** E Solomon R Voss, V Hall, WF Bodmer, JR Jass, AJ Jeffreys, FC Lucibello, I Patel, SH Rider. Chromosome 5 allele loss in human colorectal carcinomas. *Nature* 328: 616-621, 1987.
- 66.** P B Bethwaite, J Koreth, CS Herrington, JO McGee. Loss of heterozygosity occurs at the D11S29 locus on chromosome 11q23 in invasive cervical carcinoma. *Br J Cancer* 71: 814-818, 1995.
- 67.** L Cawkwell, SM Bell, FA Lewis, MF Dixon, GR Taylor, P Quirke. Rapid detection of allele loss in colorectal tumors using microsatellite and fluorescent technology. *Br J Cancer* 67: 1262-1267, 1993.
- 68.** C P Willers, R Siebert, W Bardenheuer, A Lux, S Michaelis, S Seeber, HJ Luboldt, B Opalka, J Schutte. Genetic instability of 3p12-p21 specific microsatellite sequences in renal cell carcinoma. *Br J Urol* 77: 524-530, 1996.
- 69.** J Trapman, HF Sleddens, MM van der Weiden, WN Dinjens, JJ Konig, FH Schroder, PW Faber, FT Bosman. Loss of heterozygosity of chromosome 8 microsatellite loci implicates a candidate tumor suppressor gene between the loci D8S87 and D8S133 in human prostate cancer. *Cancer Res* 54: 6061-6064, 1994.
- 70.** M D'Errico y cols. P53 mutations and chromosome instability in basal cell carcinomas developed at an early or late age. *Cancer Res* 57: 747-752. 1997

71. M Neves, C Ciofu, F Larousserie, J Fleury, M Sibony, A Flahault, F Soubrier, B Gattegno. Prospective evaluation of genetic abnormalities and telomerase expression in exfoliated urinary cells for bladder cancer detection. *J Urol* 167: 1276-1281, 2002.

72. C Bonnal, V Ravery, M Toublanc. Absence of microsatellite instability in transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology*, 55: 287, 2000.