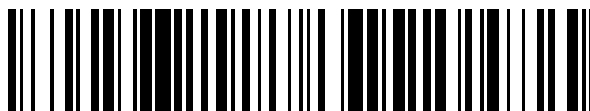


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 407 630**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2008** **E 08870148 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2013** **EP 2235215**

54 Título: **Detección no invasiva del cáncer de vejiga mediante hibridación fluorescente in situ de Aurora A**

30 Prioridad:

**03.01.2008 US 18730 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.06.2013**

73 Titular/es:

**BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF  
TEXAS SYSTEM (100.0%)  
201 WEST 7TH STREET  
AUSTIN, TX 78701, US**

72 Inventor/es:

**GROSSMAN, H. BARTON;  
CZERNIAK, BOGDAN y  
SUBRATA, SEN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 407 630 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Detección no invasiva del cáncer de vejiga mediante hibridación fluorescente in situ de Aurora A

## Antecedentes de la invención

5 Esta invención se hizo con el respaldo del gobierno de los Estados Unidos bajo la subvención número U01 CA 85078 concedida por el National Cancer Institute. El gobierno de los Estados Unidos tiene determinados derechos en la invención.

La presente invención se refiere, en líneas generales, al campo de la detección del cáncer. Más concretamente, se refiere a la detección del cáncer de vejiga.

## 10 Resumen de la invención

La presente invención, según se define en la reivindicación 1, se refiere a un método para la detección de cáncer de vejiga en un paciente que consiste en aislar células de la vejiga de la orina del paciente, hibridar las células de la vejiga con una sonda de ADN marcada, en donde la sonda reconoce al menos una porción del gen de la quinasa Aurora A, para obtener una muestra de células de la vejiga hibridadas con la sonda de ADN marcada; y contar el número de células de la vejiga presentes en la muestra, el número de copias del gen de la quinasa Aurora A en cada célula de la vejiga de la muestra y el número de células de la vejiga presentes en la muestra que tienen al menos un primer número umbral de copias del gen de la quinasa Aurora A, consistiendo, además, en que si los números superiores o iguales a un primer porcentaje umbral de las células de la vejiga tienen el primer número umbral de copias del gen de la quinasa Aurora A, suponer que el paciente tiene cáncer de vejiga, en donde el primer número umbral de copias del gen de la quinasa Aurora A es tres y el primer porcentaje umbral es de un 15%.

## Breve descripción de los dibujos

25 Los dibujos siguientes forman parte de la presente especificación y se incluyen para demostrar aún más algunos aspectos de la presente invención. La invención puede comprenderse mejor haciendo referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas aquí presentadas.

Figura 1. Expresión de la quinasa Aurora A en carcinomas de células transicionales (TCC) y su relación con la ploidía del ADN. A, Niveles de quinasa Aurora A en muestras pareadas de urotelio y TCC adyacentes revelados por una RT-PCR cuantitativa. B y C. Histogramas de ADN generados mediante análisis de imágenes de núcleos tumorales en los que puede verse un contenido de ADN casi diploide (2c) y una aneuploidía pronunciada (6c), respectivamente. D, Niveles medios de expresión de la quinasa Aurora A en TCCs de grado bajo (grado 1-2), superficial (Ta-T1a) y grado alto (grado 3), invasivo (T1b y superior) además de TCCs casi diploides y aneuploides.

Figura 2. Expresión de la quinasa Aurora A y número de copias cromosómicas en líneas cancerosas de la vejiga. A, Expresión de la quinasa Aurora A en líneas celulares cancerosas de la vejiga mediante una RT-PCR cuantitativa en comparación con células uroteliales cultivadas (NU204). B, Número de copias cromosómicas revelado por una FISH cuantitativa utilizando sondas centroméricas a los cromosomas 3, 7 y 17. C, Valores medios de expresión de la quinasa Aurora A en tres grupos de líneas celulares cancerosas de la vejiga. D, Número medio de copias cromosómicas en líneas celulares cancerosas revelado por una FISH con sondas centroméricas a los cromosomas 3, 7 y 17 en 3 grupos de líneas celulares cancerosas de la vejiga mostradas en C.

Figura 3. Expresión ectópica de la proteína de fusión quinasa Aurora A-GFP en células uroteliales SV40 transfectadas con un vector adenoviral que contiene un inserto de quinasa Aurora A de tipo salvaje utilizando un anticuerpo anti-GFP. A, Análisis Western blot en el que se muestra la expresión de la proteína de fusión quinasa Aurora A-GFP (*panel superior*). Análisis de inmunofluorescencia que muestra la expresión ectópica de la proteína de fusión quinasa Aurora A-GFP con DAPI como contracolorante nuclear (*panel inferior*). Imágenes de inmunofluorescencia de células infectadas con un vector adenoviral sin un inserto de quinasa Aurora A (*a, b*). Imagen obtenida con un filtro rojo que revela dos centrosomas (*a*). Imagen obtenida con un filtro verde que revela una expresión no ectópica de una proteína de fusión quinasa Aurora A-GFP (*b*). Imágenes de inmunofluorescencia de células infectadas con un vector adenoviral que contiene un inserto de quinasa Aurora A (*c, d*). Imagen obtenida con un filtro rojo que muestra una multiplicación de centrosomas revelada por un anticuerpo anti-tubulina-y (rojo) (*c*). Imagen obtenida con un filtro verde que muestra la expresión de una proteína de fusión quinasa Aurora A-GFP expresada ectópicamente en centrosomas (*d*). B, Evaluación cuantitativa del número de copias de centrosomas y cromosómicas inducida por una quinasa Aurora A expresada ectópicamente. C, Análisis FACS por fluorescencia doble de una proteína de quinasa Aurora A-GFP expresada ectópicamente (fluorescencia verde) en relación con el contenido de ADN revelado con un contracolorante de PI (fluorescencia roja). Diagrama de dispersión de fluorescencia doble tras la infección con un vector adenoviral que contiene un inserto de quinasa Aurora A de tipo salvaje (*panel derecho*). Diagrama de dispersión de control de células infectadas con un vector adenoviral vacío (*panel derecho*). Nótese el aumento de células aneuploides en las zonas trazadas del diagrama de dispersión designadas como A y B (*panel derecho*) en comparación con el control (*panel izquierdo*). D, Evaluación cuantitativa de las células aneuploides revelada por el análisis FACS por fluorescencia doble mostrada C y formación de

colonias en agar blando. Control/Ad: células infectadas con un vector adenoviral sin un inserto de quinasa Aurora A, GFP Ad/quinasa Aurora A: células transfectadas con un vector adenoviral que contiene una quinasa Aurora A de tipo salvaje, MOI: multiplicidad de infección.

Figura 4. Detección de células cancerosas en orina evacuada con una sonda de FISH de la quinasa Aurora A. A, una FISH por fluorescencia doble en la que se demuestra un número de copias del gen de la quinasa Aurora A (rojo) y un brazo corto de una sonda específica al cromosoma (verde). Número diploide de copias de quinasa Aurora A en células uroteliales normales (a). Bajo nivel de amplificación del gen de la quinasa Aurora A (3 copias) en un TCC de grado bajo (grado 1-2) (b). Alto nivel de amplificación del gen de la quinasa Aurora A (>4 copias) en un TCC invasivo de grado alto (grado 3) (c). Polisomía del cromosoma 20 en un TCC invasivo de grado alto (grado 3) que contiene múltiples copias de quinasa Aurora A y sondas del cromosoma 20p (d). B, Análisis FISH cuantitativo del número de copias del gen de la quinasa Aurora A en especímenes de orina evacuada de 23 pacientes con TCC de la vejiga (set de formación). Se muestran los porcentajes de células que muestran unos niveles de amplificación bajos (3-4 copias) y altos (> 4 copias) de quinasa Aurora A en los pacientes individuales. C, curva ROC para una prueba de FISH de la quinasa Aurora A en un set de formación que consiste en 23 muestras de orina de pacientes con cáncer de vejiga y siete muestras de orina de controles de pacientes sanos no afectados (n=30). D, curva ROC para una prueba de FISH de la quinasa Aurora A en un grupo de análisis que consiste en 51 muestras de orina de pacientes con cáncer de vejiga y 30 muestras de orina de controles sanos no afectados (n=81). E, puntuación de la quinasa Aurora A por grado histológico.

Figura 5. Análisis de FISH cuantitativa del número de copias del gen de la quinasa Aurora A en muestras de orina evacuada de 74 pacientes con TCC de la vejiga y 37 controles de pacientes sanos (sets de formación y de prueba combinados). Se muestran los porcentajes de células que muestran unos niveles de amplificación bajos (3-4 copias) y altos (> 4 copias) de quinasa Aurora A en pacientes individuales.

Figura 6. Un mapa de la sonda de AURKA 20q13.

#### Descripción detallada de la invención

Las células malignas que manifiestan una inestabilidad cromosómica en forma de aneuploidía, a menudo presentan centrosomas supernumerarios y husos mitóticos multipolares que sugieren que las anomalías en los orgánulos que controlan la segregación de cromosomas durante la mitosis desempeñan una función en el desarrollo de la aneuploidía.<sup>1-3</sup>

La quinasa Aurora A, también conocida como STK15 o BAK, es un miembro de la familia de las serina-treonina quinasas que incluye aurora quinasa de la *Drosophila* y quinasa IPL1 de *Saccharomyces cerevisiae*.<sup>4-6</sup> Estas quinasas han sido identificadas como reguladores críticos de la segregación cromosómica normal y de las funciones de los centrosomas incluida la regulación de la separación y maduración de los centrosomas en células humanas.<sup>7</sup> Además, la sobreexpresión del gen de la quinasa Aurora A, localizado en el cromosoma 20q13, ha demostrado estar asociada a la aneuploidía y a la inestabilidad cromosómica que promueve la transformación y progresión tumorigénica en células de mamíferos y en varios tumores humanos incluido el carcinoma urotelial.<sup>4,8</sup>

Resulta interesante que a las células primarias uroteliales humanas a las que se les induce a sufrir una transformación manifiestan una amplificación del cromosoma 20q13.2 que sugiere que la sobreexpresión del gen o de los genes de este cromosoma pueden desempeñar una función significativa en el desarrollo del cáncer de vejiga.<sup>9</sup> Estas observaciones junto con los hechos de que la quinasa Aurora A que codifica el gen del cromosoma 20q13 también ha sido identificada como un locus de susceptibilidad a los tumores en ratones y humanos<sup>10</sup> y de que la quinasa Aurora A induce una inactivación funcional del gen supresor de tumores p53<sup>5</sup> implican que una mayor expresión de la quinasa Aurora A puede ser un determinante genético crítico de la inestabilidad y transformación cromosómicas en las células uroteliales humanas.

En una realización, la presente invención se refiere a un método para la detección de cáncer de vejiga en un paciente que consiste en aislar células de la vejiga de la orina del paciente, hibridar las células de la vejiga con una sonda de ADN marcada, en donde la sonda reconoce al menos una porción del gen de la quinasa Aurora A, para obtener una muestra de células de la vejiga hibridadas con la sonda de ADN marcada, y contar el número de células de la vejiga presentes en la muestra, el número de copias del gen de la quinasa Aurora A en cada célula de la vejiga de la muestra y el número de células de la vejiga presentes en la muestra que tienen al menos un primer número umbral de copias del gen de la quinasa Aurora A.

El aislamiento de las células de la vejiga (más comúnmente, células uroteliales) de la orina de un paciente puede realizarse mediante cualquier técnica conocida en la materia. En una realización, el aislamiento de las células de la vejiga puede realizarse recogiendo especímenes de orina evacuada (100-200 ml aproximadamente) del paciente, centrifugándolas a una velocidad de rotación y durante un tiempo suficiente para que las células de la vejiga se precipiten de la orina, retirando el sobrenadante, y resuspendiendo las células de la vejiga precipitadas en una solución apropiada para su almacenamiento o utilización. En una realización, la duración y la velocidad de rotación de la centrifugación es de 15 minutos aproximadamente a unas 1000 rpm. En una realización, las células de la vejiga precipitadas se resuspenden en 2 ml de DMEM (Medio esencial mínimo de Eagle modificado por

Dulbecco/Vogt) con un 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) y se guardan a -70 °C hasta que llegue el momento de descongelar las células de la vejiga resuspendidas antes de su uso en pasos posteriores del método.

Tras la descongelación y antes de la hibridación, las células de la vejiga pueden lavarse una o más veces, por ejemplo, tres veces, en PBS (tampón fosfato salino) o cualquier otro tampón adecuado para lavar células de la vejiga, seguido de una centrifugación para precipitar las células de la vejiga lavadas. Las células de la vejiga lavadas precipitadas se pueden fijar en metanol/ácido acético (3:1), pretratar en 2X SSC/NP-40 al 0,5%, pH 7 a 37 °C durante 30 minutos, seguido de una deshidratación en etanol a 90 °C durante 5 minutos. Quedará claro para aquellos versados en la materia, que en las experimentaciones rutinarias pueden seguirse otras técnicas de procesamiento adecuadas para la preparación de células de la vejiga para su hibridación con una sonda de ADN marcada.

La hibridación de las células de la vejiga con una sonda de ADN marcada puede realizarse mediante cualquier técnica conocida en la material. La sonda de ADN marcada puede comprender cualquier secuencia de ADN y cualquier grupo detectable, siempre y cuando la sonda reconozca al menos una porción del gen de la quinasa Aurora A. En una realización, el grupo detectable comprende un fluoróforo. En una realización, el grupo detectable comprende un radioisótopo.

Se muestra una secuencia de ADNc de quinasa Aurora A de *H. sapiens* como SEQ ID NO: 1 (nº de acceso del GenBank BC001280) y una secuencia genómica de quinasa Aurora A de *H. sapiens* como SEQ ID NO: 2. Aunque por lo demás son idénticas, las dos secuencias difieren en la posición 301 y el ADNc contiene una cola de adenosinas de 16mer que no tiene la secuencia genómica.

Por "la sonda reconoce al menos una porción del gen de la quinasa Aurora A" se entiende que la sonda comprende una molécula de ADN que tiene una secuencia que es fundamentalmente totalmente complementaria (a saber, al menos un 90% complementaria aproximadamente, como por ejemplo al menos un 95% complementaria aproximadamente, al menos un 96% complementaria aproximadamente, al menos un 97% complementaria aproximadamente, al menos un 98% complementaria aproximadamente, al menos un 99% complementaria aproximadamente, al menos un 99,5% complementaria aproximadamente o al menos un 99,9% complementaria aproximadamente) a la secuencia de al menos una cadena de ADN de la porción del gen de la quinasa Aurora A y, además, que la molécula de ADN de la sonda es lo suficientemente larga y tiene una secuencia tal que fundamentalmente sólo se hibridará al gen de la quinasa Aurora A y fundamentalmente no se hibridará a ningún otro gen o elemento genómico no expresado de la célula de la vejiga. Además, preferentemente, la molécula de ADN de la sonda no debe ser tan larga que necesite mucho tiempo para hibridarse al gen de la quinasa Aurora A. En una realización, la sonda de ADN marcada comprende AURKA 20ql3 (MP Biomedicals/Qbiogene, Ulkirch, Francia). La sonda de ADN específica a la AURKA 20ql3 se ha optimizado para detectar números de copias del gen de la quinasa Aurora A en el cromosoma 20 de la región 20ql3 en extensiones de metafases/interfases, frotis de sangre y secciones de tejidos incluidas en parafina.

Puede utilizarse cualquier fluoróforo que pueda unirse a la molécula de ADN de la sonda. En una realización, el fluoróforo se selecciona del grupo que consiste en rodamina y fluoresceína. En una realización, la sonda de AURKA 20ql3 se marca directamente con Rodamina (roja) y la sonda  $\alpha$ -satélite del cromosoma 20 se marca directamente con Fluoresceína (verde). Esta sonda de FISH de la quinasa Aurora A de dos colores puede utilizarse para detectar el número de copias del gen de la quinasa Aurora A en células exfoliadas de sedimentos de orina evacuada.

En una realización, la técnica de hibridación puede consistir en la incubación de células de la vejiga deshidratadas con 10  $\mu$ l de una sonda de AURKA 20ql3 a 37 °C durante 16 horas aproximadamente (por ej., toda la noche). Para retirar la sonda no hibridada, las células se pueden lavar, en 0,5X SSC/SDS al 0,1% durante cinco minutos a 65 °C. Las células se pueden contracolorar con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) y montar en una solución antifade antes del recuento.

En otra realización, puede hibridarse una segunda sonda de ADN marcada que no sea específica al gen de la quinasa Aurora A a las células de la vejiga para poder contar otras regiones de ADN que pudieran ser interesantes para aquellos versados en la materia.

Con el paso de la hibridación se obtiene una muestra de células de la vejiga hibridadas con la sonda de ADN marcada.

El recuento del número de células de la vejiga presentes en la muestra, del número de copias del gen de la quinasa Aurora A en cada célula de la vejiga de la muestra y del número de células de la vejiga de la muestra que tiene al menos un primer número umbral de copias del gen de la quinasa Aurora A puede llevarse a cabo a través de cualquier técnica apropiada conocida por aquellos versados en citometrías de flujo, microscopías de fluorescencia o detecciones radioisotópicas. El uso de citómetros de flujo o de clasificadores de células activados por fluorescencia es bien conocido en la materia. Cuando el grupo detectable es un fluoróforo, las señales de fluorescencia pueden contarse y capturarse con cualquier microscopio adecuado tal como un Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena, Alemania).

Con el recuento se obtiene el número de células de la vejiga presentes en la muestra, el número de copias del gen de la quinasa Aurora A en cada una de las células de la muestra y el número de células de la vejiga de la muestra que tienen al menos un primer número umbral de copias del gen de la quinasa Aurora A. El primer número umbral de copias puede elegirse de modo que sea igual al número mínimo de copias del gen de la quinasa Aurora A que normalmente se encuentra presente en las células cancerosas de la vejiga. En una realización, el primer número umbral de copias del gen de la quinasa Aurora A es tres.

En otra realización, el recuento también consiste en contar el número de células de la vejiga que tiene al menos un segundo número umbral de copias del gen de la quinasa Aurora A, en donde el segundo número umbral de copias es mayor que el primer número umbral de copias. El segundo número umbral de copias puede elegirse de modo que sea igual al número mínimo de copias del gen de la quinasa Aurora A que normalmente se encuentra presente en las células del cáncer de vejiga agresivo. En una realización, el segundo número umbral de copias del gen de la quinasa Aurora A es cinco.

Mediante el recuento del número de células de la vejiga presentes en la muestra y del número de células de la vejiga en la muestra que tengan al menos un primer número umbral de copias del gen de la quinasa Aurora A, el último número puede dividirse entre el número de células de la vejiga para calcular el porcentaje de células de la vejiga que tienen al menos un primer número umbral de copias del gen de la quinasa Aurora A.

El método de la presente invención consiste además en que si los números mayores que o iguales a un primer porcentaje umbral de las células de la vejiga tienen al menos el primer número umbral de copias del gen de la quinasa Aurora A, seguir el paso de suponer que el paciente tiene cáncer de vejiga. Cualquier valor del porcentaje de las células de la vejiga que tienen al menos un primer número umbral de copias del gen de la quinasa Aurora A puede utilizarse como el primer porcentaje umbral. En la presente invención, el primer porcentaje umbral es de un 15%.

En otra realización, el método consiste, además, en que si los números mayores que o iguales a un segundo porcentaje umbral de las células de la vejiga tienen al menos el primer número umbral de copias del gen de la quinasa Aurora A, en donde el segundo porcentaje umbral es mayor que el primer porcentaje umbral, seguir el paso de suponer que el paciente tiene un cáncer de vejiga agresivo. Cáncer de vejiga "agresivo" se refiere a un tipo de cáncer de vejiga que se caracteriza porque presenta uno o más de entre un tumor invasivo, un tumor no papilar o un tumor con un grado histológico de 3. En una realización, el primer porcentaje umbral es de un 15% y el segundo porcentaje umbral es de un 20%.

Con la realización del método, los médicos pueden cuantificar, mediante una técnica no invasiva, factores útiles para presuponer si el paciente tiene cáncer de vejiga y, de tenerlo, cuán agresivo es. Mediante la cuantificación de los factores, los médicos pueden decidir si deberían llevarse a cabo, o considerar si deberían llevarse a cabo, otros métodos de diagnóstico o terapéuticos, tales como una cistoscopia, ablación quirúrgica, instilación de bacilos de Calmett-Guerin (BCG) en la vejiga, instilación de otras moléculas quimioterapéuticas en la vejiga, tratamiento por radiación o cistectomía. Con la realización del método de manera recurrente en el caso de un paciente que está siendo tratado de cáncer de vejiga, mediante quimioterapia o radiación, por ejemplo, puede supervisarse la eficacia del tratamiento. Con la realización del método de manera recurrente en el caso de un paciente que ya ha sido tratado de cáncer de vejiga, puede supervisarse la extensión de la recurrencia, de existir.

Hemos descubierto que el método tiene tanto una alta especificidad (en el ejemplo de abajo, con  $n = 81$ , la especificidad fue de 1,0, lo que significa que la tasa de falsos positivos fue de un 0%) y una alta sensibilidad (en el ejemplo de abajo, la sensibilidad fue de 0,86, lo que significa que la tasa de falsos negativos fue de un 14%). Según nuestros conocimientos, nadie hasta ahora ha informado de un método de cribado no invasivo del cáncer de vejiga en un tamaño de muestra de 80 individuos por lo menos, con el que se obtenga una especificidad superior a 0,85 y una sensibilidad superior a 0,85, y mucho menos una especificidad de 1,0 y una sensibilidad de 0,86 como mínimo.

Los ejemplos siguientes se incluyen para demostrar las realizaciones preferentes de la invención.

#### **Ejemplo 1** *Resumen*

**Antecedentes:** La aneuploidía resultante de fallos en la segregación cromosómica es un cambio genético somático corriente en las neoplasias y los genes que regulan la segregación de cromosomas pueden ser marcadores potenciales de detección del cáncer. En el cáncer de seres humanos, incluido el cáncer de vejiga, se ha detectado con frecuencia una amplificación/sobreexpresión de la quinasa Aurora A, un regulador fundamental de la mitosis, y el grado de amplificación está relacionado con el grado de aneuploidía.

**Métodos:** Medimos el nivel de expresión de la quinasa Aurora A en las células cancerosas de la vejiga y lo relacionamos con el número de copias de tres cromosomas seleccionados y con el contenido total de ADN nuclear. El efecto de la quinasa Aurora A en la multiplicación del centrosoma y el número de copias de cromosomas se midió *in vitro* utilizando una construcción de expresión adenoviral. Para determinar la aplicabilidad de este gen como

biomarcador para el cáncer de vejiga, también hemos ensayado el número de copias del gen de la quinasa Aurora A mediante una hibridación fluorescente *in situ* (FISH) de las células exfoliadas de la orina evacuada de pacientes con cáncer de vejiga.

**Hallazgos:** La sobreexpresión de la quinasa Aurora A en células uroteliales humanas indujo la amplificación de centrosomas, fallos en la segregación cromosómica y aneuploidía. Además, la sobreexpresión del gen de la quinasa Aurora A ocurrió en las fases tempranas de desarrollo del tumor y pudo detectarse en lesiones *in situ* además de en la orina evacuada de pacientes con cáncer de vejiga. Mediante una prueba de FISH para determinar el número de copias del gen de la quinasa Aurora A realizado en un estudio de validación a ciegas en el que se evaluaron 51 muestras de orina evacuada de pacientes con cáncer de vejiga y 30 controles sanos no afectados se detectó cáncer de vejiga con una especificidad de 1,0 y una sensibilidad de 0,86.

**Interpretación:** Nuestros hallazgos indican que la quinasa Aurora A sobreexpresada puede causar aneuploidía en las células uroteliales y es un biomarcador prometedor para la detección del cáncer de vejiga.

### Introducción

El cáncer de vejiga humano es un sistema ideal para estudiar los mecanismos de inestabilidad cromosómica ya que se desarrolla a partir de condiciones preneoplásicas a través de vías papilares y no papilares, que muestran una fuerte relación entre la agresividad y el grado de aneuploidía.<sup>11</sup> La mayoría de los tumores papilares superficiales de grado bajo originados a partir de una hiperplasia urotelial son casi diploides. Aunque con frecuencia son recurrentes, la probabilidad de que invadan la pared de la vejiga y se metasticen es escasa. Por contra, prácticamente todos los tumores no papilares de grado alto desarrollados por progresión de la displasia grave-carcinoma *in situ* muestran una aneuploidía pronunciada y tienen una alta propensión a invadir la pared de la vejiga y metastizarse.

En el presente estudio, evaluamos la función de la quinasa Aurora A en el desarrollo del cáncer de vejiga a partir de una neoplasia urotelial *in situ*. Investigamos los niveles de amplificación y sobreexpresión de la quinasa Aurora A en muestras de tumores de la vejiga humana y en líneas celulares cancerosas de la vejiga y los correlacionamos con el grado de aneuploidía. Las implicaciones funcionales de la sobreexpresión de la quinasa Aurora A se validaron mediante estudios de transfección *in vitro*. Finalmente, identificamos la quinasa Aurora A como un biomarcador potencial para la detección no invasiva de cáncer de vejiga en la orina.

### Materiales y métodos

**Muestras y líneas celulares de tumores.** Se obtuvieron suspensiones celulares de muestras pareadas de carcinomas de células transicionales (TCC) de la vejiga y del urotelio de 21 especímenes de cistectomía humanos tal y como se ha descrito anteriormente.<sup>12</sup> Brevemente, la superficie de la mucosa adyacente al tumor se raspó y las células se transfirieron a un tubo cónico que contenía una solución de tampón de fosfato (PBS). El tumor se diseccionó de un bloque congelado para minimizar la contaminación con células no tumorales y se transfirió de manera similar a un tubo que contenía una PBS. Las células tumorales se liberaron en una solución PBS agitando mecánicamente los fragmentos del tejido. Sólo aquellas muestras que dieron como resultado más de un 90% de células tumorales reconocibles microscópicamente o que interactuaron con el urotelio se utilizaron para este estudio. Se recogieron especímenes de orina evacuada (100-200 ml aproximadamente) de 74 pacientes con cáncer de vejiga cistoscópicamente evidente antes de la resección transuretral de tumores y se centrifugaron durante 15 minutos a 1000 RPI. Los sedimentos de la orina se resuspendieron en 2 ml de DMEM con un 10% de DMSO y se almacenaron a -70 °C. Los cambios precancerosos intrauroteliales se clasificaron como displasia leve, moderada y grave o carcinoma *in situ*. Los tumores se clasificaron según el sistema de clasificación histológica y el patrón de crecimiento (papilar frente a no papilar) de la Organización Mundial de la Salud de tres niveles. La profundidad de la invasión se registró conforme al sistema de estadificación TNM (tumor-nódulos-metástasis). Los especímenes de orina evacuada de 37 individuos sanos no infectados sin evidencia de cáncer de vejiga sirvieron como controles. Establecimos las líneas celulares cancerosas de la vejiga humana UM-UC-1, UM-UC-2, UM-UC3, UM-UC-6, UM-UC-9, UM-UC-10, UM-UC-12, UM-UC-13, UM-UC-15, UM-UC-16 y UM-UC-17, y el Dr. C. A. Reznikoff obtuvo células uroteliales humanas normales y la línea celular urotelial humana inmortalizada por el SV40line, SVHUC, y se cultivaron según lo descrito anteriormente.<sup>13</sup>

**Ensayos de expresión de la quinasa Aurora A.** Se hizo uso de una RT-PCR cuantitativa para analizar los niveles de expresión de la quinasa Aurora A en muestras pareadas de tumores y líneas celulares uroteliales/de la vejiga adyacentes tal y como se ha descrito anteriormente.<sup>12</sup> Brevemente, para la RT-PCR, se sintetizó un ADNc a partir de 2 µg de ARN total utilizando los reactivos de RT TaqMan según el protocolo del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los cebadores y las sondas fluorescentes para cada gen se diseñaron conforme al servicio de Ensayos por Diseño de Applied Biosystems. Los análisis de RT-PCR se realizaron en un aparato Prism 7700 de PerkinElmer/Applied Biosystems, utilizando un gen constitutivo 18S como patrón de normalización interna. Como patrones se utilizaron suspensiones uroteliales preparadas a partir de uréteres de especímenes de nefrectomías sin neoplasia urotelial a partir de los cuales calculamos las expresiones relativas de la quinasa Aurora A de tumores uroteliales o de la vejiga adyacentes. Se cultivaron células uroteliales humanas NU204 *in vitro* tal y como se ha

descrito anteriormente<sup>14</sup> y se utilizaron como referencia para calcular los niveles de expresión relativos de quinasa Aurora A en líneas celulares cancerosas de la vejiga cultivadas *in vitro*.

*Análisis del número de copias del gen de la quinasa Aurora A* Se utilizó una sonda de FISH de la quinasa Aurora A de dos colores AURKA 20ql3/sonda de ADN a-satélite del cromosoma de MP Biomedicals/Qbiogene (Illkirch, Francia), para detectar el número de copias del gen de la quinasa Aurora A en células exfoliadas de sedimentos de la orina evacuada. La sonda AURKA 20813 se marcó directamente con Rodamina (roja) y la sonda a-satélite del cromosoma 20 se marcó directamente con Fluoresceína (verde). Las condiciones de hibridación fueron las recomendadas por el fabricante.<sup>15</sup> En pocas palabras, los sedimentos de la orina evacuada se descongelaron y lavaron tres veces en PBS seguido de centrifugación. Las preparaciones de citospina se fijaron en metanol/ácido acético (3:1) y se pretrataron en 2X SSC/NP-40 al 0,5%, pH7 a 37 °C durante 30 minutos seguido de una deshidratación en gradientes crecientes de etanol. Tras una desnaturalización a 90 °C durante 5 minutos las células se hibridaron durante toda la noche con 10 µl de una sonda de AURKA 20ql3 a 37 °C. Después se lavaron durante 5 minutos en 0,5X SSC/SDS al 0,1 % durante cinco minutos a 65°C, las células se contracoloraron con DAPI y se montaron en una solución antifade. Las señales de fluorescencia se contaron y capturaron con un microscopio Zeiss Axioplan 2.

*Análisis de la ploidía del ADN.* La ploidía de los núcleos interfásicos se analizó con sondas de FISH centroméricas para los cromosomas 3, 7 y 17 (Vysis Abbott; Park, IL) y mediante mediciones del ADN nuclear total mediante un análisis de imágenes con el sistema SAMBA 4000 (Ampersand Medical; Chicago, IL) tal y como se ha descrito anteriormente.<sup>6</sup> Se utilizaron células uroteliales humanas normales de especímenes de nefrectomías resecados tanto para ensayar la eficacia de las sondas de FISH en tejidos diploides humanos normales como para utilizarlas a modo de control negativo.

Se realizaron mediciones de la ploidía del ADN en preparaciones de citospina de muestras pareadas o tumores de urotelio/vejiga adyacentes y líneas celulares cancerosas de la vejiga teñidas con la reacción de Feulgen. El índice de ADN se calculó como la relación del contenido medio de ADN nuclear de las células tumorales respecto al contenido medio de ADN nuclear de un patrón diploide (linfocitos de sangre periférica humana). Los tumores con índices de ADN de entre 0,9 y 1,2 se clasificaron como diploides/casi diploides mientras que los tumores en los que un índice de ADN superior a 1,2 estaba en más de un 20% de las células con un pico diferenciado en el histograma se clasificaron como aneuploides.

*Ensayos de transfección in vitro.* Se llevaron a cabo estudios de transfección *in vitro* utilizando células uroteliales humanas inmortalizadas con quinasa Aurora A de tipo salvaje y virus de simios 40 (SV40) en pcDNA3 tal y como se ha descrito anteriormente.<sup>4</sup> En pocas palabras, las células transfectadas con un vector de GFP adenoviral sin quinasa Aurora A sirvieron como controles. Para los análisis solo se aceptaron los experimentos que mostraron unas tasas de transfección mayores que o iguales a un 80%. El grado de expresión ectópica de la quinasa Aurora A-GFP se verificó mediante un análisis Western blot utilizando anticuerpos antiGFP y mediante RT-PCR utilizando cebadores dirigidos a la secuencia de la fusión quinasa Aurora A-GFP. Las células se cultivaron después los días 1-4 posteriores a la transfección y se utilizaron para: análisis del número de copias de centrosomas, mediciones citométricas de flujo simultáneas del contenido total de ADN y de los niveles de expresión de la quinasa Aurora A, número de copias cromosómicas con sondas de FISH centroméricas para los cromosomas 3, 7 y 17 y ensayos de formación de colonias en agar blando.

Para el número de copias de centrosomas, las células fijadas en metanol se expusieron a un anticuerpo de ratón anti-tubulina-y (dilución 1:2000, Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO) durante 1 hora tal y como se ha descrito anteriormente.<sup>4</sup> Resumiendo, el anticuerpo primario unido se detectó con un anticuerpo anti-ratón conjugado con rojo Texas (dilución 1:500, Vector Laboratories, Burlingame, CA) utilizando DAPI como contracolorante.

Los análisis citométricos de flujo simultáneos del contenido de ADN (fluorescencia roja de yoduro de propidio; PI) y de los niveles de expresión de la quinasa Aurora A (fluorescencia verde de GFP) se llevaron a cabo utilizando un clasificador de células activado por fluorescencia (EPICS XL-MCL, Beckman Coulter, Inc, Miami, FL). La población de células con un contenido anormal de ADN se computó como el número células positivas de GFP con un índice de ADN < 2c y > 4c.

Para los ensayos de formación de colonias en agar blando, las células uroteliales inmortalizadas con un SV40 se infectaron con un vector adenovirus que contiene quinasa Aurora A de tipo salvaje etiquetada con GFP o un adenovirus de control que solo contiene GFP. Un día después de la infección viral, las células se pusieron en placas a una concentración de 10.000 células/placa sobre un medio acondicionado de UM-UC-3 que contiene agar blando. El número de colonias por placa se registró dos semanas después de la puesta en placas.

*Análisis estadísticos* Para el análisis cuantitativo de FISH se contaron tanto las señales verdes como las rojas de al menos 20 células de cada muestra de orina y se registró el número de señales verdes y rojas de cada célula. Las células con una señal de Aurora A anormal se dividieron en dos subgrupos que consistían en células con unos niveles de amplificación del gen de la quinasa Aurora A bajos (3-4 copias) y altos (>4 copias). Para cada muestra calculamos una puntuación de quinasa Aurora A dividiendo el número de células con unos niveles elevados (3 ó más copias) entre el número total de células examinadas. Se consideró que una puntuación de quinasa Aurora A >0,15 era elevada y correspondía a >3 células de un grupo de 20 con al menos 3 señales de FISH rojas. Esta

puntuación se utilizó para producir curvas ROC para un set de formación de siete controles y 23 muestras de orina de pacientes con cáncer de vejiga ( $n = 30$ ). La eficacia de la prueba de FISH de la quinasa Aurora A se validó aún más en un grupo de análisis de 30 controles y 51 muestras de orina de pacientes con cáncer de vejiga ( $n = 81$ ). El área debajo de la curva (AUC) se utilizó para evaluar la eficacia del marcador. El AUC es equivalente a una prueba de suma de rangos Wilcoxon-Mann-Whitney en la que se comparan los grupos de casos y de control y la última prueba se utilizó para derivar valores  $p$ . Se utilizaron pruebas  $X^2$  en los datos de muestras de cáncer para determinar la asociación entre la puntuación relativa a la quinasa Aurora A y las funciones patológicas de los tumores tales como el grado histológico, el patrón de crecimiento y la estadificación. En los casos en que los totales de las tablas de contingencia fueron pequeños, los valores  $p$  se determinaron mediante una simulación con totales marginales fijos ( $p < 0,05$  se consideró significativo).

### Resultados

En primer lugar investigamos los niveles de expresión de la quinasa Aurora A en muestras de TCC de la vejiga y su urotelio preneoplásico adyacente *in situ*. Los niveles de ARNm de la quinasa Aurora A revelados mediante una RT-PCR cuantitativa fueron elevados tanto en el urotelio adyacente como en los TCC (Fig. 1 A). Los niveles de expresión de la quinasa Aurora A estaban correlacionados con el grado, estadificación y aneuploidía del tumor (Fig. 1B-D). TCCs superficiales de grado bajo que mostraron una desviación mínima del diploide normal de su contenido total de ADN nuclear y que fueron clasificados como casi diploides mostraron un leve aumento de la expresión de la quinasa Aurora A (2 veces mayor aproximadamente) en comparación con el urotelio normal. Por contra, los TCCs invasivos de grado alto con una aneuploidía pronunciada mostraron un marcado aumento de la expresión de la quinasa Aurora A (7 veces mayor aproximadamente).

Para determinar si el grado de inestabilidad cromosómica estaba relacionado con el grado de sobreexpresión de la quinasa Aurora A, analizamos los niveles de expresión de la quinasa Aurora A y el número de copias de cromosomas en líneas celulares cancerosas de la vejiga (fig. 2A, B). Utilizando los niveles expresión de la quinasa Aurora A, dividimos las líneas celulares cancerosas de la vejiga en tres grupos (Fig. 2C). El primer grupo consistió en 6 líneas celulares sin un aumento de la expresión de la quinasa Aurora A. El segundo grupo consistió en 4 líneas celulares con un aumento ligero de la quinasa Aurora A (2 a 5 veces mayor). Las 3 líneas celulares restantes mostraron unos niveles notablemente elevados de quinasa Aurora A (6 a 14 veces mayores). Los análisis del número de copias cromosómicas utilizan sondas de FISH centroméricas para cromosomas seleccionados (3, 7, 17) revelaron un aumento considerable de los números de cromosomas en las líneas celulares con unos niveles notablemente elevados de quinasa Aurora A (Fig. 2D).

Estos estudios correlativos sugieren que la ganancia de la función de la quinasa Aurora A por medio de la amplificación y sobreexpresión da lugar a fenotipos celulares aneuploides durante el desarrollo del cáncer de vejiga. Verificamos esta hipótesis mediante estudios de transfecciones *in vitro* utilizando células uroteliales inmortalizadas con un SV40 y construcciones adenovirales que contienen insertos de quinasa Aurora A de tipo salvaje-GFP. Las células uroteliales transfectadas mostraron un marcado aumento de la quinasa Aurora A expresada ectópicamente que se asoció a la amplificación de centrosomas y al desarrollo de la aneuploidía además de un fenotipo celular transformado revelado por la presencia de un mayor número de señales de centrosomas, número de copias cromosómicas, contenido total de ADN, y la adquisición de la capacidad de formar colonias en agar blando (Fig. 3A-D).

Para determinar si la quinasa Aurora A puede utilizarse como marcador para la detección de cáncer de vejiga, analizamos sedimentos en la orina evacuada de pacientes con cáncer de vejiga para la amplificación de la quinasa Aurora A utilizando la técnica de FISH (Fig. 4A). Los análisis se realizaron a ciegas, es decir, el observador que puntuaba los resultados de la FISH no sabía si la muestra había sido obtenida de un paciente con cáncer de vejiga o de un control no afectado. El análisis inicial se realizó en un set de formación de sedimentos de la orina evacuada por 23 pacientes con cáncer de vejiga y siete controles sanos. Reveló al menos dos niveles de amplificación del gen (3-4 copias) en los 23 pacientes con cáncer de vejiga. Los sedimentos presentes en la orina evacuada de pacientes con TCC de grado bajo, contenían principalmente células que tenían 3-4 copias de quinasa Aurora A mientras que una proporción considerable de células (>20%) de pacientes con TCC de grado alto tenían >4 copias de quinasa Aurora A (Fig. 4B). En un control se detectaron dos células con tres copias de la señal de quinasa Aurora A. En los sedimentos presentes en la orina de los seis controles restantes no se detectó ningún número anormal de copias de la quinasa Aurora A. El análisis de los datos del set de formación utilizando más de un 15% de células con al menos 3 copias de quinasa Aurora A como punto de corte para la positividad del ensayo dio como resultado una especificidad de 1,0, una sensibilidad de 0,91 y un AUC ROC de 0,997 ( $p = 1 \times 10^{-4}$ ).

Validamos la eficacia de la prueba FISH de la quinasa Aurora A para el cáncer de vejiga en un set de prueba ciego adicional que consiste en muestras de orina evacuada de 51 pacientes con cáncer de vejiga y 30 controles sanos. Los datos se analizaron utilizando el mismo punto de corte para la positividad de la prueba, a saber, > 15% de células con al menos 3 copias de la quinasa Aurora A. La prueba dio positiva en 44 muestras de pacientes con cáncer de vejiga. En siete pacientes con cáncer de vejiga no se identificaron números anormales de copias del gen de la quinasa Aurora A. En cinco de un total de 30 muestras de control, se identificaron 1-3 células con tres copias del gen de la quinasa Aurora A. Los análisis del set de prueba dieron una especificidad de 1,0, una sensibilidad de 0,84 y una AUC ROC de 0,925 ( $p = 6,79 \times 10^{-11}$ ). Los resultados de los análisis de FISH cuantitativa de las células



presentes en la orina evacuada de los 74 pacientes con cáncer de vejiga y 37 controles sanos se resumen en la Figura 5. El grado de amplificación de la quinasa Aurora A medido según la puntuación de Aurora está estrechamente relacionado con el grado histológico de los tumores. Los cánceres de vejiga con un grado histológico alto (grado 3) tenían unas puntuaciones para la quinasa Aurora A considerablemente más altas ( $0,60 \pm 0,29$ ) que los tumores de grado bajo (grado 1-2) ( $0,13 \pm 0,15$ ). No había ninguna correlación significativa entre la puntuación y el patrón de crecimiento de los tumores (papilar frente a no papilar) o la estadificación (superficial frente a invasivo) (datos no mostrados).

### Discusión

Los hallazgos actuales a la luz de los publicados anteriormente proporcionan pruebas fehacientes a favor de que la amplificación/sobreexpresión de la quinasa Aurora A es un evento preliminar en la carcinogénesis de la vejiga asociada al desarrollo de la amplificación de centrosomas y al contenido genómico aneuploide. Estas observaciones adquieren una significancia biológica importante a la vista de nuestros hallazgos comunicados anteriormente de que la quinasa Aurora A facilita la degradación de la proteína supresora de tumores p53 y que las muestras de tumores de la vejiga humana con una expresión elevada de quinasa Aurora A revelan un contenido celular de p53 extremadamente bajo, imitando la pérdida de una vía supresora de tumores críticos.<sup>17</sup>

Cabe señalar en este contexto que la pérdida o inactivación por mutaciones de determinadas proteínas supresoras de tumores, en particular de la p53, provoca una amplificación de los centrosomas<sup>18</sup> y que la ocurrencia concomitante de la mutación p53 y la sobreexpresión de la ciclina E está fuertemente asociada a la inestabilidad de los centrosomas y la amplificación de los centrosomas en el cáncer de vejiga.<sup>19</sup> El reciente descubrimiento de que la interacción y retrocontrol entre la quinasa Aurora A y la proteína estructural de adhesión focal HEF1 indica que una expresión elevada de quinasa Aurora A puede descomponer de manera coordinada los procesos de señalización dependientes de la integrina que controlan la adhesión de las células, la migración y la supervivencia de células además de inducir la inestabilidad cromosómica manifestada a modo aneuploidía.<sup>20</sup> Estas observaciones no solo proporcionan pruebas fehacientes del papel fundamental de la quinasa Aurora A en la transformación maligna de células uroteliales, sino que también sugiere que puede ser un nuevo biomarcador para el cáncer de vejiga.

De manera colectiva, nuestros datos indican que cuando la quinasa Aurora A se sobreexpresa en células uroteliales provoca la amplificación de los centrosomas y fallos en la segregación de cromosomas, dando como resultado la aneuploidía y fenotipos transformados. Los actuales estudios de FISH en muestras de orina evacuada de pacientes con cáncer de vejiga junto con los datos publicados anteriormente indican que la sobreexpresión y amplificación de la quinasa Aurora A es frecuente en el cáncer de vejiga y puede detectarse en células uroteliales exfoliadas de los sedimentos presentes en la orina evacuada. La sonda de FISH de dos colores para el gen de la quinasa Aurora A y de ADN a-satélite centromérica del cromosoma 20 detectó cáncer de vejiga con una alta especificidad y sensibilidad. Además, el grado de amplificación de la quinasa Aurora A se correlacionó con el cáncer de vejiga clínicamente agresivo de grado alto. Esto implica que la prueba para este número de copias de la quinasa Aurora mediante la técnica de FISH en la orina es una prueba no invasiva prometedora para el cáncer de vejiga.

Además, según nuestro mejor saber y entender, nuestro trabajo es el primero que va más allá de los estudios correlativos que *sugieren* que la ganancia de función de la quinasa Aurora A por amplificación y sobreexpresión da lugar a fenotipos celulares aneuploides durante el desarrollo del cáncer de vejiga demostrando que la sobreexpresión de la quinasa Aurora A en las células uroteliales *causa* una amplificación de los centrosomas y fallos en la segregación de cromosomas, resultando en aneuploidía y en fenotipos transformados.

Todos los métodos aquí presentados y reivindicados pueden realizarse y ejecutarse sin tener que realizar experimentos no necesarios a la luz de esta presentación.

### REFERENCIAS

1. Perkins AS, Stern DF. Molecular biology of cancer: oncogenes. En: Cancer: Principles and practices of oncology. Filadelfia: Lippincott-Raven Publishers, 5ª edición, 1997: 79-119.
2. Heim S, Mitelman F. Cancer cytogenetics, 2ª edición. Nueva York, 1995.
3. Sen S. Aneuploidy and cancer. En: Lenganer C ed. Current Opinion in Oncology, Lippincott, Williams, and Wilkins, 2000: Vol. 12, págs. 82-88.
4. Zhou H, Kuang J, Zhong L, et al. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet* 1998; 20: 189-93.
5. Katayama H, Zhou H, Li Q, et al. Interaction and feedback regulation between STK15/BTAK/Aurora-A kinase and protein phosphatase I through mitotic cell division cycle. *JBiol Chem* 2001; 276: 46219-24. 6.

6. Sen S, Zhou H, Zhang RD, et al. Amplification/overexpression of a mitotic kinase gene in human bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 1320-29.
- 5 7. Andrews PD. Aurora kinases: shining lights on the therapeutic horizon? *Oncogene* 2005;24:5005-15.
8. Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, et al. A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *Embo J* 1998; 17: 305265.
- 10 9. Savelieva E, Belair CD, Newton MA, et al. 20q gain associates with immortalization: 20q13.2 amplification correlates with genome instability in human papillomavirus 16 E7 transformed human uroepithelial cells. *Oncogene* 1997; 14: 551-60.
- 15 10. Ewart-Toland A, Briassoulis P, de Koning JP, et al. Identification of Stk6/STK15 as a candidate low-penetrance tumor-susceptibility gene in mouse and human. *Nat Genet* 2003; 34:403-12.
11. Spiess PE, Czerniak B. Dual track concept of bladder carcinogenesis: Practical implications. *Arch Pathol Lab Invest* 2006; 130:844-52.
- 20 12. Kim JH, Tuziak T, Hu L, et al. Alterations in transcription clusters underlie development of bladder cancer along papillary and nonpapillary pathways. *Lab Invest* 2005; 85: 532-49.
- 25 13. Christian BJ, Loretz LJ, Oberley TD, Reznikoff CA. Characterization of human uroepithelial cells immortalized in vitro by simian virus 40. *Cancer Res* 1987; 47: 6066-73.
14. Liebert M, Wedemeyer G, Chang JH, et al. Comparison of antigen expression on normal urothelial cells in tissue section and tissue culture. *J Urol* 1990; 144: 1288-92.
- 30 15. Sakakura C, Hagiwara A, Yasuoka R, et al. Tumour-amplified kinase BTAK is amplified and overexpressed in gastric cancers with possible involvement in aneuploid formation. *Br J Cancer* 2001; 84:824-31.
16. Hanley JA, McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 1982;143:29-36.
- 35 17. Katayama H, Sasai K, Kawai H, et al. Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nat Genet* 2004; 36: 55-62.
- 40 18. Fukasawa K. Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. *Cancer Lett* 2005; 230: 6-19.
19. Kawamura K, Izumi H, Ma Z, et al. Induction of centrosome amplification and chromosome instability in human bladder cancer cells by p53 mutation and cyclin E overexpression. *Cancer Res* 2004; **64**:4800-09.
- 45 20. Pugacheva EN, Golemis EA. The focal adhesion scaffolding protein HEF1 regulates activation of the Aurora-A and Nek2 kinases at the centrosome. *Nat Cell Biol* 2005; 7: 937-46.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Grossman, H. Barton

Czerniak, Bogdan

<120> Detección no invasiva del cáncer de vejiga mediante hibridación fluorescente in situ de aurora  
Aurora aA

<130> MDA07-125, 4002.001790

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 2128

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| cttgggaagac ttgggtcctt gggtcgcagg ctggagtgc atggtgtgat ctcagctcac  | 60   |
| tgcaacctct gcttcctggg tttaagtgat tctcctgcct cagcctcccg agtagctggg  | 120  |
| attacaggca tcatggaccg atctaaagaa aactgcattt caggacctgt taaggctaca  | 180  |
| gctccagttg gaggtccaaa acgtgttctc gtgactcagc aatttccttg tcagaatcca  | 240  |
| ttacctgtaa atagtggcca ggctcagcgg gtcttgtgtc cttcaaattc ttcccagcgc  | 300  |
| gttcctttgc aagcacaaaa gcttgtctcc agtcacaagc cggttcagaa tcagaagcag  | 360  |
| aagcaattgc aggcaaccag tgtacctcat cctgtctcca ggccactgaa taacacccaa  | 420  |
| aagagcaagc agccoctgcc atcggcacct gaaaataatc ctgaggagga actggcatca  | 480  |
| aaacagaaaa atgaagaatc aaaaaagagg cagtgggctt tggaagactt tgaaattggg  | 540  |
| cggcctctgg gtaaaggaaa gtttgtaaat gtttatttgg caagagaaaa gcaaagcaag  | 600  |
| tttattctgg ctcttaaaagt gttatttaaa gctcagctgg agaaagccgg agtggagcat | 660  |
| cagctcagaa gagaagtaga aatacagtcc caccttcggc atcctaatat tcttagactg  | 720  |
| tatggttatt tccatgatgc taccagagtc tacctaattc tggaatatgc accacttgga  | 780  |
| acagtttata gagaacttca gaaactttca aagtttgatg agcagagAAC tgctacttat  | 840  |
| ataacagaat tggcaaatgc cctgtcttac tgtcattcga agagagttat tcatagagac  | 900  |
| attaagccag agaacttact tcttgatca gctggagagc ttaaaattgc agattttggg   | 960  |
| tggtcagtac atgctccatc ttccaggagg accactctct gtggcaccct ggactacctg  | 1020 |
| ccccctgaaa tgattgaagg tcggatgcat gatgagaagg tggatctctg gagccttgga  | 1080 |
| gttcctttgct atgaattttt agttgggaag cctccttttg aggcaaacac ataccaagag | 1140 |
| acctacaaaa gaatatcacg ggttgaattc acattccctg actttgtaac agagggagcc  | 1200 |
| agggacctca tttcaagact gttgaagcat aatcccagcc agaggccaat gctcagagaa  | 1260 |
| gtacttgaac acccctggat cacagcaaat tcatcaaaac catcaaattg ccaaaacaaa  | 1320 |
| gaatcagcta gcaaacagtc ttaggaatcg tgcaggggga gaaatccttg agccagggct  | 1380 |

gccatataac ctgacaggaa catgctactg aagtttattt taccattgac tgctgccctc 1440  
aatctagaac gctacacaag aaatatattgt ttactcagc aggtgtgcct taacctccct 1500  
attcagaaag ctccacatca ataaacatga cactctgaag tgaaagtagc cacgagaatt 1560  
gtgctactta tactgggtca taatctggag gcaagggtcg actgcagccg ccccgtcagc 1620  
ctgtgctagg catggtgtct tcacaggagg caaatccaga gcctggctgt ggggaaagtg 1680  
accactctgc cctgaccccg atcagttaag gagctgtgca ataaccttc tagtacctga 1740  
gtgagtgtgt aacttattgg gttggcgaag cctggtaaag ctggtggaat gagtatgtga 1800  
ttctttttaa gtatgaaaat aaagatatat gtacagactt gtattttttc tctgggtggca 1860  
ttccttttagg aatgctgtgt gtctgtccgg caccgccgta ggctgattg ggtttctagt 1920  
cctccttaac cacttatctc ccatatgaga gtgtgaaaaa taggaacacg tgctctacct 1980  
ccatttaggg atttgcttgg gatacagaag aggccatgtg tctcagagct gttaagggct 2040  
tattttttta aaacattgga gtcatagcat gtgtgtaaac tttaaatatg caaataaata 2100  
agtatctatg tcaaaaaaaaa aaaaaaaaa 2128

-{}-

<210> 2

<211> 2112

<212> ADN

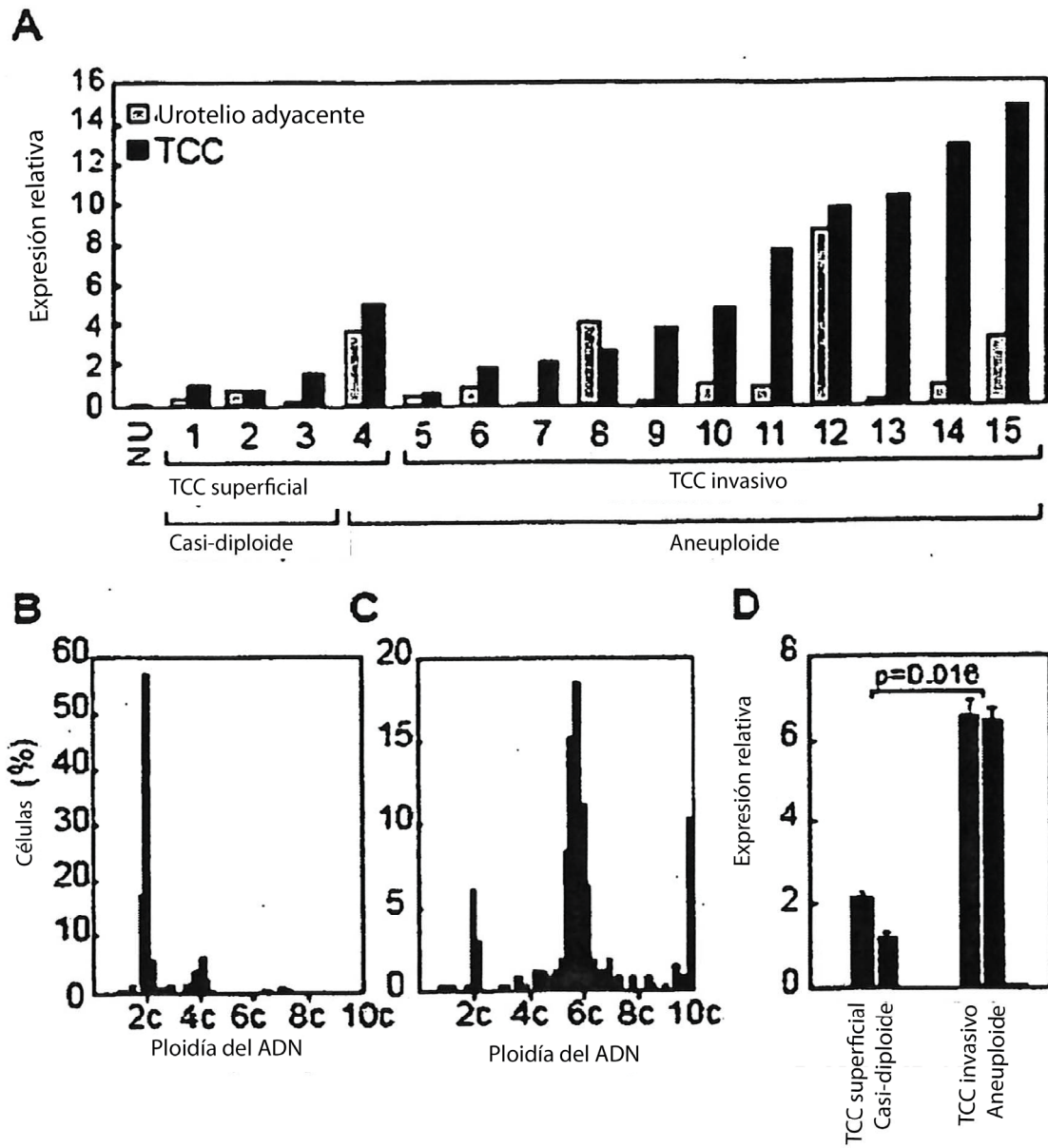
5 <213> Homo sapiens

<400> 2  
cttgaagac ttgggtcctt gggcgcagg ctggagtga atgggtgat ctgagctcac 60  
tgcaacctct gcttcctggg tttaagtgat tctcctgcct cagcctcccg agtagctggg 120  
attacaggca tcatggaccg atctaaagaa aactgcattt caggacctgt taaggctaca 180  
gctccagttg gaggtccaaa acgtgttctc gtgactcagc aatttccttg tcagaatcca 240  
ttacctgtaa atagtggcca ggctcagcgg gtcttgtgtc cttcaaattc ttcccagcgc 300  
attcctttgc aagcacaaaa gcttgtctcc agtcacaagc cggttcagaa tcagaagcag 360  
aagcaattgc aggcaaccag tgtacctcat cctgtctcca ggccactgaa taacacccaa 420  
aagagcaagc agcccctgcc atcggcacct gaaaataatc ctgaggagga actggcatca 480  
aaacagaaaa atgaagaatc aaaaaagagg cagtgggctt tggaagactt tgaaattggt 540  
cgccctctgg gtaaaggaaa gtttggtaat gtttatttgg caagagaaaa gcaaagcaag 600  
tttattctgg ctcttaaagt gttattttaa gctcagctgg agaaagccgg agtggagcat 660  
cagctcagaa gagaagtaga aatacagtc cactctggc atcctaatat tcttagactg 720  
tatggttatt tccatgatgc taccagagtc tacctaattc tggaatatgc accacttgga 780  
acagtttata gagaacttca gaaactttca aagtttgatg agcagagAAC tgctacttat 840  
ataacagaat tggcaaatgc cctgtcttac tgtcattcga agagagttat tcatagagac 900  
attaagccag agaacttact tcttgatca gctggagagc ttaaaattgc agattttggg 960

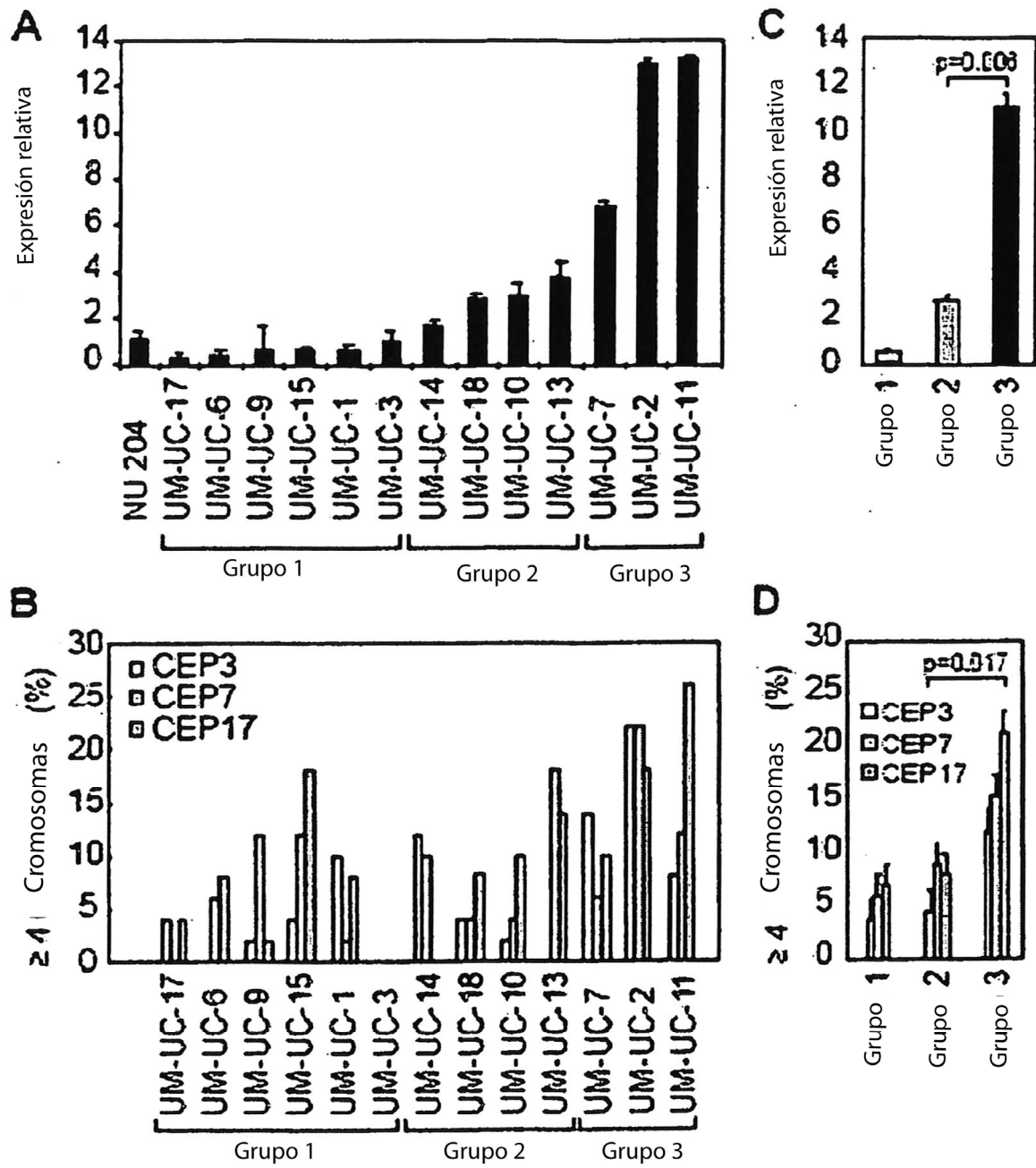
|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| tggtcagtac atgctccatc ttccaggagg accactctct gtggcaccct ggactacctg  | 1020 |
| ccccctgaaa tgattgaagg tcggatgcat gatgagaagg tggatctctg gagccttgga  | 1080 |
| gttctttgct atgaatTTTT agttgggaag cctccttttg aggcaaacac ataccaagag  | 1140 |
| acctacaaaa gaatatcacg ggttgaattc acattccctg actttgtaac agaggggagcc | 1200 |
| agggacctca tttcaagact gttgaagcat aatcccagcc agaggccaat gctcagagaa  | 1260 |
| gtacttgaac acccctggat cacagcaaat tcatcaaaac catcaaattg ccaaaacaaa  | 1320 |
| gaatcagcta gcaaacagtc ttaggaatcg tgcaggggga gaaatccttg agccagggct  | 1380 |
| gccatataac ctgacaggaa catgctactg aagtttattt taccattgac tgctgccctc  | 1440 |
| aatctagaac gctacacaag aaatatttgt tttactcagc aggtgtgcct taacctccct  | 1500 |
| attcagaaag ctccacatca ataaacatga cactctgaag tgaaagtagc cacgagaatt  | 1560 |
| gtgctactta tactggttca taatctggag gcaagggtcg actgcagccg ccccgtcagc  | 1620 |
| ctgtgctagg catggtgtct tcacaggagg caaatccaga gcctggctgt ggggaaagtg  | 1680 |
| accactctgc cctgaccccg atcagttaag gagctgtgca ataaccttc tagtacctga   | 1740 |
| gtgagtgtgt aacttattgg gttggcgaag cctggtaaag ctggtggaat gagtatgtga  | 1800 |
| ttctttttta gtatgaaaat aaagatatat gtacagactt gtattttttc tctgggtggca | 1860 |
| ttccttttagg aatgctgtgt gtctgtccgg caccgccgta ggctgattg gggttctagt  | 1920 |
| cctccttaac cacttatctc ccatatgaga gtgtgaaaaa taggaacacg tgctctacct  | 1980 |
| ccatttaggg atttgcttgg gatacagaag aggccatgtg tctcagagct gttaagggct  | 2040 |
| tattttttta aaacattgga gtcatagcat gtgtgtaaac tttaaatatg caaataaata  | 2100 |
| agtatctatg tc                                                      | 2112 |

# REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de cáncer de vejiga en un paciente que comprende: aislar células de la vejiga de la orina del paciente, hibridar las células de la vejiga con una sonda de ADN marcada, en donde la sonda reconoce al menos una porción del gen de la quinasa Aurora A, para obtener una muestra de células de la vejiga hibridadas con la sonda de ADN marcada; y contar el número de células de la vejiga presentes en la muestra, el número de copias del gen de la quinasa Aurora A en cada célula de la vejiga de la muestra y el número de células de la vejiga en la muestra que tienen al menos un primer número umbral de copias del gen de la quinasa Aurora A, comprendiendo además, si un porcentaje mayor o igual a un primer porcentaje umbral de las células de la vejiga tiene al menos el primer número umbral de copias del gen de la quinasa Aurora A, suponer que el paciente tiene cáncer de vejiga, en donde el primer número umbral de copias del gen de la quinasa Aurora A es tres y el primer porcentaje umbral es 15%.  
5  
10
2. El método de la reivindicación 1, en donde el recuento comprende además contar el número de células de la vejiga que tiene al menos un segundo número umbral de copias del gen de la quinasa Aurora A, en donde el segundo número umbral de copias es mayor que el primer número umbral de copias.  
15
3. El método de la reivindicación 2, en donde el segundo número umbral de copias del gen de la quinasa Aurora A es cinco.  
20
4. El método de la reivindicación 1, que comprende además, si un porcentaje mayor que o igual a un segundo porcentaje umbral de las células de la vejiga tiene al menos el primer número umbral de copias del gen de la quinasa Aurora A, en donde el segundo porcentaje umbral es mayor que el primer porcentaje umbral, suponer que el paciente tiene un cáncer de vejiga agresivo.  
25
5. El método de la reivindicación 4, en donde el segundo porcentaje umbral es de un 20%.
6. El método de la reivindicación 1, en donde el gen de la quinasa Aurora A comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO:2.  
30  
35



**Fig 1**



**Fig 2**



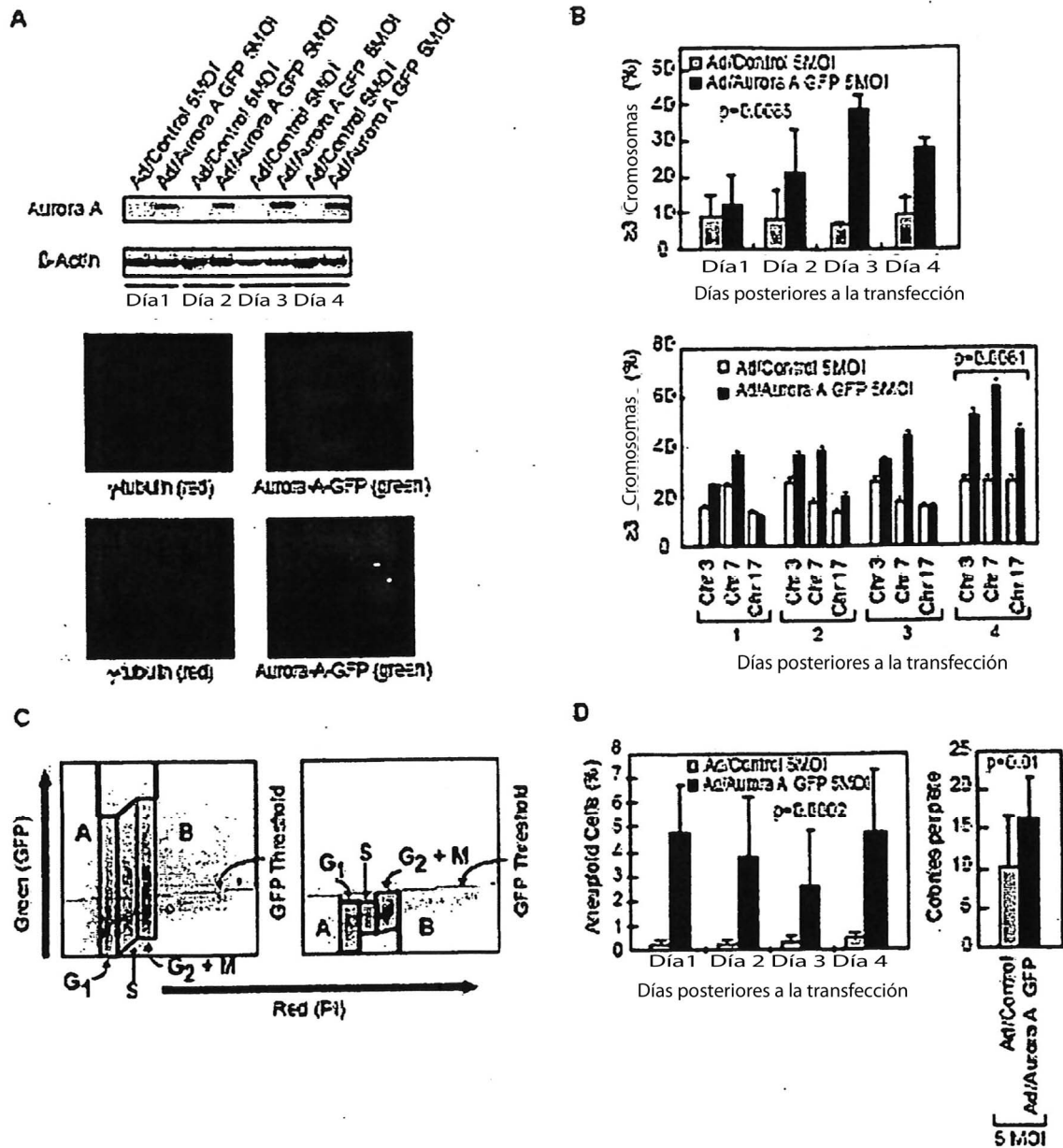


Fig 3

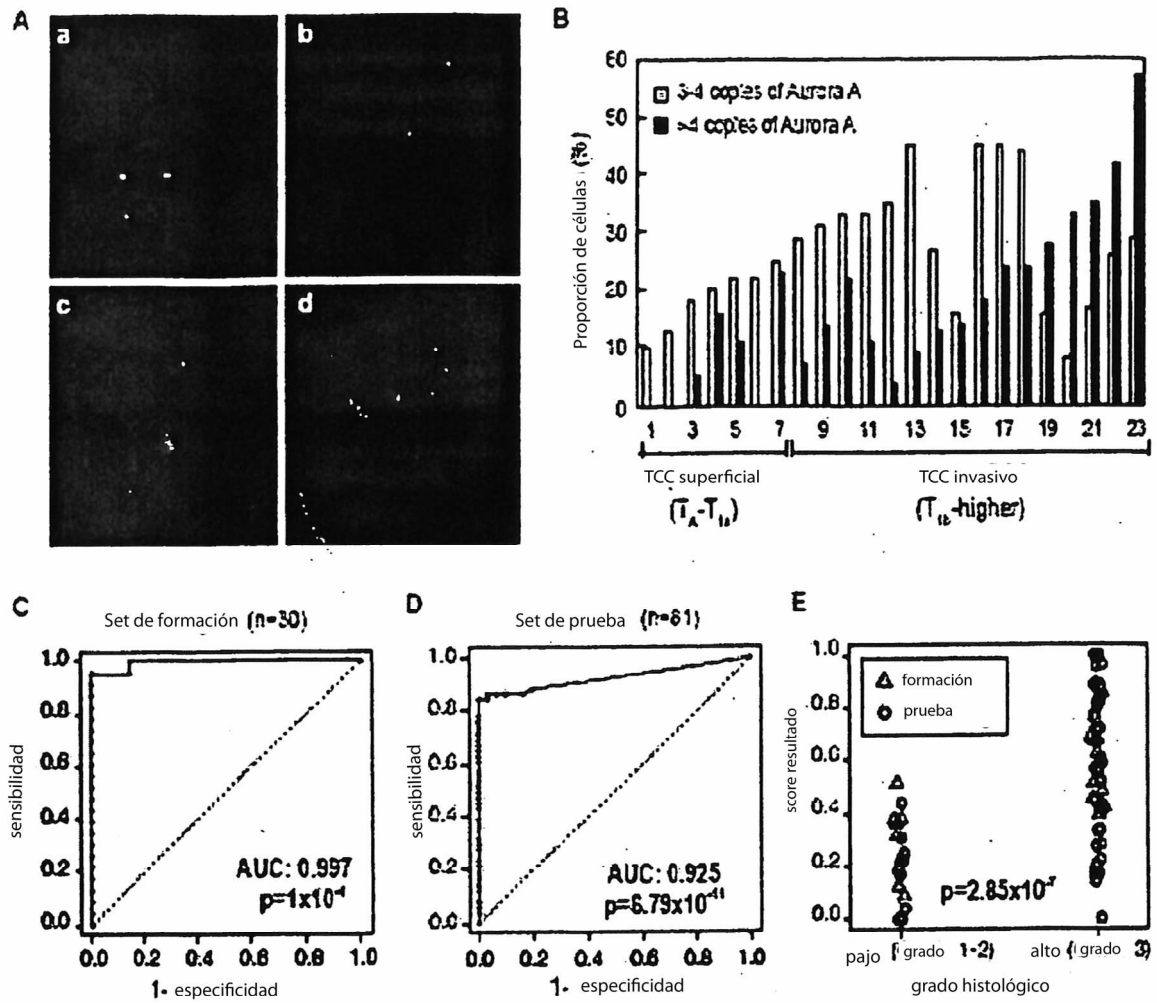


Fig 4

Fig 5

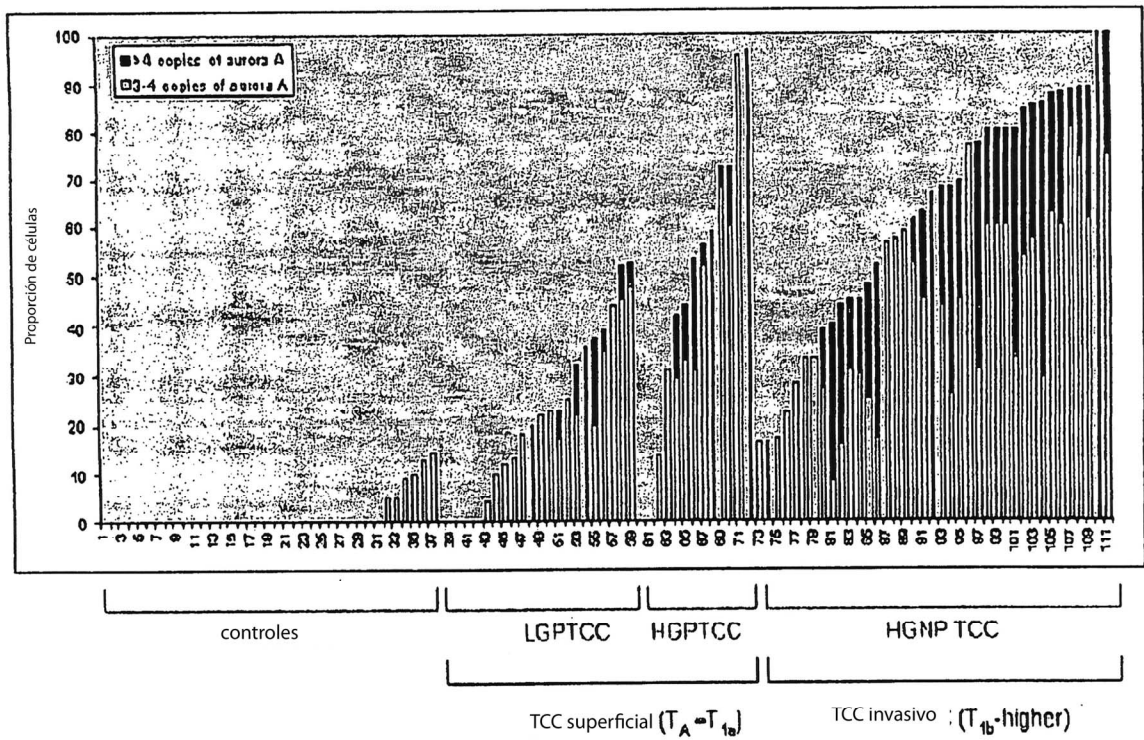


Fig 6

