

Técnicas de citogenética molecular y sus aplicaciones”

**Dra. Blanca Espinet, Dr. Marta Salido, Dr. Francesc Solé.
Laboratori de Citogenètica i Biologia Molecular
Servei de Patologia
Hospital de Mar de Barcelona**

UTILIDAD DE LA CITOGENÉTICA EN EL ESTUDIO DE LAS NEOPLASIAS

En los últimos años los análisis citogenéticos han ido adquiriendo mayor importancia tanto en el estudio de las neoplasias, como en las hemopatías malignas. Los recientes avances registrados en este campo, entre los que destacan la calidad de las bandas cromosómicas, han permitido identificar subgrupos clínicos asociados a cambios cromosómicos específicos.

Es importante subrayar que la interpretación de los resultados citogenéticos se debe realizar teniendo en cuenta tanto la historia clínica del paciente, como los hallazgos de laboratorio. Por ello es necesario una estrecha colaboración entre los citogenetistas, hematólogos y oncólogos, colaboración que permitirá interpretar el significado y el valor del cambio cromosómico hallado en un paciente determinado.

Es asimismo importante tener en cuenta el tipo de material que debe utilizarse para la realización de un estudio citogenético, que necesariamente corresponderá a las células implicadas en la enfermedad. Así, en el caso de las leucemias, la valoración se debe realizar en la medula ósea. En los linfomas, hay que analizar los ganglios linfáticos o los tejidos también implicados; en la leucemia linfática crónica y en algunas otras enfermedades, puede efectuarse en sangre periférica al hallarse en ella una gran proporción de células leucémicas. En el caso de los tumores sólidos el tejido de elección debe ser una muestra representativa del propio tumor. No obstante, en general, y a pesar de la invasión periférica, tanto para la leucemia mieloide crónica como para síndromes mielodisplásicos y leucemias agudas se requiere el estudio de medula ósea para obtener la debida

información citogenética. En aquellos casos en que debe descartarse que la alteración cromosómica hallada en medula ósea es constitucional, se requerirá asimismo un estudio de sangre periférica estimulada con Fitohemaglutinina (PHA).

Por lo demás, los resultados citogenéticos además de ser importantes para la precisa caracterización de las leucemias, también aportan información de valor pronóstico. Así por ejemplo, existen alteraciones que implican un pronóstico favorable, tales como la $t(8;21)(q22;q22)$ en la leucemia aguda no linfoblástica (LANL) M2 o la $inv(16)(p13q22)$ en la LANL M4 con eosinofilia medular (M4Eo), mientras que la monosomía del cromosoma 7 (-7) o la detección de cariotipos complejos (con más de tres alteraciones cromosómicas distintas) se relacionan con un pronóstico desfavorable. En estos casos concretos y en otros varios, son los cambios cromosómicos los que por sí solos tienen valor pronóstico.

Por otro lado, la caracterización y el mapado de los genes localizados en los puntos de rotura implicados en alteraciones cromosómicas, está permitiendo conocer el mecanismo por el cual se origina una neoplasia.

Los recientes avances en el campo de la genética molecular constituyen un complemento importante para los citogenetistas, ya que enriquecen la información que aporta el estudio citogenético.

Valor pronóstico de los hallazgos citogenéticos

Seguidamente se detallan los cambios cromosómicos que tienen un valor pronóstico, por orden de importancia:

- **Cambio cromosómico primario**: Se acepta que es el que está relacionado con el proceso de transformación maligna y está estrechamente asociado a mecanismos moleculares, los cuales serían los responsables de la neoplasia.
- **Cambio cromosómico secundario**: Cuando ocurren cambios cromosómicos secundarios la enfermedad sigue un curso más agresivo, haciéndose más resistente a la terapia y siendo más difícil obtener una remisión completa o de larga duración.

Cuando existen alteraciones secundarias el valor pronóstico parece estar relacionado con el número de anomalías. Por ello, la presencia de muchos cambios cromosómicos (MAKA, "major karyotypic abnormalities") conlleva peor pronóstico que la presencia de pocos cambios (MIKA, "minor karyotypic abnormalities").

- Presencia o ausencia de células citogenéticamente normales en médula ósea: Los pacientes que sólo presentan células con un cariotipo anormal (AA) tienen un peor pronóstico que los que tienen células normales (AN o NN).

- Presencia de dobles diminutos (DMS, "double minutes") o de regiones de tinción uniforme (HSR, "homogeneously staining regions"): La presencia en las células leucémicas de DMS y de HSR se asocia a un mal pronóstico. Los DMS y las HSR están relacionados con una amplificación génica, y ésta confiere una mayor resistencia a la terapia.

- Cambios cromosómicos numéricos (sin anomalías estructurales): Algunas leucemias (particularmente la leucemia linfoblástica aguda) están relacionadas con una alteración cromosómica numérica. Cuando estas anomalías representan el único cambio cromosómico, probablemente tienen el mismo valor pronóstico que los cambios primarios, tales como translocaciones, deleciones, inserciones o inversiones.

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN IN SITU (HIS). FUNDAMENTO Y APLICACIONES EN NEOPLASIAS

La técnica de hibridación *in situ* (HIS) permite detectar y localizar secuencias específicas de ácidos nucleicos (ADN o ARN) sobre preparaciones cromosómicas, extensiones celulares, cortes de tejido y cortes ultrafinos utilizados para el estudio al microscopio. La utilización de las técnicas de HIS ha aumentado en los últimos años como complemento de las técnicas de citogenética convencional (Tabla 1) . La ventaja de la citogenética convencional radica en la visualización de todos los cromosomas, pero presenta varias limitaciones: es necesario que existan células en división y en ocasiones se pueden valorar pocas metafases (menos de 20). Por otra parte, los cromosomas pueden presentar unas bandas cromosómicas poco definidas

siendo imposible determinar el cariotipo debido a una calidad morfológica deficiente. En este caso, no será factible la detección de alteraciones cromosómicas que afecten a regiones genéticas muy pequeñas. Para complementar las técnicas citogenéticas convencionales, actualmente disponemos de las técnicas de HIS.

La base metodológica para la realización de dichas técnicas requiere de una desnaturalización (rotura de los enlaces que unen la doble hélice del ADN) tanto del ADN de la muestra como del ADN de la sonda utilizada (que deberá ser complementario al fragmento de ADN que se desee estudiar). Posteriormente se procede a hibridar los ADNs de la muestra y de la sonda de modo que se produzca la unión entre ambos por complementariedad de bases. El resultado de la hibridación se interpretará microscópicamente y teniendo en cuenta el tipo de sonda utilizada.

A principios de los años 90, se introdujeron las técnicas de HIS en el laboratorio de hematología aplicadas al diagnóstico, pronóstico y seguimiento de las neoplasias hematológicas. Los tipos de sondas aplicadas de forma rutinaria fueron las sondas centroméricas (que marcan toda la región centromérica), las sondas de pintado cromosómico (constituidas por una librería de sondas que abarcan todo el cromosoma) y las sondas de secuencia única (locus específico), que marcan regiones cromosómicas muy concretas. A estas sondas nos referimos como sondas de HIS “convencionales” por ser de uso generalizado. Recientemente, han aparecido nuevas tecnologías de HIS con el mismo fundamento con la intención de resolver las carencias de las sondas “convencionales” y aportar una mayor información en el conocimiento del cariotipo. Dichas metodologías comprenden la técnica de Hibridación Genómica Comparada (HGC), de Multicolor-FISH (M-FISH) y Spectral Karyotyping (SKY) y la técnica de Multibanding-FISH.

Hibridación in situ “convencional”

La HIS “convencional”, de aplicación más generalizada en el estudio de las neoplasias, se basa en la utilización de tres tipos principales de sondas: sondas

centroméricas, sondas de pintado cromosómico y sondas de secuencia única o también llamadas de locus específico (Tabla 2).

Las sondas centroméricas están formadas por una secuencia repetitiva de ADN que hibrida con el ADN de la región centromérica del cromosoma. Éstas permiten detectar alteraciones cromosómicas numéricas tanto sobre metafases como sobre núcleos en interfase (citogenética interfásica). Mediante esta técnica se puede valorar la presencia o ausencia de alteraciones numéricas (monosomías o trisomías) sin la necesidad de tener células en división.

Las sondas de pintado cromosómico están formadas por una batería de sondas que en su conjunto hibridan con todo el cromosoma. Dichas sondas permiten visualizar alteraciones citogenéticas numéricas y estructurales sobre metafases y confirmar de forma inequívoca cariotipos con translocaciones complejas o con cromosomas marcadores. El pintado cromosómico es de gran utilidad cuando los cromosomas son de mala calidad y la citogenética convencional, por si sola, no puede resolver el cariotipo.

Las sondas de secuencia única o locus específico hibridan con el ADN de una región genómica concreta, correspondiente a un gen o a una banda cromosómica. Con ellas es posible detectar alteraciones numéricas y estructurales tanto en metafases como en núcleos interfásicos. Estas sondas son de gran utilidad para descartar alteraciones cromosómicas difíciles de identificar con las técnicas de bandeado convencionales, como translocaciones crípticas o microdeleciones.

En la Tabla 2 se muestran los tipos de sondas “convencionales” más utilizadas en el estudio de neoplasias hematológicas. En la Tabla 3 se comparan las técnicas de HIS “convencional” con las nuevas técnicas de HIS. En la Tabla 4 se resumen las recomendaciones respecto al número de células a analizar, los individuos controles a realizar y los niveles de corte para las sondas centroméricas, de locus específico y de pintado cromosómico.

Nuevas técnicas de HIS

Las técnicas de Multicolor-FISH (M-FISH) o “*Spectral Karyotyping*” (SKY), Multibanding-FISH e Hibridación Genómica Comparada (HGC) han aparecido

con la intención de resolver las carencias de la HIS “convencional” y aportar una mayor información en el conocimiento del cariotipo (Tabla 3).

Las técnicas MFISH o SKY se basan en la cohibridación de 24 sondas de pintado cromosómico marcadas con fluorescencia sobre metafases. El resultado de la hibridación permite visualizar simultáneamente cada par cromosómico de un color diferente. Estas técnicas son muy útiles para determinar de forma inequívoca cariotipos complejos y cromosomas no identificables con las técnicas de bandeo (cromosomas marcadores). Esta técnica presenta una limitación en aquellas patologías con un índice proliferativo bajo debido a la necesidad de obtener células en división. Así mismo, estas tecnologías no permiten el reconocimiento de algunos puntos de rotura como aquellos asociados a deleciones, inserciones, adiciones y translocaciones de pequeño tamaño (inferiores a 500-1500 Kb), para los cuales es necesario utilizar sondas específicas de locus.

Recientemente, se ha descrito la técnica de multibanding-FISH (RxFISH), técnica similar a las de MFISH o SKY, que permite la generación de un patrón de bandas de distintos colores para cada cromosoma. Dicha metodología se basa en las homologías genómicas que existen entre la especie humana y diferentes especies de mono. Las ventajas que ofrece respecto a las de MFISH o SKY radica en que la de Rx-FISH permite la identificación de alteraciones estructurales dentro de un mismo cromosoma (inversiones y translocaciones) y en que los puntos de rotura de los posibles reordenamientos pueden ser localizados con mayor exactitud. Así mismo, permite determinar cariotipos complejos y cromosomas no identificables con las técnicas de bandeo (cromosomas marcadores) pero tiene la limitación, como MFISH y SKY, de necesitar células en división. Esta técnica aún está en fase de desarrollo y experimentación por lo cual no existen demasiadas referencias en la literatura .

La hibridación genómica comparada (HGC), también llamada CGH (del inglés, *comparative genomic hybridization*), es una técnica citogenética-molecular que permite detectar cambios numéricos de secuencias de ADN (pérdidas, deleciones, ganancias y amplificaciones) en un tejido tumoral. Dicha técnica se basa en la hibridación in situ del ADN tumoral y de un ADN control marcados con fluorocromos de distinto color sobre metafases normales. Después de la

hibridación, las variaciones numéricas del ADN tumoral se cuantifican mediante el coeficiente de intensidad de fluorescencia entre el ADN tumoral y el ADN normal. La HGC tiene particular interés en el análisis de cambios numéricos de secuencias de ADN en tumores sólidos y en neoplasias hematológicas de índice proliferativo bajo ya que para la realización de la técnica no es necesaria la obtención de metafases. Así mismo, es de gran utilidad en aquellos casos que presentan cariotipos complejos con numerosos cromosomas marcadores, dobles diminutos y regiones de tinción homogénea. Esta técnica únicamente detecta cambios presentes en una proporción elevada de células tumorales (50%). Por otra parte, no permite detectar translocaciones, inversiones y otras alteraciones de tipo equilibrado que no comportan ganancias o pérdidas de material genético.

La realización de estas técnicas requiere de un sofisticado y caro soporte informático, por lo que su realización de forma rutinaria supone un gasto importante. En el momento actual, su uso debería regirse por una estrategia razonada, y aplicarse únicamente en casos muy concretos (Tabla 3).

Conclusión

Los resultados citogenéticos son importantes porque no sólo son indispensables para el diagnóstico de una enfermedad neoplásica hematológica o tumor sólido, sino también por su información de cara al valor pronóstico.

Aún existen muchas alteraciones cromosómicas que no se correlacionan con unas características clínicas determinadas. Por ello, es indispensable una completa historia clínica con el fin de determinar la correlación entre el cambio cromosómico y el curso de la enfermedad.

En los últimos años, la introducción de las técnicas de hibridación *in situ*, ha representado un complemento importante para las técnicas citogenéticas convencionales. En aquellos casos en los que el índice mitótico de las células leucémicas es bajo (por ejemplo, en la LLC), y se quiere descartar una alteración numérica (por ejemplo, la trisomía 12), se puede utilizar una sonda centromérica del cromosoma que se quiere estudiar, y así se puede determinar, sin la necesidad de realizar un cultivo celular ni obtener células en metafase, las copias que existen de un determinado cromosomas mediante el recuento de las señales de hibridación en los núcleos. En otros casos, si la calidad de los

cromosomas y de las bandas no es satisfactoria, se pueden aplicar sondas de secuencia única o un conjunto de sondas para el "pintado" de un cromosoma en concreto, y determinar la existencia de una alteración cromosómica que mediante la citogenética convencional no se puede asegurar.

Por otro lado, el desarrollo de técnicas moleculares ha introducido una nueva dimensión en el estudio y comprensión del papel de los cambios cromosómicos en la génesis del tumor, por lo que en un futuro próximo los citogenetistas y los genetistas moleculares deberán trabajar coordinados para aportar una mayor información sobre el origen y desarrollo del cáncer. En estos momentos es muy importante la colaboración entre la citogenética y la biología molecular, con el fin de encontrar un mayor número de regiones genómicas que puedan ser candidatas de tener actividad oncogénica .

Tabla 1. Ventajas y limitaciones de la técnica de citogenética convencional y de hibridación in situ

| TÉCNICA | VENTAJAS | LIMITACIONES |
|----------------------------------|---|--|
| Citogenética convencional | <p>Aporta información de todos los cromosomas</p> <p>Bajo coste económico</p> | <p>Requiere células en división del clon neoplásico</p> <p>Interpretación dificultosa en caso de obtener cromosomas de mala calidad</p> <p>Permite el análisis de pocas células</p> <p>Baja sensibilidad</p> |
| Hibridación in situ | <p>Aplicable tanto sobre metafases como sobre núcleos en interfase</p> <p>Permite el análisis de un mayor número de células</p> <p>Mayor sensibilidad</p> | <p>Aporta información concreta dependiendo del tipo de sonda utilizada</p> <p>Alto coste económico</p> |

Tabla 2. Tipos de sondas utilizadas en HIS “convencional”. Visualización en metafase e interfase.

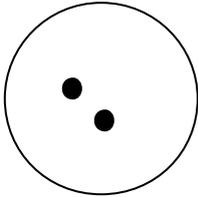
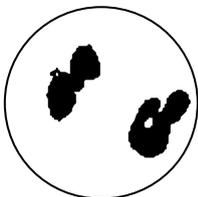
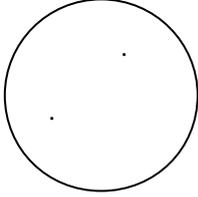
| | METAFASE | INTERFASE |
|--|---|---|
| SONDAS CENTROMÉRICAS |  |  |
| SONDAS DE PINTADO CROMOSÓMICO |  |  |
| SONDAS DE SECUENCIA ÚNICA O DE LOCUS ESPECÍFICO |  |  |

Tabla 3. Ventajas e inconvenientes de las técnicas de hibridación in situ “convencionales” y de las nuevas técnicas de hibridación in situ.

| | VENTAJAS | INCONVENIENTES |
|---------------------------------------|---|---|
| HIS CENTROMÉRICA | . No requiere células en división | . Solo informa de alteraciones numéricas |
| HIS DE LOCUS ESPECÍFICO | . No requiere células en división | . Solo informa del locus que se estudia |
| HIS DE PINTADO CROMOSÓMICO | .Muy útil para descifrar cariotipos complejos | .Requiere células en división .Solo informa del cromosoma concreto que se analiza |
| HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA | . Requiere una pequeña cantidad de ADN. No requiere células en división .Permite estudiar material archivado (congelado, en parafina) .Permite detectar ganancias y pérdidas de ADN en todo el genoma | .Solo se detectan alteraciones citogenéticas que impliquen ganancias y pérdidas de ADN .Requiere una infiltración tumoral mínima del 50% .No permite cuantificación de las ganancias o pérdidas .No detecta ganancias de ADN menores de 4-5 Mb ni pérdidas de 10-20 Mb |
| MULTICOLOR FISH-SKY | .Permite obtener información de todos los cromosomas .Muy útil para descifrar cariotipos complejos | .Requiere células en división .No detecta alteraciones estructurales dentro de un mismo par cromosómico .No detecta alteraciones estructurales de ADN menores de 500-1500 Kb |
| MULTIBANDING FISH | .Permite obtener información de todos los cromosomas .Muy útil para descifrar cariotipos complejos .Detecta alteraciones estructurales dentro de un mismo par cromosómico | .Requiere células en división .No detecta alteraciones estructurales de ADN menores de 500-1500 Kb |

Tabla 4. Recomendaciones respecto al número de células a analizar, los individuos controles a realizar y los niveles de corte para las sondas centroméricas, de locus específico y de pintado cromosómico.

| | NUMERO DE CÉLULAS ANALIZADAS | CONTROLES | NIVELES DE CORTE ($\bar{x} \pm 3SD$)* |
|--|---|------------------|--|
| SONDAS CENTROMÉRICAS | 500 | 10 | Monosomías >10% Trisomías >5% |
| SONDAS DE LOCUS ESPECÍFICO | 100 | 10 | Deleciones >10% Ganancias >5% Alteraciones Estructurales >5-10% |
| SONDAS DE PINTADO CROMOSÓMICO | 10 | No requiere | Mínimo dos metafases con la misma alteración |

*A considerar por cada Laboratorio