

PATOLOGÍA MOLECULAR Y CITOLOGÍA. APLICACIONES DEL FISH EN LA CITOLOGIA NO GINECOLOGICA

María Dolores Lozano

Departamento de Anatomía Patológica.

Clínica Universitaria. Universidad de Navarra. Pamplona.

En los albores del siglo XXI, parece claro que existe una creciente demanda de obtener más información de menor muestra, lo cual abre la puerta a la aplicación de nuevos métodos en el estudio del material citológico. Las aplicaciones del FISH, PCR, microchips, arrays, etc., van avanzando como avanzan los conocimientos genéticos de las enfermedades. Los citopatólogos no están al margen de estos avances, puesto que se nos pide más con menor muestra. Hoy día, la integración entre patología quirúrgica y citopatología es algo inevitable. Aunque todavía existen patólogos escépticos, el auge en la demanda de la citología y la ampliación de la esfera de influencia de las dos subespecialidades han ido gradualmente borrando la barrera que separa la patología quirúrgica de la citopatología.

De entre las muchas aplicaciones de técnica moleculares a la citología, en esta charla se expondrá preferentemente las aplicaciones del FISH a la citología no ginecológica.

El FISH es una técnica de citogenética molecular, que utiliza un ADN sonda marcado con fluorescencia, con el fin de localizar una secuencia complementaria en el ADN de la muestra de interés. Es una técnica muy sensible y específica, que permite analizar metafases y células en interfase.

Existen varios tipos de sondas para FISH, cada una con una función específica según lo que se desea detectar (figuras 1 y 2).

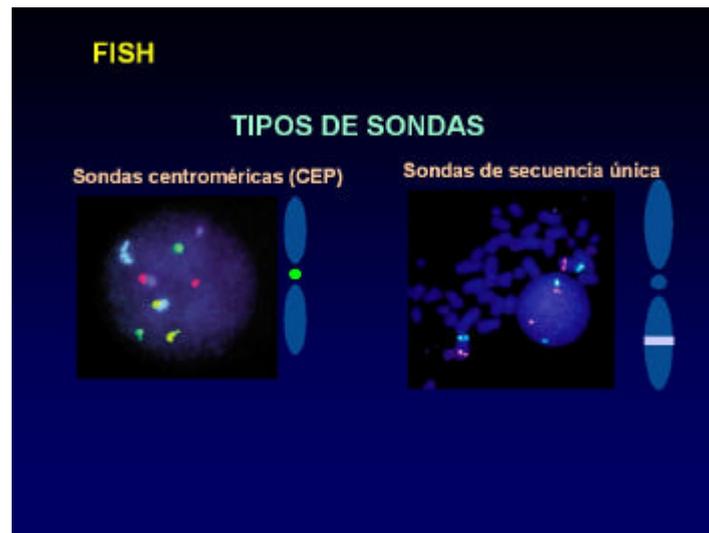


Fig. 1



Fig. 2

Las principales aplicaciones del FISH son:

- Detección de alteraciones numéricas y estructurales.
- Detección de cromosomas marcadores.
- Seguimiento de un seguimiento de trasplante.
- Cuantificación de las células alteradas.

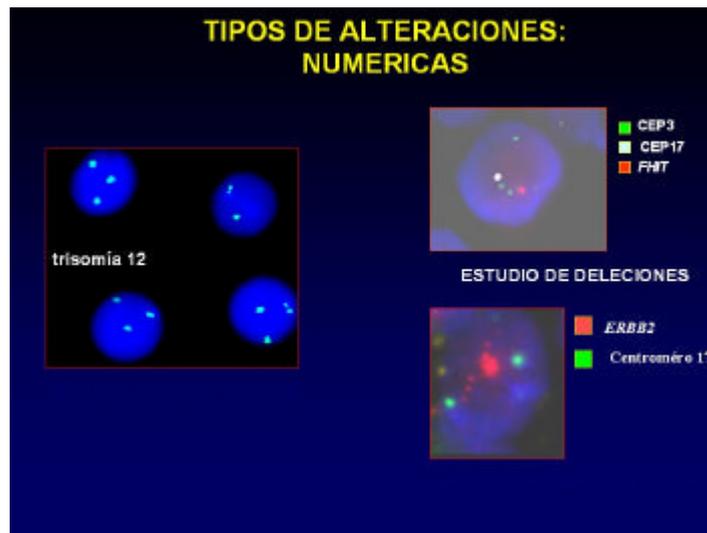


Fig. 3



Fig. 4

En las figuras 3 y 4 se muestran ejemplos de estas aplicaciones.

El FISH, como cualquier otra técnica tiene una serie de ventajas y también limitaciones. Las principales ventajas del FISH son las siguientes:

- Puede ser realizado en metafases con núcleos en interfase.
- Permite el uso de material congelado, material incluido en parafina y material citológico.
- Es una técnica rápida.
- Tiene gran sensibilidad y especificidad.

Las limitaciones más importantes del FISH son éstas:

- Es una técnica de screening.
- Es necesario conocer lo que buscamos.

- El coste económico en ocasiones puede ser elevado.
- No se pueden detectar muchas alteraciones al mismo tiempo (5 fluorocromos).

Además de las diversas aplicaciones del FISH a la citología no ginecológica, existen también aplicaciones definidas a la citología ginecológica, algunas de ellas están siendo establecidas. Sin embargo es frecuente encontrar en la literatura artículos recientes que comunican aplicaciones diversas del FISH a distintas muestras citológicas.

Las aplicaciones más frecuentes se resumen en la Fig. 5.



Fig. 5

Diagnóstico prenatal

Hoy el día el FISH se utiliza para el diagnóstico prenatal de numerosas alteraciones. En el ámbito de la citología del FISH puede realizarse en células de líquido amniótico y este estudio es relativamente frecuente para la detección del síndrome de Down (Fig. 6).

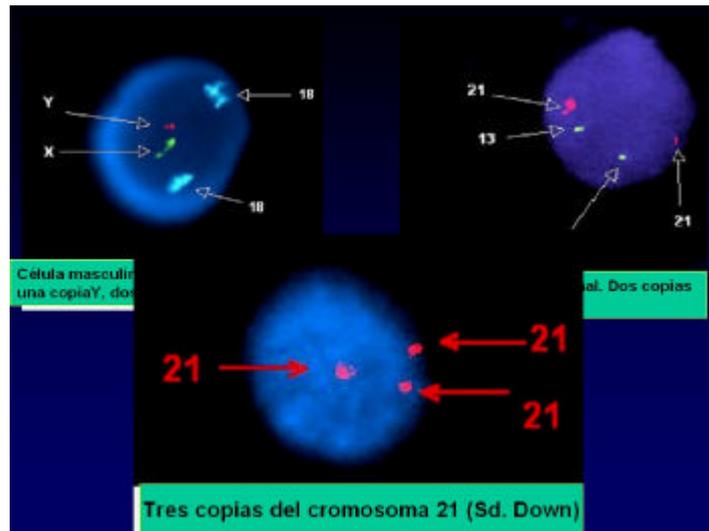


Fig. 6

Determinación del estado del gen HER-2-Neu en carcinomas de mama

Varias referencias en la literatura ratifican la utilidad del FISH para el análisis del gen *Cerb-B2-Neu* y del cromosoma 17, tanto en muestras de punción aspiración de tumores de mama, como en muestras de lavado ductal y de secreción por pezón (Fig. 7).

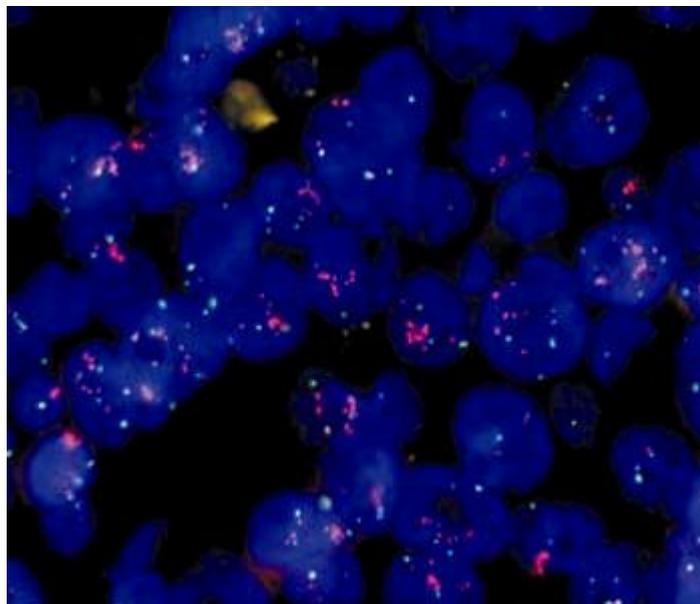


Fig. 7

Diagnóstico del carcinoma de urotelio y recidivas (UROVISION FISH TEST)

Existe un porcentaje no muy alto pero no despreciable de falsos negativos en la citología de orina en cuanto al diagnóstico de tumores de urotelio. Por otro lado la cistoscopia que sería recomendable, es un procedimiento invasivo. La medicina actual busca métodos más sensible, menos invasivos e

idealmente cuantitativos, para la detección de tumores. Por otro lado es conocido que la sobreexpresión de cromosoma 7, 9, 11 y 17, se relaciona con la agresividad tumoral y la fase de invasión de los tumores de urotelio. Las monosomías del cromosoma no están relacionadas con la recidiva, por lo tanto está condicionado al desarrollo de sondas para FISH en muestras de orina.

El test de Urovision (Vysis/ABBOTT) detecta aneuploidias en los cromosomas 3, 7 y 17, y pérdidas del 9p21. Para ello utiliza sondas centroméricas específicas para los cromosomas 3,7 y 17 y sonda locus específica para el 9p21/p16. Una de las aplicaciones más importantes y con mejores de resultados de este test se obtiene en citología líquida (ThinPrep). (figuras 8 y 9).

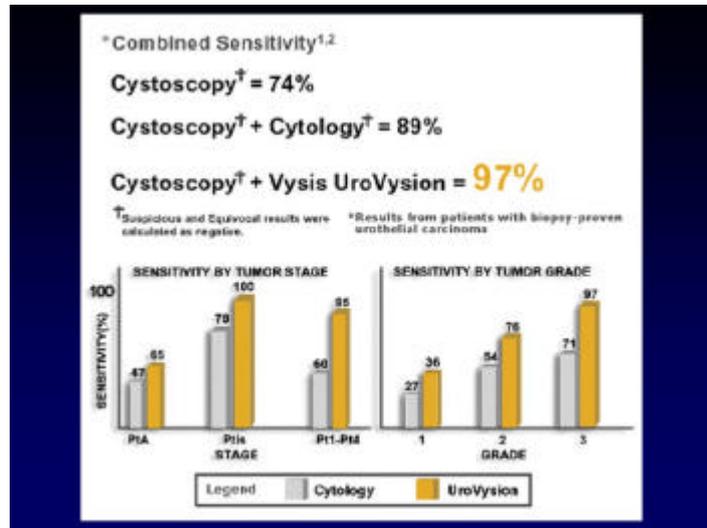


Fig. 8

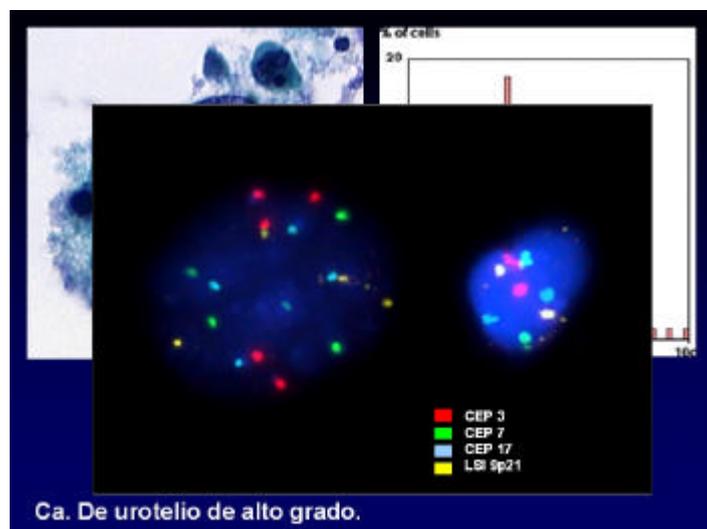


Fig. 9

Es importante a la hora de la aplicación de esta técnica a muestras citológicas la calidad del material, puesto que ésta es uno de los factores más importantes que afectan a la eficiencia de la hibridación y la intensidad de la reacción. La densidad celular no debe ser demasiado alta y las células deben estar distribuidas de manera homogénea en todo el porta. De ahí el valor de la citología en medio líquido que permite una fijación adecuada del material y la posibilidad del fondo limpio (Fig. 10).

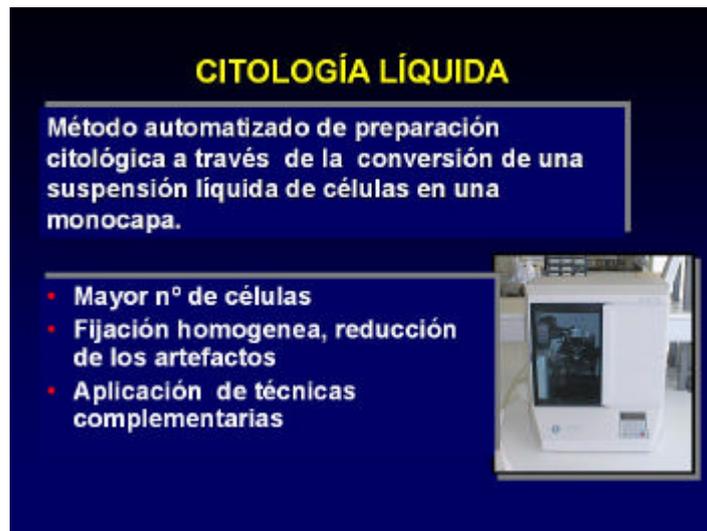


Fig. 10

Otras aplicaciones: detección de carcinoma de pulmón en lavados bronquiales

Existen referencias en la literatura de la aplicación de sondas centroméricas para el cromosoma 1 y sondas de secuencia única frente a los locus 5c15, 8q24 (c-myc) y 7p12 (EGFR), aplicadas a células de lavado bronquial. Básicamente estos trabajos muestran una mayor sensibilidad del FISH a la hora de detectar células tumorales y proponen esta técnica como técnica complementaria al estudio citológico del lavado bronquial.

Nosotros en el marco de dos proyectos internacionales, uno de ellos un proyecto financiado por la Unión Europea, (EU.ELGDG PORYECT), y otro proyecto internacional (I -ELCAP) de detección precoz del cáncer de pulmón, estamos aplicando técnicas de FISH en lavados bronquiales de estos pacientes. (Fig. 11)

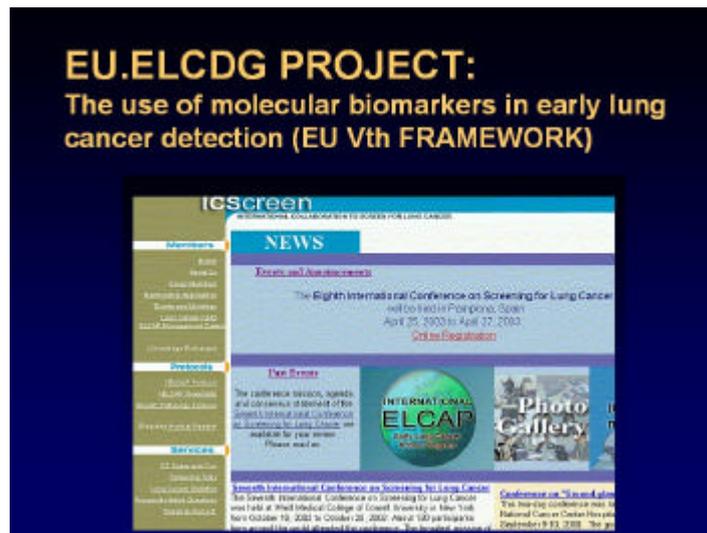


Fig. 11

Las figuras 13 y 14 muestran dos ejemplos de dos de estos pacientes. Además estamos involucrados en el desarrollo de biomarcadores para la detección precoz del carcinoma de pulmón, lo cual siempre debe basarse en muestras de fácil obtención como el esputo y el lavado bronquial.

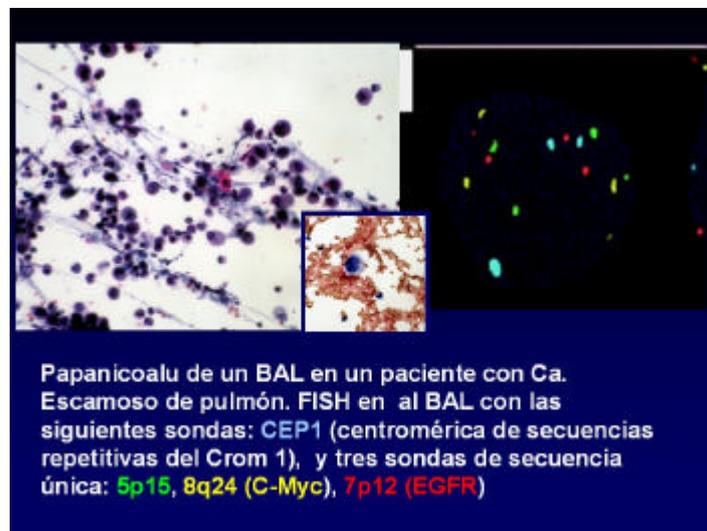


Fig. 12

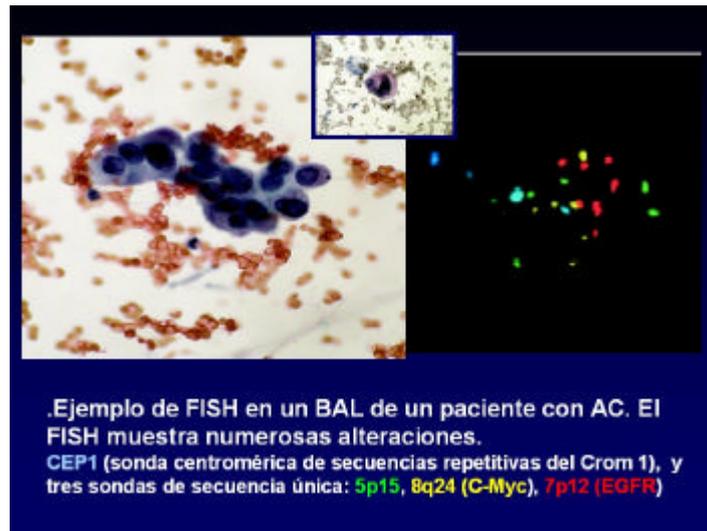


Fig. 13

Algunos autores (Mao et al, 1954, Liloglou et al, 2001), han demostrado alteraciones de microsatélites y de oncogenes tales como k-rash-153 en esputos de pacientes con estadios iniciales de cáncer de pulmón. Por otro lado Palmisano y colaboradores, en el año 2000, han demostrado una metilación aberrante del promotor de c-16 en DNA aislado de muestras de esputo de pacientes con carcinoma escamoso tres años antes del diagnóstico clínico del tumor. En este sentido, estamos estudiando genes localizados en el brazo corto del cromosoma 3, que aparecen alterados en el cáncer de pulmón (Fig. 14).

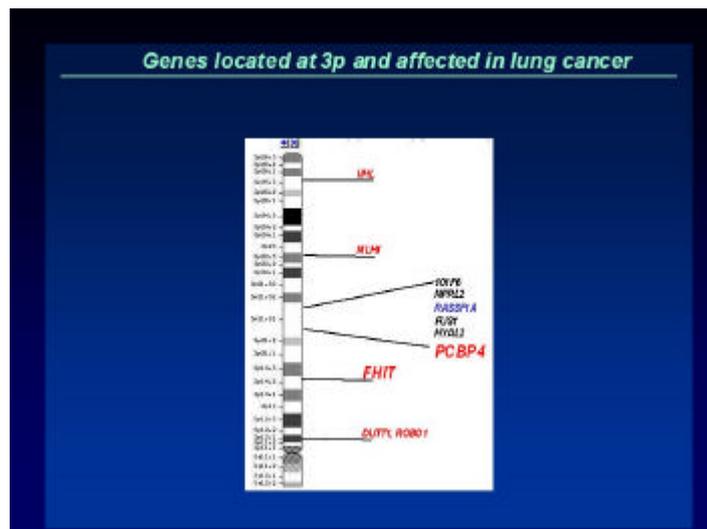


Fig. 14

Además, otro de los objetivos de estos proyectos es la búsqueda de biomarcadores específicos del tumor y correlacionarlo además con las muestras tisulares. (Fig. 15).

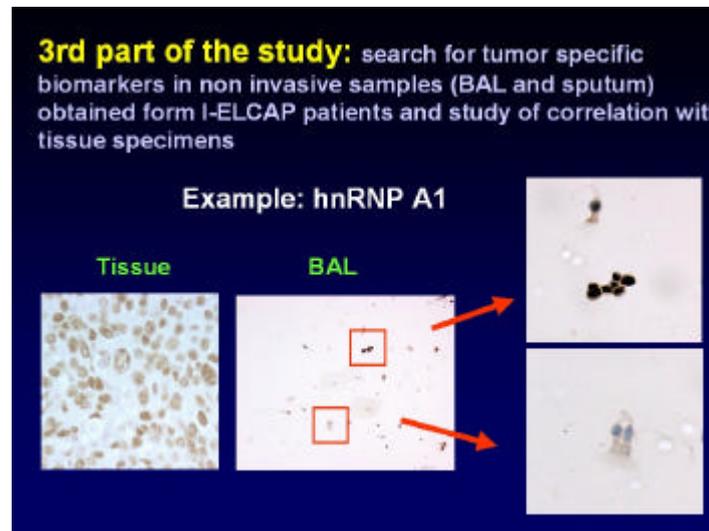


Fig. 15

Puesto que ninguno de los biomarcadores actualmente en uso en la detección precoz del cáncer de pulmón ha sido validado, I-ELCAP y otros proyectos son grandes oportunidades para hacer estudios de la hibridación de biomarcadores con costos razonables. Todo esto nos lleva en primer lugar a estudiar alteraciones moleculares que se producen durante la carcinogénesis de cara a identificar y buscar nuevos marcadores. En segundo lugar debemos definir la utilidad diagnóstica de estas alteraciones moleculares y su detección en muestras de fácil extensión, como pueden ser sangre periférica, esputo y/o lavados bronquiales. Por último, todo esto conlleva un desarrollo tecnológico adecuado para que estas alteraciones en biomarcadores puedan ser puestas de manifiesto. Como es sabido en estas técnicas influyen multitud de factores. Las figuras 16, 17, 18, 19, 20 y 21 muestran diversos ejemplos en los que en ocasiones la técnica ha sido realizada con éxito



Fig. 16

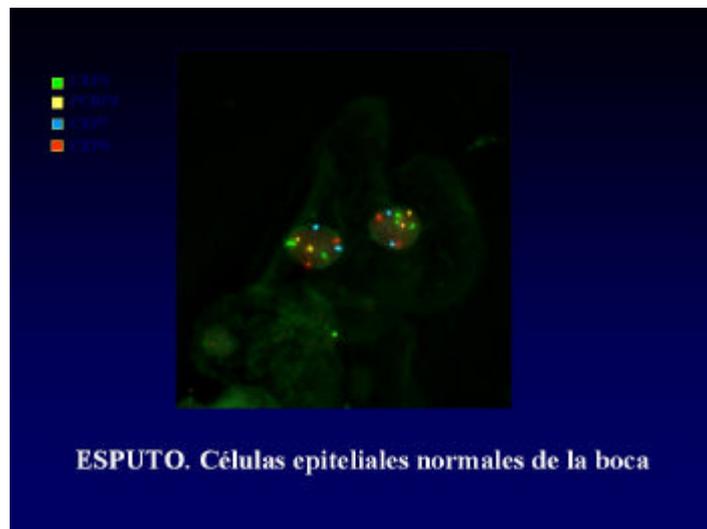


Fig. 17



Fig. 18

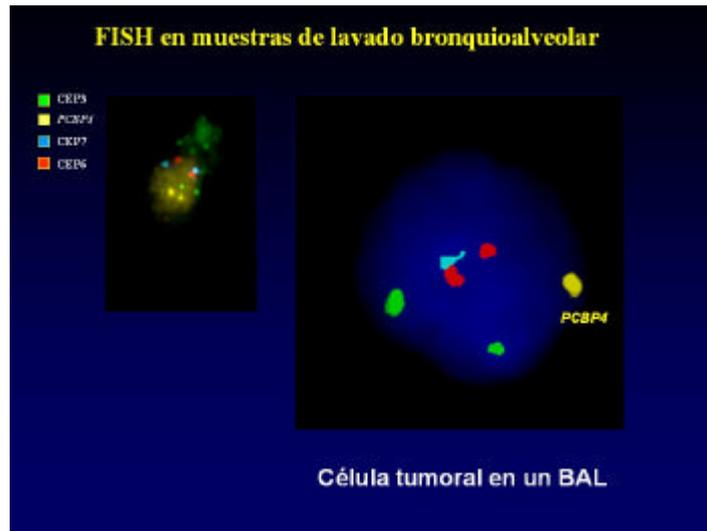


Fig. 19

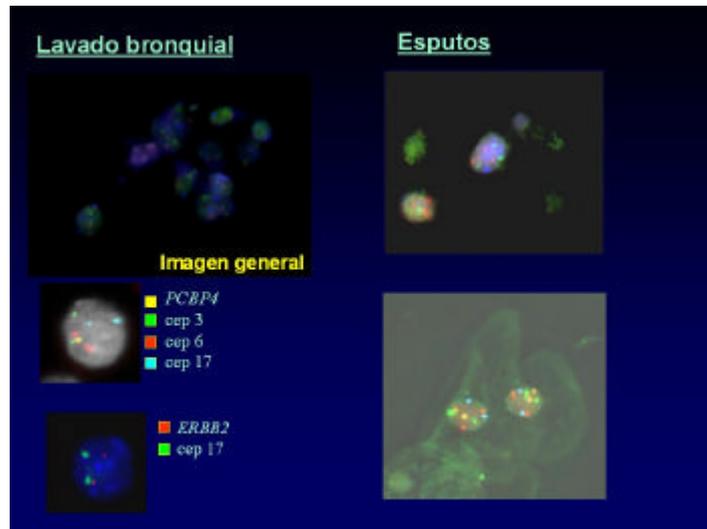


Fig. 20

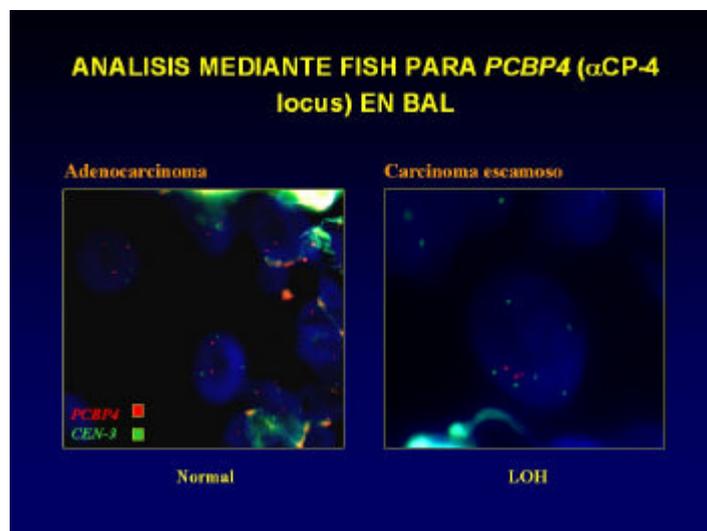


Fig. 21

y en otras no, debido a alteraciones en la fijación, fondo, etc. (figuras 22 y 23).

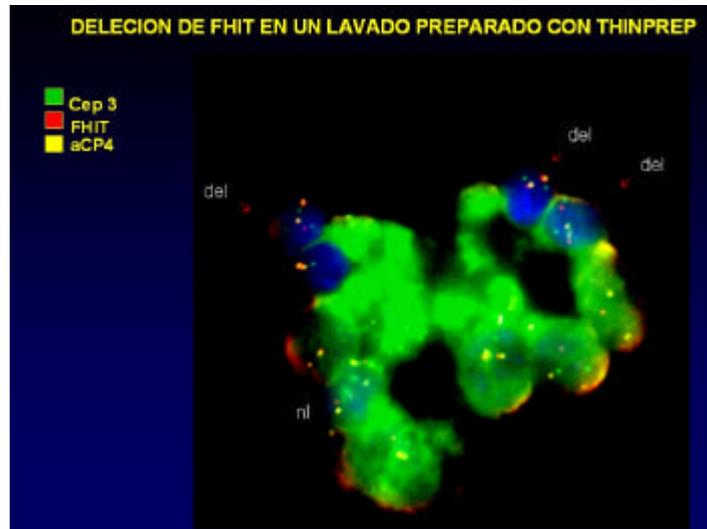


Fig. 22

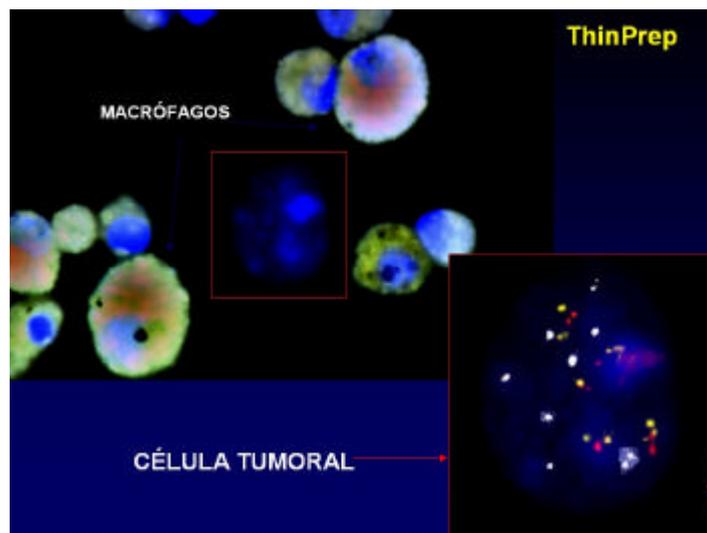


Fig. 23

Un paso más en nuestra investigación es el desarrollo de la técnica de FICTION que permite el análisis simultáneo de la citomorfología inmunofenotipo en balances cromosómicos (Fig. 24).

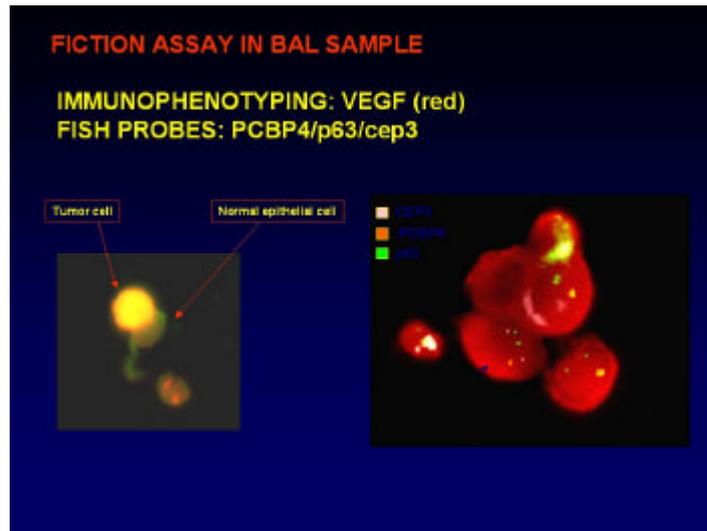


Fig. 24

Además de todas estas aplicaciones, día a día aparecen en la literatura otras nuevas, como son la utilidad del FISH en líquidos pleurales y peritoneales de cara a la detección de células tumorales, su utilidad para el estudio de sarcomas y otras muchas alteraciones, como el ejemplo el esófago de Barrett. La citología es capaz de aprovechar todas las técnicas complementarias que se aplican al material de biopsia.