

ANORMALIDADES CROMOSOMICAS EN TUMORES UROLÓGICOS DE CORDOBA, ARGENTINA

Lerda, D.* , Paladini, M**, Lopez, S.** , Sambuelli, R.***, Gomez, S*** , Tehaux, R.*** Guidi, A.***, Armando, L.***, Braxs, C.*, Biagi Bistoni, M.* , Pellicioni, P.* , Mangeaud, A*

* Laboratorio de Genética – Facultad de Medicina-Universidad Católica de Córdoba.

** Servicio de Urología - Clínica Privada Universitaria Reina Fabiola-Universidad Católica de Córdoba.

*** Cátedra de Anatomía Patológica y Fisiopatología – Facultad de Medicina-Universidad Católica de Córdoba. Jacinto Ríos 571 – B° General Paz – 5000 Córdoba – dlerda@coyspu.com.ar

Resumen

Purpose: La identificación de genes específicos o regiones de cromosomas involucrados con el desarrollo de determinados tumores puede ayudar al diagnóstico, formular pronósticos, monitorear pacientes y eventualmente desarrollar terapias selectivas.

Materials and Methods:

Se estudiaron 80 tumores sólidos procedentes de cirugía: vejiga (n= 28) obtenido por resección endoscópica transuretral, próstata (n=24) y riñón (n= 28) recolectados en el acto operatorio en fresco. Las muestras fueron recibidas en Anatomía Patológica para su estudio histopatológico y una porción del tumor fue utilizado para realizar cultivo de tejidos y posterior estudio citogenético.

Results:

En los tumores de **vejiga** la del (9)(p21) fue detectada en 17 de 28 casos, el 60,7 % de los tumores. La del(11)(p13) ocurrió en 6 (21,4%) de 28 tumores. La t(1;14)(q22;q32) fue observada en 5 casos, el 17,8 % de los tumores. En los tumores **renales** la del (3)(p13) fue detectado en 18 (64 %) de 28 tumores. La del(14)(q24) fue detectada en 10 de 28 tumores (35,7 %). En este estudio, la citogenética en tumores de **próstata** con grado Gleason 7, 8 y 9 mostró aneuploidía del cromosoma 7 en 16 tumores (66,6 %). Además se hallaron en 8 tumores (33,3 %) con grado Gleason 9 la del (16)(q24).

Conclusions:

En los tumores de **vejiga**, el hallazgo mas interesante fue la t(1;14)(q22;q32) en vejigas hiperplásicas, que en el tiempo se transformaron en carcinoma transicional. La citogenética anticipó la evolución neoplásica, aspecto este que requiere de futuras investigaciones para determinar si se repiten estas alteraciones neoplásicas en vejigas hiperplásicas. Este estudio sugiere que el marcador genético del sitio cromosómico 14q, puede predecir la evolución clínica del carcinoma **renal** de células claras. En cuanto a los tumores de **próstata** el hallazgo más importante aparte de la tri 7, fue la del (16)(q24). Esto sugiere que el marcador genético de este sitio cromosómico puede predecir el potencial metastásico del tumor.

Introducción

Dentro de los tumores genito-urinarios, los más frecuentes son los que se originan en la próstata y vejiga, seguidos de los tumores de riñón. El carcinoma urotelial del epitelio transicional es el más frecuente cáncer de **vejiga** en Europa, USA y Argentina, representando el 90-95 % de los casos, mientras el carcinoma de células escamosas representa solo el 5 % en estos países (1). Ocurre principalmente en la década 6 – 8 de la vida y los factores de riesgo son el cigarrillo, exposición ocupacional (anilina, bencidina, naftilamina), 20 – 30 años después de la exposición. Muchas de las alteraciones citogenéticas que ocurren en cáncer de vejiga, son conocidas, pero la significación de la mayoría de ellas son escasamente conocidas (2). Se identificaron anomalías en los cromosomas 1,3,5,7,9,11 y 17. Deleción alélica del cromosoma 9q son independientes del estado y grado, esto sugiere que la pérdida de un gen supresor de tumor sobre cromosoma 9q puede ser un importante evento primario en la génesis del cáncer de vejiga. Deleción en los cromosomas 11p y 17p, observado solo en tumores de alto grado, puede ser importante para la progresión del cáncer de vejiga (3).

El carcinoma de **próstata** es la causa más común de cáncer en el varón. En los países industrializados supone el 20 – 25 % de todos los tumores malignos nuevos diagnosticados por año y representa la tercera causa de muerte por cáncer en el varón. La incidencia del cáncer de próstata se va elevando progresivamente, siendo actualmente del 90/100.000 en los varones. Las alteraciones citogenéticas más reportadas son las que involucran a los: cromosomas 7,8,10 y 18; numérica y deleción; cromosoma 16: translocación y deleción; cromosoma 17: deleción; cromosoma X e Y: numérica. Cromosoma 7: los primeros informes sobre las anomalías de este cromosoma conciernen sobre deleción del brazo largo en casos de cáncer de próstata primario. Otros estudios más tarde indicaron una ganancia de cromosoma 7 en varios casos de cáncer de próstata. Esta ganancia estuvo asociada con tumor de alto grado, estado patológico avanzado y muerte por cáncer de próstata temprano. La trisomía del cromosoma 7 fue asociada con cáncer de próstata local y progresión metastásica. Cromosoma 8: deleción de la secuencia de este cromosoma son algunos de los cambios más informados asociados con cánceres de próstata esporádicos. Cromosoma 10: la alteración inicial de este cromosoma en cáncer de próstata fue la deleción, del (10)(q24) (4).

Se han identificado alteraciones genéticas específicas en distintos tipos de cáncer de **riñón** tal como papilar, no papilar y carcinoma de células renales cromóforas. El tipo común, carcinoma renal de células claras acontece alrededor del 80 % de todos los cánceres de riñón. La especificidad de la del(3) (p13) en este tipo de cáncer está bien documentada en la literatura (5,6). La pérdida del cromosoma 14 q está asociado con el comportamiento agresivo de la neoplasia colorectal, neuroblastoma y carcinoma de células renales, indicando que un gen tumor supresor reside en el brazo largo del cromosoma 14 y que la inactivación puede ser un evento crítico en la progresión de estos tumores (7 - 10).

En este estudio se analizaron las alteraciones cromosómicas presentes en los tumores de vejiga, riñón y próstata mediante el análisis citogenético y se correlacionaron los hallazgos genéticos con la histología.

En particular, se evaluó la relación entre las alteraciones cromosómicas, el grado y estadio de los tumores en pacientes de la ciudad de Córdoba, Argentina.

Materiales y Métodos

Muestras

Se estudiaron 80 tumores sólidos procedentes de cirugía: vejiga (n= 28) obtenido por resección endoscópica transuretral, próstata (n=24) y riñón (n= 28) recolectados en el acto operatorio en fresco. Las muestras fueron recibidas en Anatomía Patológica para su estudio histopatológico y una porción del tumor fue utilizado para realizar cultivo de tejidos y posterior estudio citogenético.

Estudio citogenético

El cultivo celular fue preparado y los cromosomas analizados de acuerdo a la técnica descrita por Kovacs y col (11). El tumor fue trozado con un bisturí y lavado en medio RPMI 1640. Los fragmentos de tejido fueron luego incubados en Colagenasa al 0,1 % y disueltos en medio de cultivo por 30 a 60 minutos a 37° C. Los fragmentos de tejido fueron luego lavados dos veces en medio de cultivo, resuspendiendo y dispersando vigorosamente con una pipeta Pasteur. Los grandes grupos de células que se despegaron del tejido se cultivaron en frascos Falcon de 25 cm² que contenían 5 ml de medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal cálcico al 10 %, en una estufa con CO₂. Los análisis citogenéticos se llevaron a cabo después de 3 – 7 días de cultivo primario, dependiendo de la proliferación de las células. Los cromosomas fueron analizados con la técnica de bandedo y se estudiaron las metafases bandedas de cada tumor.

Análisis histopatológico

Los tumores sólidos procedentes de cirugía se analizaron mediante microscopía óptica con tinciones de hematoxilina-eosina. El grado citológico de los tumores varió entre G1 y G3 sobre los tres grados de la escala. Para el tumor de próstata se utilizó el grado Gleason que va de 2 a 10. Se estableció el sistema de estado TNM de la American Joint Committee on Cancer para cada tumor.

Análisis estadísticos

Para calcular la correlación entre el grado y estado del tumor con las alteraciones cromosómicas se utilizó la prueba de Kruskal Wallis (12). Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo.

Resultados

En los tumores de **vejiga** la del (9)(p21) fue detectada en 17 de 28 casos, el 60,7 % de los tumores. La del(11)(p13) ocurrió en 6 (21,4%) de 28 tumores. La t (1;14)(q22;q32) (Fig.1) fue observada en 5 casos, el 17,8 % de los tumores. Las alteraciones cromosómicas con el grado histológico mostraron diferencias significativas: $H= 17,60$; $p=< 0.001$. Lo mismo ocurrió con el estadio de los tumores y las alteraciones cromosómicas, mostraron diferencias significativas: $H=17,25$; $p=<0.001$ (Fig.2).

En los tumores **renales** la del (3)(p13) fue detectado en 18 (64 %) de 28 tumores. La del(14)(q24) fue detectada en 10 de 28 tumores (35,7 %). . Las alteraciones cromosómicas con el grado histológico mostraron diferencias significativas: $H=9,71$; $p<0.001$. Lo mismo ocurrió con el estadio de los tumores y las alteraciones cromosómicas, mostraron diferencias significativas: $H=5,30$; $p=0.014$ (Fig.3).

En los tumores de **próstata**, a pesar de su bajo índice mitótico, lo cual hace muy difícil su estimulación hasta la metafase, en este estudio se obtuvieron buenas metafases. La presencia de alteraciones cromosómicas halladas en diferentes cromosomas se asocia con un mal pronóstico, entre ellas se destacan, la trisomía del cromosoma 7 que está significativamente asociada a un grupo de pacientes de peor evolución, en tumores con grado Gleason más elevado (13). En este estudio la citogenética en tumores con grado Gleason 7, 8 y 9 mostró aneuploidía del cromosoma 7 en 16 tumores (66,6 %). Entre otras alteraciones cromosómicas halladas y asociadas a un mal pronóstico se encuentran las deleciones que afectan a la región (q24) del cromosoma 16 , que parecen ser una alteración frecuente en el cáncer de próstata y que se asocia a una expresión disminuida y función alterada en la E-caherinas, lo cual contribuiría al potencial metastásico del tumor(14). Estas se hallaron en 8 tumores (33,3 %) con grado Gleason 9. Cuando comparamos las alteraciones cromosómicas con los grados histológicos mas altos observamos diferencias significativas: $H=7,77$; $p<0.001$ y el estadio con las alteraciones cromosómicas halladas también mostraron diferencias significativas: $H=6,53$; $p<0.001$ (Fig.4).

Discusión

En los tumores de **vejiga** la del (9) (q34) es el cambio genético mas frecuente hallado en este estudio (60,7%). Distintos estudios independientes han reportado frecuencias de deleción que van desde el 50 al 70 % en una serie de tumores (15). Lo importante de ello es que estas deleciones estuvieron presentes a similar frecuencia en tumores de vejiga de todos los grados y estados(16). Este hallazgo de la deleción del cromosoma 9 como el único cambio genético en muchos tumores de bajo grado y estadio temprano sugiere que el mismo puede representar un iniciador de eventos genéticos. Hay evidencias de que está implicado el CDKN2 (MTS1 y p16) localizado en el cromosoma 9 como frecuentemente aberrante en la vejiga y otros tumores sólidos (17,18)

Seis pacientes (21,4%) con carcinoma papilar de alto grado presentaron el cariotipo con del(11)(p13) sugiriendo que pérdida de material genético del brazo corto del cromosoma 11 sería un evento secundario en la evolución del carcinoma de células transicionales, probablemente relativo al comportamiento invasivo del tumor (2,3). Otra alteración observada fue la t(1;14)(q22;q32) en el 17,8 % de los tumores. Estos cinco pacientes presentaron hiperplasia de vejiga y el cariotipo mostró t(1;14)(q22;q32), que en el tiempo se transformaron en carcinoma transicional, es decir la citogenética anticipó la evolución neoplásica. El hallazgo requiere de futuras investigaciones.

En virtud de que los tumores **renales** muestran heterogeneidad dentro del tumor, sumado a estudios de citometría con resultados conflictivos (19), nos llevó a realizar este tipo de estudio a los efectos de confirmar lo que otros autores (20) hallaron sobre la pérdida del cromosoma 3p y 14q en el carcinoma de células renales (RCC). Nosotros encontramos que el 64 % de RCC tuvieron la pérdida del cromosoma 3p y que esta en

concordancia con otros reportes genéticos (7,21,22). Esta delección posiblemente juega un importante rol en el desarrollo temprano del RCC y puede eventualmente servir como un marcador genético para el diagnóstico temprano de este daño.

Kovacs y col (7) sugirieron que RCC adquiere cambios cromosómicos adicionales durante la progresión y una de la aberración mas frecuente es la pérdida del cromosoma 14q. La pérdida de una copia del cromosoma 14 en RCC puede corresponder a la pérdida de cierto mecanismo de control y en este aspecto puede resultar en células de alta malignidad. Nosotros confirmamos la pérdida del cromosoma 3p y 14q mediante la utilización de la técnica citogenética.

En cuanto a los tumores de **próstata** en este estudio la citología con grado Gleason 7, 8 y 9 mostró aneuploidía del cromosoma 7, es decir el 66,6 % de los tumores. Este porcentaje es alto como lo registrado en estudios previos (24, 25). A la hora de establecer qué alteraciones cromosómicas son las que contribuyen a este patrón aneuploide, observamos que la alteración numérica del cromosoma 7 es prácticamente constante y que se encuentran desde la lesión de Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN) hasta las metástasis linfáticas de cáncer de próstata (26). Sin duda regiones de este cromosoma alberga genes implicados en el inicio y progresión del cáncer de próstata. Además, otra alteración cromosómica hallada en este estudio y asociada a un mal pronóstico se encuentra la delección que afecta a la región (q24) del cromosoma 16, esta parece ser una alteración frecuente en el cáncer de próstata, que se asocia a una expresión disminuida y función alterada en la E-caherinas, lo cual contribuiría al potencial metastásico del tumor (27).

Conclusiones

En los tumores de **vejiga**, el hallazgo mas interesante fue la t(1;14)(q22;q32) en vejigas hiperplásicas, que en el tiempo se transformaron en carcinoma transicional. La citogenética anticipó la evolución neoplásica, aspecto este que requiere de futuras investigaciones para determinar si se repiten estas alteraciones neoplásicas en vejigas hiperplásicas. Además, observamos la del (9)(q34) y la del (11)(p13), anomalías estas que sugieren en el primer caso que pueden representar un iniciador temprano de eventos genéticos y en el segundo caso sugiere un comportamiento invasivo del tumor.

Nuestros resultados, en tumores **renales**, sugieren que el gen supresor de tumor en el cromosoma 3p, puede estar involucrado en un temprano estado de la carcinogenesis, en el carcinoma de células claras y la pérdida de una región del cromosoma 14q puede ser un factor pronóstico en carcinoma de células renales. Este estudio sugiere que el marcador genético del sitio cromosómico 14q, puede predecir la evolución clínica del carcinoma renal de células claras.

En cuanto a los tumores de **próstata** el hallazgo más importante aparte de la tri 7, fue la del (16)(q24). Esto sugiere que el marcador genético de este sitio cromosómico puede predecir el potencial metastásico del tumor.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Universidad Católica de Córdoba en el Programa N° 333, "Aberraciones cromosómicas en tumores sólidos de Córdoba, Argentina"

References

1. Sauter, G. Chromosomal imbalances are associated with a high risk of progression in early invasive (pT1) urinary bladder cancer. *Cancer Research*. 1999; 59:5687 – 5691.
2. Richter, J., Wagner, U., Schraml, P., Maurer, R., Alund, G., Knonagel, M., Moch, H., Mihatsch, M., Passer, T and Sauter, G. Chromosomal imbalances are associated with a high risk of progression in early invasive (pT1) urinary bladder cancer. *Cancer Research*. 1999; 59: 5687 – 5691.
3. Lerner, S., Tsai, Y. and Jones, P. Genetic aspects of bladder cancer progression. *World Journal of Urology*. 1991; Vol.9 (2): 69 – 74.
4. Luo, J. and Yu, Y. Hypothetical model for prostate cancer development. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 2003; vol.5: 216-225.
5. Anglard P, Tory K, Brauch H, Weiss G, Latif F, et al. Molecular analysis of genetic changes in the origin and development of renal cell carcinoma. *Cancer Res*, 1991; 51:1071 – 1077.
6. Presti J, Rao P, Chen Q, Reuter V, Li F, et al. Histopathological, cytogenetic and molecular characterization of renal cortical tumor. *Cancer Res*; 1991; 51:1544 – 1552.
7. Kovacs G, Frisch S. Clonal chromosome abnormalities in tumor cells from patients with sporadic renal cell carcinomas. *Cancer Res*. 1989; 19: 651- 659.
8. Presti J Jr, Rao P, Chen Q, reuter V, Li P, Fuir W. et.al. Histopathological cytogenetic and molecular characterization of renal cortical tumors. *Cancer Res*. 1991; 51: 1544- 1552.
9. Young J, Leggett B, Ward M, Thomas I, Buttenslunrw R, Searle J. et.al Frequent loss of heterozygosity on chromosome 14 occurs in advanced colorectal carcinomas. *Oncogene*. 1993; 8:671 – 675.
10. Takayama I, Suzuki I, Mugishima H, Fujisawa T, Ookuni M, Schwab M et.al Deletion mapping of chromosomes 14q and 1 p in human neuroblastoma. *J.Urol* 1992; 101:1185 – 1189.
11. Kovacs G, Szücs S, DeRiese W and Baumgärtel H. Specific chromosome aberration in human renal cell carcinoma. *Int J Cancer*. 1987; 40: 171 – 178.
12. William H. Kruskal and W. Allen Wallis. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*. 1952; 47 (260): 583–621.
13. Bandyk, M., Zhao, L., Troncoso, P., Pisters, L. Trisomy 7: a potential cytogenetic marker of human prostate cancer progression. *Genes Chromosomes Cancer*. 1994; 9:19 – 27.

14. Macoska, J., Micale, M., Sakr, W., Benson, P., Wolman, S. Extensive genetic alterations in prostate cancer revealed by dual PCR and FISH analysis. *Genes Chromosomes and Cancer*. 1993; 8:88 – 97.
15. Sandberg, A. Cytogenetics and molecular genetics of bladder cancer: a personal view. *Am J. Med. Genet*. 2002; 115: 173-182.
16. Tsai, Y., Nichols, P., Hiti, A., Williams, Z., Skinner, D., Jones, P. Allelic losses of chromosomes 9, 11 and 17 in human bladder cancer. *Cancer Res*. 1990; 50:44-47.
17. Cairns P, Shaw M and Knowles M. Initiation of bladder cancer may involve deletion of a tumor-suppressor gene on chromosome 9. *Oncogene*. 1993; 8:1083 – 1085.
18. Kamb a, Liu Q Harshman K Tavtigian S, Cordon-Cordo c, and Skoinick M. Rates of p16 (MTS1) mutation in primary tumors with 9p loss. *Science (Washington DC)*. 1994; 264: 416 – 417.
19. Bernstam V, Kidney and urinary bladder. In : *Handbook of Gene Level Diagnostics In Clinical Practice*. Boca Raton: CRC Press. 1992 ; vol.1, p.313 .
20. Granatn P, Portenoso P, MinelliE, Right R Meroni E, Bono A. y col Clonal chromosome changes in renal carcinoma do not correlate with clinical stages and histopathologic grades. *Cancer Genet Cytogenet*. 1992; 64:30-34.
- 21 van den Berg E, van der Hout A, OasterhuisJ, Storkel S, Dijkhuizen T, Dam A, y col Cytogenetic analysis of epithelial renal cell tumors: Relationship with a new histopathologic classification. *Int. J Cancer*. 1993; 55(2):223 – 227.
22. Hughson M, Johnson L, Silva F Kovacs G, Nonpapillary and papillary renal cell carcinoma: A cytogenetic and phenotypic study. *Mod Pathol*. 1993; 6(4):449 – 56.
23. Solé-Balcells, F., Chéchile, G., Algaba, F., Villavicencio, H., Cerdón-Cardo, C. *Biología molecular de los tumores urológicos*. ENE ediciones. Madrid. 1995; vol.1, p.55.
24. Brown J, Alcaraz A, Takahashi S, Persons D, Lieber M, Jenkins R. Chromosomal aneusomies detected by fluorescent in situ hybridization analysis in clinically localized prostate carcinomas. *J Urol* 1994; 152:1157
25. Barranco M, Alcaraz A, Corral J, Solé M, Mallofré C, Llopis J, et al. Numeric Alterations in Chromosomes 7 and 8 Detected by Fluorescent in situ Hybridization Correlate with High Grade Localized Prostate Cancer. *Eur Urol*. 1998; 34:419 – 425.
26. Nupponen, N. and Vissakorpi, T. Molecular cytogenetics of prostate cancer. *Microscopy Research and Technique*. 2000; vol 51, 5:456-463.

27. Pan, Y., Matsuyama, H., Wang, N., Yoshihiro, S., Häggath, L., Li, C., et al. Chromosome 16q245 deletion and decreased E-cadherine expression: possible association with metastatic potential in prostate cancer. *The prostate*. 1998; 36:31-38.

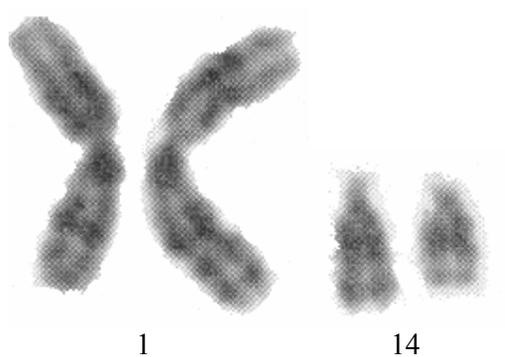


Fig.1, t(1;14)(q22 ;q32)

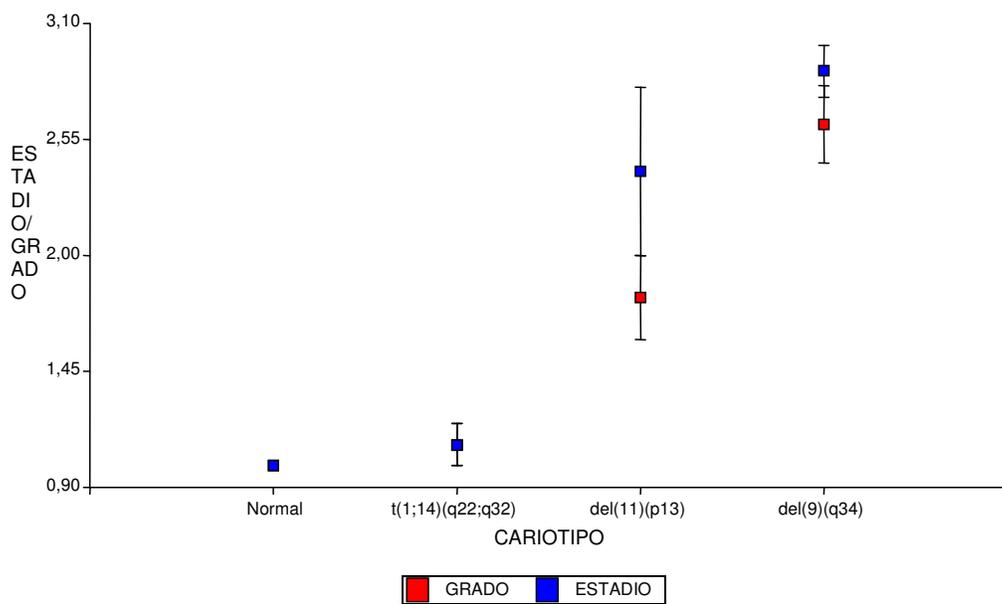


Fig.2. Vejiga, diferencias significativas entre anomalías cromosómicas y estadio/grado

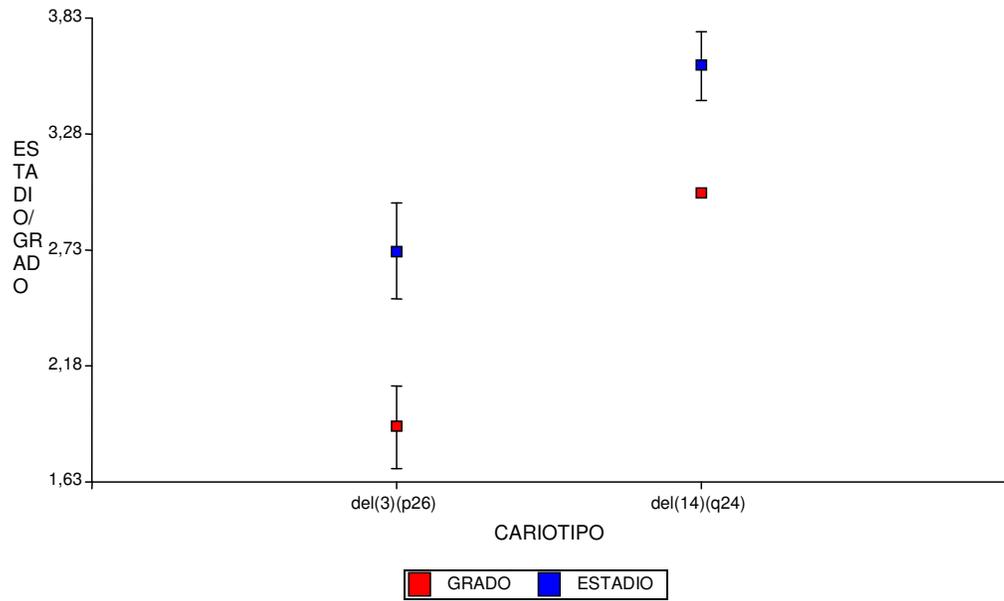


Fig.3. Riñón. Diferencias significativas entre anomalías cromosómicas y estadio/grado

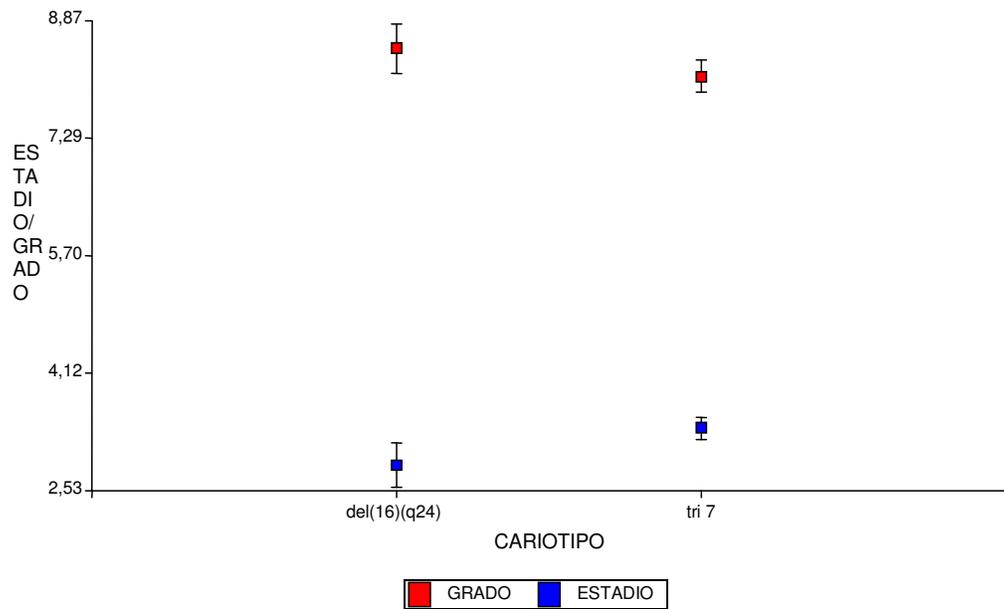


Fig.4. Próstata. Diferencias significativas entre anomalías cromosómicas y estadio/grado