

## FICTION convencional y multicolor como herramientas para el estudio interdisciplinar de las neoplasias hematológicas

### *Conventional and multicolor FICTION as tools for the interdisciplinary study of hematological neoplasms*

I. Martín-Subero<sup>1</sup>, R. Siebert<sup>1</sup>, M.J. Calasanz<sup>2</sup>

#### RESUMEN

Las técnicas interdisciplinarias que permiten la caracterización fenotípica y genotípica de las células tumorales se están estableciendo como herramientas importantes para el diagnóstico e investigación de las neoplasias hematológicas, y de los tumores malignos en general. Uno de estos métodos es la técnica de FICTION (*Fluorescence Immunophenotyping and Interphase Cytogenetics as a Tool for the Investigation of Neoplasms*; Inmunofenotipaje fluorescente y citogenética en interfase como herramienta para la investigación de las neoplasias). Esta técnica permite el estudio simultáneo de los aspectos morfológicos básicos, así como de marcadores inmunofenotípicos y genéticos de las células tumorales. Sin embargo, el número de marcadores estudiados mediante la técnica de FICTION en un único ensayo están limitados por el escaso número de sustancias fluorescentes utilizadas. Recientemente se ha desarrollado la variante multicolor denominada M-FICTION, que además de estudiar la morfología y el inmunofenotipo celular, permite la detección de múltiples alteraciones genéticas en un solo experimento. En la presente revisión, presentamos un resumen detallado de las técnicas de FICTION convencional y M-FICTION, y discutimos sus múltiples aplicaciones en el campo de las neoplasias hematológicas.

**Palabras clave.** FICTION. Marcaje multicolor. Neoplasias hematológicas.

#### ABSTRACT

Interdisciplinary technologies allowing a comprehensive characterization of cancer cells are becoming increasingly important in the routine diagnostics and research of hematological neoplasms, and in malignancies in general. One of those methods is the FICTION technique (*Fluorescence Immunophenotyping and Interphase Cytogenetics as a Tool for the Investigation of Neoplasms*). This technique allows the simultaneous study of the basic morphology as well as immunophenotypic and genetic markers of tumor cells. However, the low number of fluorescent substances utilized in a single assay restricts the number of markers that can be studied by FICTION. Recently, a multicolor variant has been developed and termed M-FICTION which in addition to cellular morphology and immunophenotype allows the investigation of multiple chromosomal aberrations in only one assay. In the present review, we present a detailed overview on the conventional and multicolor FICTION techniques and we discuss their multiple applications in the field of hematological neoplasms.

**Keywords.** FICTION. Multicolor labeling. Hematological neoplasms.

ANALES Sis San Navarra 2002; 25 (3): 289-304.

1. Instituto de Genética Humana. Hospital Universitario de Kiel. Kiel, Alemania.
2. Departamento de Genética. Universidad de Navarra. Pamplona.

Aceptado para su publicación el 4 de septiembre de 2002.

#### Becas y ayudas a la investigación

La tesis doctoral de Iñaki Martín Subero ha sido subvencionada por el Gobierno de Navarra y por la Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra. Los estudios realizados en Kiel han recibido apoyo económico del Interdisziplinäre Zentrum für Klinische Krebsforschung (Centro Interdisciplinar para la Investigación Clínica del Cáncer) del Hospital Universitario de Kiel.

#### Correspondencia

Iñaki Martín-Subero, PhD  
Institute of Human Genetics  
University Hospital Kiel  
Schwanenweg 24  
D-24105 Kiel  
Germany  
Tfno. 49 431 597-1789  
Fax 49 431 597-1880  
E-mail: imartin@medgen.uni-kiel.de

## INTRODUCCIÓN

El diagnóstico y clasificación de los tumores ha evolucionado enormemente durante los últimos 50 años. Los linfomas, debido a su gran heterogeneidad clínica y biológica representan el paradigma de dicha evolución. Las clasificaciones iniciales de los linfomas se basaban principalmente en el comportamiento clínico de la enfermedad y en aspectos celulares meramente morfológicos<sup>1,2</sup>. Sin embargo, durante las dos últimas décadas, los estudios inmunohistoquímicos y genéticos, y su correlación con los parámetros clínicos clásicos, han derivado en una nueva era en el diagnóstico y clasificación de los linfomas<sup>3,4</sup>. En la actualidad, el diagnóstico de los linfomas –y en general de los tumores– se basa en cuatro aspectos principales, por un lado los parámetros clínicos del paciente, y por otro lado las tres características típicas de la biopsia celular: la morfología tisular y celular, la expresión de determinados antígenos y las alteraciones genéticas<sup>4</sup>. Cada una de estas tres especialidades de laboratorio ha ido avanzando por separado durante décadas y su importancia relativa en el diagnóstico diferencial depende del tipo de tumor. Por ejemplo, las translocaciones del gen MYC representan el “gold standard” para el diagnóstico del linfoma de Burkitt<sup>5</sup>.

Hoy día es mucha la información adquirida desde cada una de estas ramas, lo cual ha desencadenado un fenómeno de enfoque interdisciplinar, más completo y objetivo. Los especialistas de cada área, lejos de considerar su especialidad como la más válida, han comenzado un proceso de apertura y unión para lograr una mayor comprensión de la compleja biología y comportamiento clínico del cáncer<sup>6,7</sup>.

En relación con este enfoque integral, la aplicación y desarrollo de técnicas que correlacionen en un mismo experimento los aspectos morfológicos, inmunohistoquímicos y genéticos de las células tumorales proporcionarán sin duda una mejora cualitativa en el diagnóstico y la investigación del cáncer.

## TÉCNICAS QUE COMBINAN ASPECTOS FENOTÍPICOS Y GENOTÍPICOS

En 1992, el doctor Weber-Matthiesen y sus colaboradores del Instituto de Genética Humana de la Universidad de Kiel (Alemania) desarrollaron una técnica de estudio interdisciplinar que denominaron FICTION (*Fluorescence Immunophenotyping and interphase Cytogenetics as a Tool for the Investigation Of Neoplasms*; inmunofenotipaje fluorescente y citogenética en interfase como herramienta para la investigación de las neoplasias)<sup>8</sup>. Este método se basa en la combinación en un solo experimento de la detección de antígenos celulares mediante inmunofluorescencia y la detección de alteraciones cromosómicas mediante la técnica de FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*; hibridación *in situ* con fluorescencia). Por lo tanto, la técnica de FICTION permite la visualización simultánea del genotipo y el inmunofenotipo bajo el microscopio de fluorescencia.

Además de la técnica de FICTION, se han desarrollado otras técnicas de estudio interdisciplinar. Entre ellas, cabe citar la técnica de FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*; separación de células activadas por fluorescencia)-FISH<sup>9</sup>, la técnica MAC (*Morphology-Antibody-Chromosome*; morfología-anticuerpo-cromosoma)<sup>10</sup> y la técnica ICC (*Immunocytochemistry*, inmunocitoquímica)-(F)ISH<sup>11,12</sup>. La técnica de FACS-FISH se basa en la separación de una determinada subpoblación celular –que expresa un determinado antígeno– mediante citometría de flujo y la posterior aplicación de la técnica de FISH en las células aisladas. La técnica MAC permite el estudio de alteraciones citogenéticas de una determinada subpoblación celular. Esto es posible porque en el proceso de preparación de los cromosomas se utiliza un choque hipotónico suave que retiene parcialmente el citoplasma y la membrana celular. Así, se puede realizar una inmunocitoquímica que detecte las metafases pertenecientes a una determinada subpoblación celular y estudiar las alteraciones cromosómicas que presenta. Esta técnica está en desuso hoy día debido a que las metafases obtenidas no son de calidad

suficiente para reconocer y caracterizar los cromosomas con precisión. Por último, la técnica de ICC-(F)ISH se basa en la realización secuencial de una ICC y la técnica de ISH (detección con cromógenos) o FISH (detección con fluorocromos). Esta técnica, por lo general, no permite la visualización simultánea del inmunofenotipo y las alteraciones genéticas, sino que después de la ICC se anotan las coordenadas de las células de interés y posteriormente se realiza la hibridación *in situ*.

La técnica de FICTION presenta varias ventajas respecto a los otros tres métodos de estudio interdisciplinar citados, lo que la hace la más apropiada para el diagnóstico e investigación tumorales. En comparación con la técnica de FACS-FISH, el FICTION no requiere el uso de un citómetro que separe células, donde la separación nunca es al 100% y esto puede crear problemas en determinados casos. Por ejemplo, Gahn y col publicaron en 1997 que la trisomía 12 aparecía en células CD34+ de pacientes con leucemia linfática crónica de células B (LLC-B)<sup>12</sup>. Dos años después, los mismos autores se retractaron y publicaron, esta vez mediante FICTION, que sus descubrimientos iniciales eran un artefacto de la técnica de FACS-FISH<sup>13</sup>. En comparación con el análisis secuencial de la técnica de ICC-(F)ISH, el FICTION es más rápido ya que permite la visualización simultánea de la morfología, el inmunofenotipo y las alteraciones genéticas, evitando la costosa relocalización de células<sup>14,15</sup>. En comparación con los métodos cromogénicos (ICC-ISH), el FICTION aplica filtros diferentes para evaluar las señales fluorescentes, evitando así los problemas para reconocer diferentes precipitados químicos debido a su bajo contraste de color y permitiendo el desarrollo de métodos multicolores (como se verá más adelante). En comparación con los otros tres métodos, el FICTION es mucho más rápido ya que se pueden obtener resultados en menos de 24 horas.

#### FUNDAMENTO TÉCNICO DE LA TÉCNICA DE FICTION

La técnica de FICTION, como ya se ha comentado, está basada en la combina-

ción de dos métodos de uso regular en los laboratorios de diagnóstico tumoral: la inmunofluorescencia y la técnica de FISH en núcleos interfásicos. El primero de estos dos métodos convencionales se basa en la utilización de anticuerpos para detectar la presencia de determinados antígenos celulares, y por lo tanto permite estudiar la expresión de ciertas proteínas asociadas a las células neoplásicas. A diferencia de la inmunohistoquímica, donde la detección de la unión antígeno-anticuerpo se realiza mediante una reacción enzimática que produce un precipitado coloreado, la inmunofluorescencia utiliza anticuerpos secundarios marcados con una sustancia fluorescente. El segundo método citado, la técnica de FISH, se basa en la utilización de sondas de ADN específicas que se unen –o hibridan– con su región complementaria del ADN celular. Como el ADN “sonda” está marcado con fluorescencia, la hibridación produce señales fluorescentes en las regiones del núcleo celular donde la sonda se ha unido. Por ejemplo, si utilizamos una sonda específica para el cromosoma 12, el núcleo de una célula con trisomía 12 exhibirá tres señales fluorescentes. La técnica de FISH, dependiendo del diseño de la sonda utilizada, permite la detección de un gran número de alteraciones cromosómicas. Estas pueden ser tanto equilibradas, como translocaciones o inversiones, o no equilibradas, como aneusomías, deleciones, duplicaciones o amplificaciones. Para la detección de translocaciones, se aplican dos tipos de ensayos dependiendo de la naturaleza de dichos reordenamientos cromosómicos. Si una translocación afecta siempre los mismos genes, p. ej. la t(9;22) en la leucemia mieloide crónica, el ensayo de FISH más fiable contendrá dos sondas marcadas diferencialmente (normalmente rojo y verde) que cubran los puntos de rotura en ambos genes, *ABL* y *BCR* respectivamente. Así, en células negativas para la t(9;22) aparecen dos señales rojas y dos señales verdes aisladas; pero si una t(9;22) tiene lugar, el patrón de señales de hibridación será: una señal roja y una señal verde aisladas que representan los alelos no reordenados, y dos señales de fusión rojo/verde que representan la fusión *BCR/ABL* y su recíproca *ABL/BCR* en

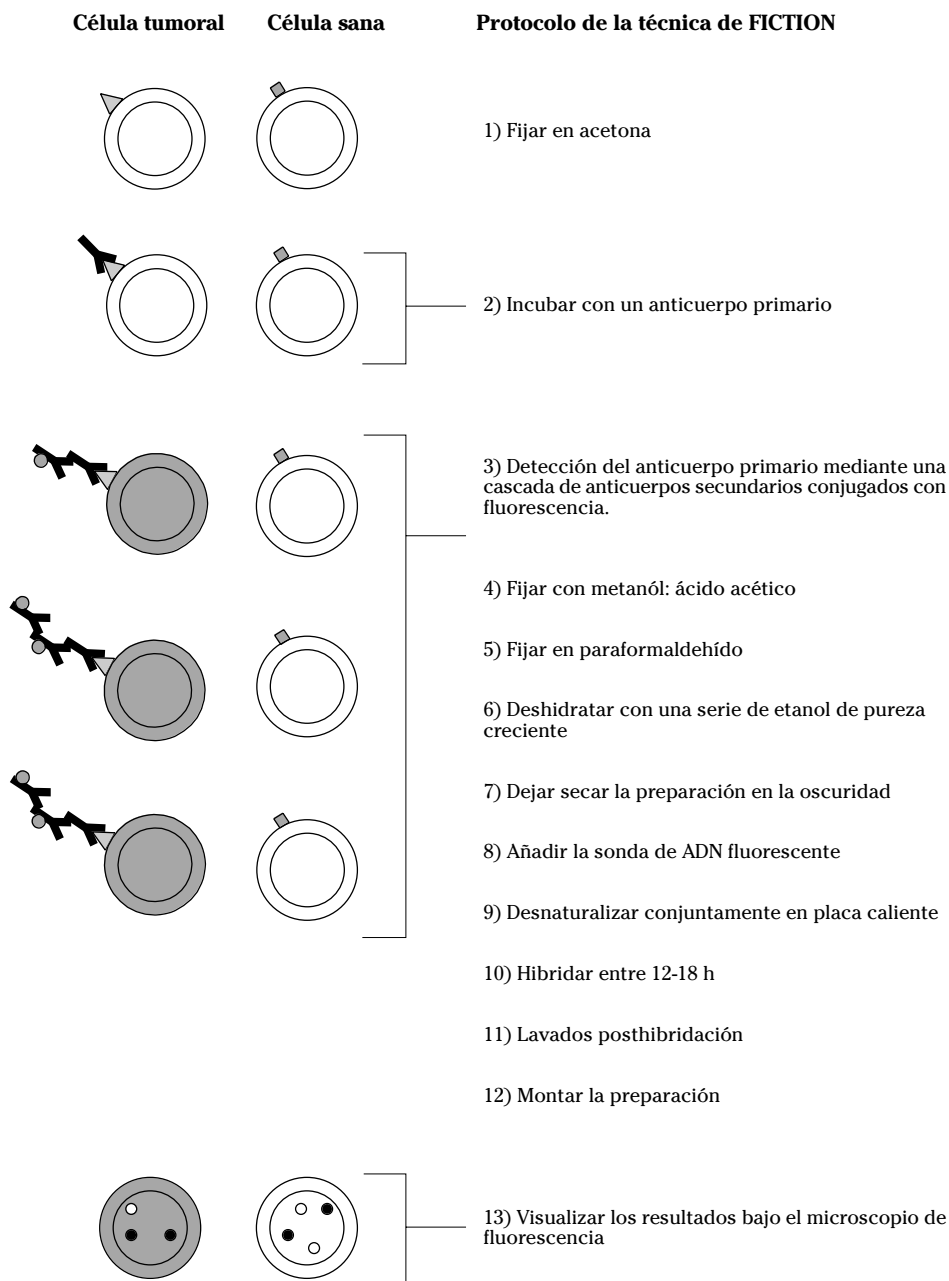
ambos cromosomas implicados en la translocación. En cambio, cuando un gen se transloca con varios genes pareja, p. ej., los genes *IGH*, *TCRA/D* o *ALK*, como veremos más adelante, el ensayo de FISH ideal debería contener dos sondas marcadas diferencialmente (rojo y verde) que flanqueen el punto de rotura en dichos genes. De esta manera, si una célula no contiene una translocación, por ejemplo del gen *ALK*, las señales rojas y verdes aparecen colocalizadas; pero si hay una translocación de dicho gen, independientemente del gen pareja veremos una colocalización roja/verde que representa el alelo no reordenado y una señal roja y una verde aisladas que representan el alelo que ha sufrido la translocación del gen *ALK*<sup>16-19</sup>.

En la figura 1 aparece el protocolo resumido de la técnica de FICTION. La muestra de la que se parte puede ser una preparación de citocentrífuga, un corte de criostato, una impronta celular o una extensión de sangre periférica o médula ósea. El primer paso es realizar una inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo primario para el antígeno que queremos visualizar. La detección de la unión del anticuerpo primario, que generalmente se ha obtenido en ratón, se realiza mediante el uso de anticuerpos secundarios conjugados con la misma sustancia fluorescente, p. ej. Cianina 3 (Cy3, rojo) o amino-metil-coumarin (AMCA, azul). Por ejemplo, estos anticuerpos pueden ser, en el caso del fluorocromo AMCA: de conejo anti-Fc de ratón, de cabra anti-Fc de conejo y de asno anti-Fc de cabra. Una vez realizada la inmunofluorescencia, se observa la preparación bajo el microscopio de fluorescencia utilizando los filtros apropiados. Entonces, se selecciona la región de la preparación que contenga un mayor número de células positivas para el antígeno a detectar. Después, y he aquí uno de los pasos clave de la técnica, se realizan dos fijaciones, una en fijador de Carnoy (metanol: ácido acético en proporción 3:1) y otra en paraformaldehído al 1%. De esta manera se consigue que el inmunofenotipo resista incluso las condiciones agresivas de la técnica de FISH, que se realiza a continuación. Después de la fijación, la preparación se deshidrata y se deja secar en oscuridad para que la fluo-

rescencia no se pierda. Entonces, se añaden 1,5 microlitros de la sonda correspondiente (resuspendida en solución de hibridación) y se coloca un cubreobjetos de 10 mm de diámetro encima cuidando de que no queden burbujas de aire atrapadas debajo del mismo. Seguidamente, se sella el cubreobjetos con solución vulcanizante (p. ej. pegamento de parches para ruedas de bicicleta) y se procede a la desnaturalización simultánea del ADN celular y el ADN de la sonda fluorescente. Este paso es uno de los que más condiciona la calidad del resultado, y debe ser optimizado para cada tipo de sonda y material de partida, pudiendo variar entre 2 y 12 minutos a 70°C. Después, se incuban las preparaciones a 37°C durante 12-18 h y se procede a los lavados posthibridación para eliminar las hibridaciones inespecíficas. Estos lavados se realizan tres veces a 60°C en una solución de 0,1 x SSC. Por último, las preparaciones se montan en un medio protector de las señales fluorescentes (antifade) y se observan al microscopio de fluorescencia equipado con los filtros específicos para los fluorocromos utilizados<sup>8,20-22</sup>.

### APLICACIONES DE LA TÉCNICA DE FICTION EN LAS NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

En las neoplasias mieloides, las técnicas que combinan aspectos fenotípicos y genotípicos han sido predominantemente utilizadas para estudiar la presencia de ciertas alteraciones genéticas en distintas subpoblaciones celulares. De esta manera, alteraciones cromosómicas tales como las deleciones del brazo largo de los cromosomas 20 [del(20q)] y 5 [del(5q)] o las translocaciones t(1;7), t(9;22), t(8;12) y t(3;3) han sido encontradas en varios subtipos de células hematopoyéticas, incluyendo las células progenitoras CD34+. En cambio, las translocaciones t(8;21) y t(15;17), que según la nueva clasificación de tumores hematopoyéticos definen dos subgrupos de leucemias agudas mieloblásticas (LAM)<sup>23</sup> aparecen restringidas a ciertas subpoblaciones celulares<sup>24</sup>. Esta información podría ser importante para predecir el resultado de una autotransplante de células progenitoras. Por ejemplo, si las células progenitoras transplantadas con-



**Figura 1.** Resumen del protocolo experimental de la técnica de FICTION. Obsérvese que en este ejemplo, la célula positiva (izquierda) para el marcador inmunofenotípico tiene una delección del supuesto gen estudiado con la sonda representada como un círculo blanco y que la célula negativa (derecha) para el marcador tiene el patrón normal de señales de hibridación, es decir, dos señales negras y dos blancas. Para una descripción más precisa remitirse a las referencias 8, 20, 21 y 22.

tienen alteraciones cromosómicas, es probable que el trasplante no sea efectivo y lleve a una rápida reaparición del clon maligno. Por el contrario, si las células progenitoras no contienen alteraciones cromosómicas, sería de esperar que el auto-trasplante sea más efectivo. Así, el método de elección para determinar la presencia de alteraciones citogenéticas en las células CD34+ de una muestra de aféresis sería la técnica de FICTION. Mediante este método, si la alteración citogenética primaria del clon celular maligno es conocida, las aféresis podrían ser rápidamente analizadas con una sonda de ADN para dicha alteración cromosómica primaria y un anticuerpo anti CD34.

En neoplasias linfoides, las técnicas que combinan aspectos fenotípicos y genotípicos se han aplicado en varios estudios. Éstos son algunos ejemplos: en la LLC-B, se ha demostrado que las células que contienen la trisomía 12 –alteración frecuente en LLC– son de origen B y la mayoría de las células que proliferan (Ki-67 positivas) también positivas para dicha alteración<sup>25</sup>. En el mieloma múltiple (MM) se ha podido demostrar que las alteraciones citogenéticas aparecen en las células plasmáticas pero no en los linfocitos B. En una enfermedad relacionada con el MM, la gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI), se ha descrito la presencia de varios clones con alteraciones citogenéticas, que no se pudieron correlacionar con la transformación de GMSI a MM<sup>26</sup>.

La técnica de FICTION es especialmente apropiada para el estudio del linfoma de Hodgkin (LH, comúnmente conocido como enfermedad de Hodgkin). El LH es un linfoma de células B atípico, ya que a diferencia del resto de las neoplasias hematológicas, se caracteriza porque la proporción de células tumorales –denominadas células de Hodgkin y Reed-Sternberg (HRS)– se encuentra generalmente entre el 0,1-1% del total de la biopsia ganglionar, siendo el resto un infiltrado de células no tumorales compuesto por linfocitos, eosinófilos, células plasmáticas y fibroblastos<sup>27</sup>. Debido a esta peculiaridad, las técnicas de análisis genético –que analizan la muestra en su conjunto– estudian mayormente la población no tumoral y por lo tanto no son válidas

en este caso. Las células HRS se caracterizan por su peculiar morfología y por expresar los antígenos CD15 y CD30. Mediante la técnica de FICTION, combinando sondas específicas para el centrómero de varios cromosomas con un anticuerpo anti-CD30, se pudo claramente demostrar que las células HRS (CD30+) son las realmente tumorales en el LH, ya que contienen alteraciones cromosómicas clonales, generalmente con cariotipos hiperploides<sup>28</sup>. En cambio, las células del infiltrado celular son genéticamente intactas y se derivan de una intensa reacción inflamatoria. A pesar de este hallazgo, las alteraciones cromosómicas específicas del LH han permanecido durante años en un plano meramente especulativo, y consecuentemente, los oncogenes implicados en la patogénesis del LH no se han descubierto. Esto contrasta con lo conocido en otros linfomas de células B, donde han sido clonados hasta la fecha más de 30 oncogenes<sup>29,30</sup>. Mediante PCR, algunos estudios han descrito la presencia en pacientes con LH de la translocación t(2;5), comúnmente asociada al linfoma anaplásico de células grandes (LACG). Mediante FICTION se pudo demostrar que las células HRS no contienen dicha alteración<sup>31</sup>. La detección mediante PCR de la t(2;5) se ha descrito en individuos sanos<sup>32</sup> y por lo tanto, la positividad en muestras de pacientes con LH se debe a que una baja proporción de las células no tumorales del infiltrado contienen la translocación, sin que esto tenga ningún efecto patogénico. Tan solo recientemente, varios grupos de investigación han empezado a desvelar el trasfondo genético del LH. Por ejemplo, se ha aplicado la técnica de CGH (*Comparative Genomic Hybridization*; hibridación genómica comparada)<sup>33,34</sup> utilizando ADN derivado de células HRS aisladas con un microdisector<sup>35</sup>. En este estudio, se ha descubierto que las regiones cromosómicas más comúnmente afectadas en el LH son las duplicaciones/amplificaciones del brazo corto de los cromosomas 2 (2p, 55% de los casos), 9 (9p, 27%) y 17 (17p, 27%), y del brazo largo del cromosoma 12 (12q, 46%)<sup>36</sup>. Nuestro grupo de investigación, dada la alta frecuencia de ganancias de material genético en 2p, mayormente en la región

cromosómica 2p13-16, se planteó estudiar qué genes podrían estar afectados en dicha alteración. El gen *REL*, un miembro del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B), se localiza en 2p13 y representa un buen candidato a estar implicado en el linfoma de Hodgkin, ya que en esta enfermedad la vía de señalización del NF- $\kappa$ B está constitutivamente activada<sup>37</sup>. Esta activación permite a las células HRS eludir el sistema inmune y evitar la muerte celular por apoptosis<sup>38</sup>. Estudiando una serie de 44 pacientes con LH, descubrimos que el gen *REL* estaba duplicado/amplificado en un 35% de los casos. Además, en dos casos de la misma serie se pudieron observar translocaciones cromosómicas de dicho gen<sup>39</sup>. Otro buen candidato a estar implicado en las amplificaciones de 2p es *BCL11A*, un oncogén recientemente clonado que se localiza a una distancia de 400 Kb (kilobases) de *REL*<sup>40</sup>. En el mismo estudio, descubrimos que *BCL11A* estaba frecuentemente co-amplificado con *REL* pero en un caso descubrimos una amplificación de 2p13 donde el amplicón incluía *REL* pero no *BCL11A*. Este hallazgo nos hace pensar que *REL* es el gen implicado en las amplificaciones de 2p en el LH, y que dicha amplificación posiblemente lleva a una activación constitutiva del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. En la actualidad, nuestro objetivo es combinar un anticuerpo específico para c-rel (la proteína codificada por el gen *REL*) con la sonda para dicho gen, para poder así estudiar la correlación entre las amplificaciones o translocaciones del *REL* con la sobreexpresión de c-rel.

En la tabla 1 se presenta un resumen de las aplicaciones de la técnica de FICTION en las neoplasias hematológicas.

### EJEMPLOS PRÁCTICOS DE LA IMPORTANCIA CLÍNICA DE LA TÉCNICA DE FICTION

Los rasgos clínicos de los casos que se presentan a continuación no están ampliamente documentados; tan solo se describen aquellos que son relevantes para entender la utilidad de la técnica de FIC-

TION en la resolución de una situación concreta.

#### Caso clínico 1

Después de seis años de habersele diagnosticado una leucemia linfática crónica de células B (LLC-B) en estadio Rai 1, un paciente de 69 años de edad se presenta en un Servicio de Hematología con adenopatías moderadas pero sin síntomas B. Hasta dicho momento, el paciente no ha recibido ningún tratamiento antineoplásico. En el análisis morfológico de la médula ósea, además de las células típicas de la LLC-B, se observa una segunda subpoblación celular de mayor tamaño. El inmunofenotipo revela que en sangre periférica un 73% de las células son linfocitos T mientras que un 23% son linfocitos B CD5+ derivados de la LLC-B. Curiosamente, el análisis citogenético permite la caracterización de dos clones con alteraciones citogenéticas diferentes, uno con una trisomía 12 (típica de LLC-B) y otro con una inversión del cromosoma 14 [inv(14)(q11q32)] y una trisomía 8 (típicas en linfomas T), entre otras. Basándose en estos datos, se diagnostica un linfoma periférico de células T que coexiste con la LLC-B.

Mediante la técnica de FICTION se combinan anticuerpos específicos de células B (anti-CD19) y T (anti-CD3) con sondas de ADN para los centrómeros de los cromosomas 8 y 12. De esta manera, se corrobora sin lugar a dudas que la trisomía 12 esta asociada con las células B (CD19+) de la LLC y que no aparece en las células T (CD3+). Inversamente, la trisomía 8 aparece en el clon de células CD3+ del linfoma T pero no en el de células B. Además, utilizando una sonda para el gen del retinoblastoma (*RBI*, localizada en 13q14) pudimos observar una delección de dicho locus exclusivamente en las células T, lo cual es sorprendente ya que la delección de 13q14 constituye una de las alteraciones citogenéticas más comunes en la LLC-B<sup>41</sup>.

#### Caso clínico 2

Un paciente de 17 años de edad recibe un trasplante de médula ósea de su hermana como tratamiento contra una leucemia aguda linfoblástica de células T (LAL-

**Tabla 1.** Aplicaciones potenciales de las técnicas de FICTION convencional y multicolor en la investigación y el diagnóstico de las neoplasias hematológicas.

| <b>Investigación</b>  |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Caracterización inmunofenotípica (estadio de diferenciación y subtipo celular) de clones tumorales con alteraciones cromosómicas definidas.</li><li>• Caracterización de las alteraciones cromosómicas de un clon tumoral con un inmunofenotipo definido presente en bajas proporciones dentro de un infiltrado de células no malignas.</li><li>• Estudio de varios genes candidatos simultáneamente independientemente de la proporción de células tumorales en una determinada biopsia. Por ejemplo, en el Linfoma de Hodgkin o en muestras de otras neoplasias hematológicas con baja infiltración de células tumorales*.</li><li>• Delinear una región comúnmente amplificada o delecionada usando simultáneamente varias sondas de DNA que cubran la región de interés*.</li><li>• Correlacionar la expresión de una determinada proteína con la presencia de alteraciones cromosómicas.</li></ul>   |
| <b>Diagnóstico y seguimiento</b>  |
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Distinción entre alteraciones cromosómicas constitucionales y tumorales en casos concretos.</li><li>• Detección simultánea de las alteraciones citogenéticas primarias con valor diagnóstico en un determinado subtipo tumoral, p. ej. LNH-B, NCT, LACG, MM, etc., independientemente del grado de infiltración de un determinado tejido, p. ej. en la médula ósea o en sangre periférica*.</li><li>• Detección simultánea de alteraciones citogenéticas secundarias con valor pronóstico independientemente del grado de infiltración de un determinado tejido*.</li><li>• Seguimiento de pacientes con alteraciones cromosómicas conocidas, incluyendo la detección de la enfermedad mínima residual.</li><li>• Detección de la presencia de alteraciones cromosómicas en la subpoblación CD34+ en las muestras de aféresis previas a un trasplante autólogo de células progenitoras.</li><li>• Utilizar la información derivada de los estudios de expresión de alto rendimiento (microchips de expresión y genómicos) para establecer ensayos de FICTION para la detección de proteínas y alteraciones cromosómicas con alto valor diagnóstico y/o pronóstico*.</li></ul> |

\* Sólo posible mediante la técnica de FICTION multicolor.

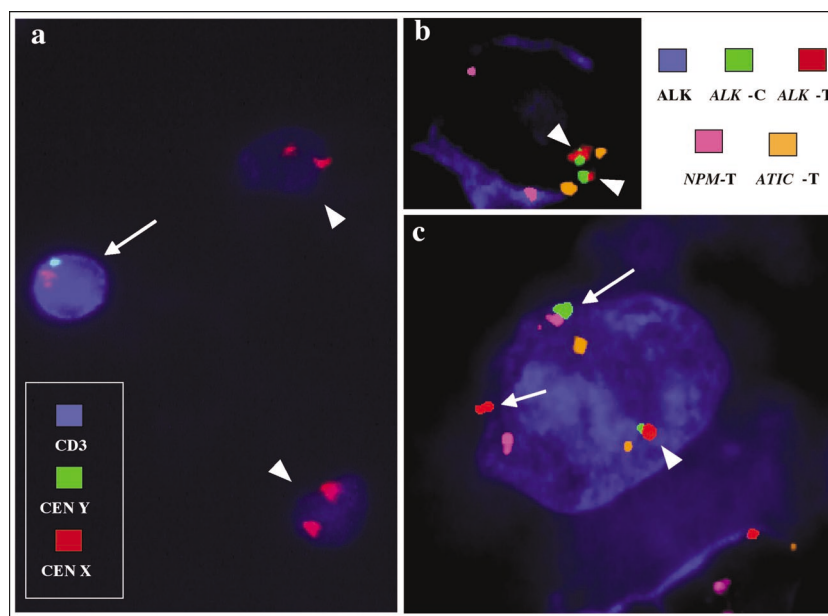
T). En un control citogenético dos meses después del trasplante de médula ósea se descubre mediante la técnica de FISH que un 1% de las células de la médula ósea son masculinas (un cromosoma X y un cromosoma Y) y que el 99% restante son femeninas (dos cromosomas X). En este caso, la pregunta pertinente es: ese 1% de células masculinas ¿representan el clon tumoral que no ha desaparecido completamente después del trasplante, o pertenecen a células sanas propias de la médula ósea del paciente, por ejemplo, osteoblastos? Mediante la técnica de FICTION se combina la detección de un antígeno de células T (CD3) con sondas de ADN para los centrómeros de los cromosomas sexuales. El análisis revela que de las células masculinas encontradas en la muestra de médula ósea, el 32% son negativas para el marcador CD3 mientras que el 68% células son CD3 posi-

vas (Fig. 2a). De esta manera se descubre que dos tercios de las células masculinas de la médula ósea posiblemente representan el clon tumoral de la LAL-T que no ha sido eliminado completamente después del trasplante y que el tercio restante representa células sanas propias del paciente, posiblemente osteoblastos de la médula ósea. Hasta la fecha, la paciente no ha presentado síntomas clínicos, pero dicho hallazgo mediante FICTION podría representar la detección temprana de una recidiva.

### Caso clínico 3

Un paciente de 43 años de edad se presenta en un hospital con dolor abdominal. Dicho paciente recibió un trasplante de hígado de un donante compatible hace tres años como tratamiento de una cirrosis hepática, y hasta el momento de la admisión no ha presentado complicaciones. El





**Figura 2.** (a) FICTION en un paciente con LAL de células T tras un trasplante de médula ósea de una donante femenina (Caso clínico 2). En la parte izquierda de la imagen se observa una célula claramente positiva para el marcador CD3 (típico de células T, marcaje azul) con una señal roja (centrómero del cromosoma X) y una señal verde (centrómero del cromosoma Y), y por lo tanto es masculina (flecha) y proviene posiblemente del tumor que no ha sido completamente eliminado después del trasplante. En la parte derecha de la imagen se observan dos células negativas para el marcador CD3 (por lo tanto no son células T) con dos señales rojas cada una (cabezas de flecha) lo cual indica que son células femeninas de la donante. (b-c) Resultados del ensayo de M-FICTION para los LACG en un paciente con una t(2;5)(p23;q35) que fusiona los genes ALK (2p23) y NPM (5q35). La imagen 2b muestra una célula negativa para el marcador tumoral ALK en la se puede observar el patrón no alterado de señales de hibridación: dos señales naranjas indican la presencia de dos copias del gen ATIC, dos señales rosas indican la presencia de dos copias del gen NPM y finalmente, dos fusiones de señales rojas (teloméricas al gen ALK) y verdes (centroméricas al gen ALK) indican la ausencia de una translocación afectando al gen ALK (cabezas de flecha). La imagen 2c, en cambio, representa una célula del mismo paciente positiva para el marcador tumoral ALK (nótese el marcaje azul) en la que la translocación t(2;5) da lugar al siguiente patrón de señales de hibridación: separación de una de las señales de fusión roja/verde y fusión de la señal verde (centromérica al gen ALK) con una señal rosa (telomérica a NPM) (flecha); la señal roja aislada representa la región telomérica del gen ALK (flecha). Además, se observan dos señales naranjas que representan dos copias intactas del gen ATIC, una señal rosa aislada indicando la copia intacta del gen NPM y una señal de fusión roja/verde indicando el alelo no reordenado del gen ALK (cabeza de flecha).

análisis de ultrasonidos de la región abdominal revela una masa heterogénea en el lóbulo izquierdo del hígado que lleva a la sospecha de un tumor del tracto biliar hepático. Se extrae una biopsia y el estudio patológico indica un ligero rechazo celular

pero sin signos de transformación tumoral. Para completar el análisis, se lleva a cabo un diagnóstico diferencial de una muestra de sangre periférica y sorprendentemente se encuentra un porcentaje elevado de blastos. El consecuente análisis de la médula

ósea revela un infiltrado leucémico de monoblastos que expresan CD34, CD13 y CD33, lo que deriva en el diagnóstico de una LAM clasificada como M4 (FAB) con manifestación extramedular hepática.

El tipaje HLA del receptor antes del trasplante fue positivo para los siguientes marcadores: A2, A32, B41, B27, Bw4, Bw6, DRB1\*01, DRB1\*13, DRB3. El donante presentaba el siguiente fenotipo HLA: A2, A24, B27, B38, Bw4, Cw2, DR4, DR13, DR53, 52, DQ1, 3. El tipaje de las células leucémicas de la médula ósea se deriva mayormente del fenotipo HLA del donante. El estudio mediante PCR cuantitativa del HLA de clase II revela la presencia genotipos HLA del donante y del receptor. El análisis citogénico permite la descripción de un clon tumoral complejo con una trisomía 13, entre otras muchas alteraciones cromosómicas. En este caso, la incógnita a resolver es: ¿proviene la LAM del donante o del propio paciente transplantado? Para despejar esta duda, se aplican varios ensayos de la técnica de FICTION con anticuerpos específicos para los antígenos HLA-A23/24 y Bw6 y una sonda para el gen del retinoblastoma (*RBI*), localizado en la banda cromosómica *13q14*. De esta manera, se comprueba que las células con trisomía 13 son positivas para el marcador HLA-23/24 y negativas para Bw6. Así, como el paciente es HLA24-/Bw6+ y el donante es HLA24+/Bw6-, se concluye que la LAM M4 desarrollada posteriormente a un trasplante hepático se deriva del donante (Subklewe y col, manuscrito remitido).

#### LIMITACIONES DE LA TÉCNICA DE FICTION CONVENCIONAL

La técnica de FICTION, aunque es la más ventajosa para el estudio simultáneo del fenotipo y genotipo, presenta ciertas limitaciones. Según los protocolos originales publicados por Weber-Matthiesen y col<sup>8,22</sup>, las sondas de DNA se marcaban indirectamente con haptenos como digoxigenina o biotina que posteriormente eran detectados con los respectivos anticuerpos anti-digoxigenina o avidina conjugados con un fluorocromo, lo cual tiene dos inconvenientes principales: a) los anticuerpos/avidina utilizados para la detección indirecta de las señales de hibrida-

ción pueden reaccionar con componentes celulares y con los anticuerpos utilizados para el inmunotipaje, lo que en ocasiones se deriva en un mayor fondo (hibridaciones no específicas) del deseable; y b) el número de haptenos para el marcaje indirecto es muy limitado, de manera que únicamente tres colores distintos son aplicables, uno para el inmunotipaje y dos para las sondas de DNA, o viceversa.

Durante los últimos diez años, la citogenética convencional ha integrado métodos de hibridación *in situ* con fluorescencia para dar lugar a una nueva disciplina denominada citogenética molecular. Uno de los avances más espectaculares de la citogenética molecular es la posibilidad de "pintar" cada uno de los cromosomas del cariotipo con un color diferente de manera que reordenamientos complejos o cripticos pueden ser caracterizados con precisión. Dicho cariotipo multicolor se consigue mediante la aplicación de las técnicas de FISH multicolor (M-FISH)<sup>42</sup> o cariotipo espectral (SKY)<sup>43</sup>. Estos dos métodos se basan en la utilización de 24 sondas de DNA (una para cada cromosoma humano) marcadas con una combinación de diferentes fluorocromos y en la aplicación de complejos sistemas de análisis de imagen. Estas nuevas metodologías proporcionan los requisitos necesarios para superar las limitaciones de la técnica de FICTION convencional.

#### DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE FICTION MULTICOLOR

El primer paso hacia el desarrollo de una aproximación multicolor de la técnica de FICTION es la elección de un sistema de análisis de imagen apropiado. La técnica de M-FISH está basada en la utilización de filtros de banda estrecha específicos para cada uno de los fluorocromos utilizados de manera que cada color es capturado separadamente y la imagen multicolor se consigue mediante una integración de los diferentes canales<sup>42</sup>. En cambio, la técnica de SKY se basa en una tecnología espectral que analiza el espectro de emisión de cada uno de los píxeles de la imagen y asigna un color artificial a cada pixel dependiendo de su espectro para lograr la imagen multi-

color<sup>43</sup>. Para establecer la técnica de FICCIÓN multicolor (M-FICCIÓN), escogimos la tecnología basada en filtros ya que permite capturar múltiples planos focales para obtener información celular tridimensional. Los fluorocromos utilizados para desarrollar las sondas multicolor fueron: dietil-amino-metil-coumarin (DEAC, color azul cielo), *spectrum green* (SG, color verde), *spectrum orange* (SO, color rojo-naranja), rojo Texas (TR, color rojo) y cianina 5 (Cy5, infrarrojo). Para la detección del inmunofenotipo utilizamos la sustancia fluorescente amino-metil-coumarin (AMCA, color azul). Para la captura multifocal de cada uno de estos fluorocromos, utilizamos un microscopio de fluorescencia motorizado (*Axioplan 2 imaging*, Zeiss, Göttingen, Alemania) equipado con filtros de banda estrecha específicos y un software de análisis multicolor apropiado (isis3, MetaSystems, Altlußheim, Alemania).

Para demostrar la aplicabilidad de la técnica de M-FICCIÓN, desarrollamos tres ensayos para el diagnóstico de tres subtipos de linfomas: los linfomas no-Hodgkin de células B (LNH-B), las neoplasias de células T (NCT) y el linfoma anaplásico de células grandes (LACG).

### M-FICCIÓN en LNH-B

Los LNH-B agrupan un conjunto heterogéneo de enfermedades malignas derivadas de células B en diferentes estados de desarrollo y representan aproximadamente el 70-90 % de todos los LNH. Inmunofenotípicamente, estos linfomas expresan marcadores clásicos de células B como CD19, CD20, CD22 y CD79a. La citogenética de los LNH-B es compleja y variable, aunque si hay una característica cromosómica que describa los LNH-B, ésta es la desregulación de oncogenes mediante translocaciones de los mismos con el gen IGH (*immunoglobulin heavy chain*, cadena pesada de las inmunoglobulinas). Se han descrito más de 20 oncogenes implicados en translocaciones con IGH<sup>30</sup>. Algunas de estas translocaciones están asociadas a distintos subtipos de LNH-B, siendo las más frecuentes: la t(14;18)(q32;q21) -afectando al oncogén *BCL2*- en el linfoma folicular (LF), la t(11;14)(q13;q32) -afectando

al oncogén *BCL1/CCND1*- en el linfoma del manto (LM), la t(8;14)(q24;q32) -afectando el oncogén *MYC*- en el linfoma/leucemia de Burkitt (LB) y la t(3;14)(q27;q32) -afectando al oncogén *BCL6*- en el linfoma difuso de células B grandes (LDCBG)<sup>44</sup>. La importancia del diagnóstico diferencial de estos cuatro LNH-B estriba en que su comportamiento clínico es muy distinto, y por lo tanto los tratamientos a aplicar son, a su vez, diferentes. Por ejemplo, los pacientes con LM tienen un tiempo de supervivencia medio a los cinco años del 27% mientras que los pacientes con LF tienen un pronóstico mucho más favorable, con una supervivencia media del 72%<sup>45</sup>. Para una detección rápida y certera de estas cuatro translocaciones cromosómicas, diseñamos un ensayo de M-FICCIÓN con sondas multicolor para los genes *BCL1/CCND1* (marcada con SO), *BCL2* (DEAC), *BCL6* (TR), *MYC* (Cy5) e *IGH* (SG), en combinación con un anticuerpo anti-CD20 para detectar las células B (AMCA).

### M-FICCIÓN en NCT

Las neoplasias de células T representan aproximadamente el 15% de todos los LNH y leucemias agudas linfoblásticas (LAL). Estas neoplasias expresan normalmente los antígenos CD2, CD3 y CD5 y son morfológicamente variables. A nivel citogenético, a diferencia de los LNH-B, no se han descrito alteraciones cromosómicas para el diagnóstico diferencial de los distintos subtipos de NCT. Sin embargo, reordenamientos cromosómicos de las bandas 14q11 o 7q35 se han descrito de manera frecuente como alteraciones primarias<sup>46</sup>. En estas dos regiones se encuentran respectivamente los genes que codifican para las cadenas alfa/delta y beta del receptor de células T (*TCRA/D* y *TCRB*, respectivamente) (nótese la analogía con los LNH-B y las translocaciones del gen *IGH*). Los genes *TCRA/D* y *TCRB* se translocan con varios oncogenes<sup>47</sup> y, por lo tanto, para poder detectar todas las alteraciones cromosómicas de dichos genes se necesitan sondas de FISH con un diseño diferente al aplicado para los LNH-B. En este caso, se aplican sondas de ADN marcadas diferencialmente que flanquean los puntos de rotura en los genes *TCRA/D* y *TCRB*. En

una célula sana, las sondas que flanquean el gen aparecen colocalizadas en núcleos en interfase y metafase. Cuando una translocación tiene lugar, las sondas aparecen separadas lo cual indica que ha habido una rotura en la región cromosómica que se encuentra entre la sonda centromérica y la telomérica. Teniendo en cuenta este diseño, desarrollamos sondas de ADN que flanquean los genes *TCRA/D* (sonda telomérica marcada con DEAC y centromérica con Cy5) y *TCRB* (sonda telomérica marcada con SG y centromérica con SO). Estas sondas se combinaron con un anticuerpo anti CD3 (AMCA) para detectar células T.

### M-FICTION en LACG

El linfoma anaplásico de células grandes representa aproximadamente un 5% de todos los LNH, pero es más frecuente en niños, donde aparece en un 30-40% de todos los linfomas pediátricos de células grandes<sup>48</sup>. El LACG es una enfermedad morfológicamente heterogénea que expresa el antígeno CD30 (también conocido como Ki-1, Kiel 1) y puede presentar antígenos típicos de células T o no. Recientemente, se ha descubierto una nueva entidad clinicopatológica que se caracteriza por la expresión de la oncoproteína *Alk* y representa alrededor del 60% de los LACG. Esta entidad tiene mejor pronóstico que los LACG que no expresan *Alk*<sup>49</sup>. La proteína *Alk* se expresa en tejidos hematopoyéticos únicamente cuando las células tumorales contienen una translocación cromosómica del gen *Alk*, localizado en 2p23. En la mayoría de los casos, *Alk* se fusiona con el gen *NPM*, en 5q35, como resultado de una translocación t(2;5)(p23;q35). Sin embargo, el 15% de los casos presentan reordenaciones cromosómicas variantes del gen *Alk*<sup>50</sup>, como la inv(2)(p23q35) fusionando *Alk* con el gen *AT1C*, o la t(1;2)(q25;p23) fusionando *TPM3* y *Alk*. Nuestro ensayo de M-FICTION aplica un anticuerpo anti-*Alk* (AMCA) y sondas para los genes *Alk* (sonda telomérica marcada con SO y centromérica con SG), *NPM* (sonda telomérica marcada con TR) y *AT1C* (sonda telomérica marcada con Cy5) (Fig. 2b-c).

Los respectivos ensayos de M-FICTION se aplicaron en muestras de pacientes con

LNH-B, NCT y LACG con alteraciones citogenéticas conocidas como controles positivos. Los resultados demostraron que las alteraciones cromosómicas aparecían exclusivamente en las subpoblaciones celulares que expresaban CD20 (LNH-B), CD3 (NCT) o *Alk* (LACG), y las células que no expresaban dichos antígenos contenían el patrón normal de señales de hibridación (Fig. 2b-c). De esta manera pudimos demostrar que la técnica de M-FICTION es conceptual y tecnológicamente viable, ampliando así las posibilidades del estudio combinado del fenotipo y el genotipo<sup>51</sup>.

En la tabla 1 se destacan algunas de las aplicaciones de la técnica de M-FICTION en las neoplasias hematológicas.

### CONCLUSIONES Y DIRECCIONES FUTURAS

La técnica de FICTION representa un método sencillo y rápido para la caracterización *in situ* de los aspectos genotípicos y fenotípicos de las células tumorales. Durante la última década, la técnica de FICTION se ha aplicado mayormente para estudiar la relación entre el estadio de diferenciación de las células tumorales y la presencia de alteraciones citogenéticas en las neoplasias hematológicas. Sin embargo, las aplicaciones potenciales de la técnica de FICTION son sin duda mucho más amplias y no se restringen a las neoplasias hematológicas. En cualquier circunstancia en la que se requiera correlacionar *in situ* los aspectos morfológicos, inmunofenotípicos y genéticos en una biopsia celular, la técnica de FICTION proporciona información de primer grado, siempre y cuando se disponga de los anticuerpos adecuados y sondas de ADN específicas para las regiones cromosómicas a estudiar.

Una apuesta de futuro, en el que las técnicas de alto rendimiento (*high throughput*) tienden a imponerse, ha sido el desarrollo de la técnica de M-FICTION. Dicha técnica ha sido desarrollada y optimizada mediante ensayos para el diagnóstico de varios tipos de linfomas no Hodgkin. Los tests desarrollados, más que representar ensayos fijos para ser aplicados en el diagnóstico diario, proporcionan una prueba fiable de que la técnica funciona correctamente.

Dichos ensayos pueden ser modificados según los requerimientos de una situación diagnóstica o de investigación concreta. Una de las aplicaciones más interesantes de la técnica de M-FICTION en las neoplasias hematológicas se relaciona directamente con los resultados derivados de los estudios de microchips. Dichos estudios permiten la identificación de nuevos marcadores, ya sea proteínas o genes, con gran valor diagnóstico y/o pronóstico. Hoy día, a pesar del sensacionalismo de los medios de comunicación, es impensable que los microchips puedan ser utilizados para el diagnóstico diario y constituyen una nueva herramienta de investigación cuyas posibilidades están todavía en desarrollo. Sin embargo, los primeros resultados derivados de los estudios de microchips en linfomas y leucemias han desvelado la presencia de unas pocas proteínas cuyo nivel de expresión se correlaciona muy significativamente con parámetros diagnósticos y pronósticos. Así, en el LDCBG, se ha descubierto que la proteína PKC- $\beta$  (*protein kinase C beta*) se sobre-expresa en los casos de LDCBG resistentes al tratamiento o con desenlace fatal pero no en el grupo de mejor pronóstico<sup>52</sup>. En este caso, el ensayo de M-FICTION pertinente combinaría la detección de la PKC- $\beta$  con marcadores citogenéticos típicos del LDCG para establecer un test con valor diagnóstico y pronóstico sin precedentes.

Las aplicaciones de la técnica de M-FICTION no se restringen a las neoplasias hematológicas. De hecho, potencialmente, el principal campo de acción de esta nueva metodología es la detección de micrometástasis en tumores sólidos, por ejemplo, células cancerosas de tumores de mama en los ganglios centinelas, o la detección precoz de determinados tipos de cáncer, por ejemplo, cáncer de pulmón en pacientes de alto riesgo (proyecto subencionado por el Gobierno de Navarra que en la actualidad se está desarrollando en la Universidad de Navarra a cargo del Dr. Luis Montuenga en colaboración con nuestro grupo de investigación en Kiel). En estas dos situaciones, el porcentaje de células tumorales es muy bajo y por lo tanto, la técnica de M-FICTION proporcionará un método sensible y fiable para su detección, siempre y cuando dis-

pongamos de los anticuerpos y sondas de ADN necesarios.

Por otro lado, los esfuerzos para incrementar las posibilidades de la técnica de M-FICTION están siendo dirigidos en la actualidad al desarrollo de una plataforma automatizada para la evaluación tanto del inmunofenotipo como de las señales de hibridación múltiples. Por otro lado, para aumentar la procesividad de la técnica de M-FICTION, se utilizarán nuevas sustancias fluorescentes para incrementar el número de marcadores detectados en un solo experimento. Además, la técnica de M-FICTION está siendo optimizada para su aplicación en muestras de tejido incluido en parafina, lo cual abrirá las puertas a multitud de estudios retrospectivos en material archivado, incluso quizás en microchips de tejido<sup>53</sup>.

En conclusión, las técnicas de FICTION convencional y multicolor representan métodos rápidos y fiables para el diagnóstico y la investigación interdisciplinar del cáncer. Sus múltiples aplicaciones, todavía por explotar, proporcionan la posibilidad de integrar los conocimientos derivados de las diferentes estrategias de estudio, tanto fenotípicas como genotípicas, lo que sin duda dará lugar a una mayor comprensión del complejo proceso de carcinogénesis.

---

#### Agradecimientos

Los autores agradecen al personal técnico y académico del Departamento de Genética de la Universidad de Navarra y del Instituto de Genética Humana del Hospital Universitario de Kiel (Alemania) su excelencia en el trabajo de laboratorio. También agradecer la inestimable ayuda prestada por los muchos patólogos, especialistas clínicos y científicos que han colaborado durante años con nuestros grupos de investigación. Sin dicha colaboración, el desarrollo de técnicas verdaderamente interdisciplinares no sería posible.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. The non-Hodgkin's lymphoma classification project. National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The

- Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. *Cancer* 1982; 49: 2112-2135.
2. LENNERT K, STEIN H, KAISERLING E. Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphomata. *Br J Cancer* 1975; 31: 29-43.
  3. JAFFE ES. Hematopathology: integration of morphologic features and biologic markers for diagnosis. *Mod Pathol* 1999; 12: 109-115.
  4. HARRIS NL, JAFFE ES, VARDIMAN JW, STEIN H, DIEBOLD J, MÜLLER-HERMELINK HK *et al.* WHO classification of haematopoietic and lymphoid tissues: Introduction. En: Jaffe E S, Harris N L, Stein H, Vardiman J W, editores. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of haemopoietic and lymphoid tissues. Lion (Francia): IARC, 2001: 12-13.
  5. HARRIS NL, JAFFE ES, DIEBOLD J, FLANDRIN G, MULLER-HERMELINK HK, VARDIMAN J *et al.* The World Health Organization classification of neoplasms of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting—Airlie House, Virginia, November, 1997. *Hematol J* 2000; 1: 53-66.
  6. LINDBLOM A, LILJEGREN A. Regular review: tumour markers in malignancies. *Br Med J* 2000; 320: 424-427.
  7. NOWELL PC, ROWLEY JD, KNUDSON AG. Cancer genetics, cytogenetics—defining the enemy within. *Nat Med* 1998; 4: 1107-1111.
  8. WEBER-MATTHIESEN K, WINKEMANN M, MÜLLER-HERMELINK A, SCHLEGELBERGER B, GROTE W. Simultaneous fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics: a contribution to the characterization of tumor cells. *J Histochem Cytochem* 1992; 40: 171-175.
  9. WHITE DL, HUTCHINS CJ, HAYLOCK DN, TURCZYNOWICZ S, BISHOP A, TO LB *et al.* Direct analysis of FACS-sorted hemopoietic cell fractions using FISH. *Biotechniques* 1995; 18: 820-821.
  10. TEERENHOVI L, KNUUTILA S, EKBLUM M, ROSSI L, BORGSTROM GH, TALLMAN JK *et al.* A method for simultaneous study of the karyotype, morphology, and immunologic phenotype of mitotic cells in hematologic malignancies. *Blood* 1984; 64: 1116-1622.
  11. GARCIA-MARCO J, MATUTES E, MORILLA R, ELLIS J, OSCIER D, FANTES J *et al.* Trisomy 12 in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: assessment of lineage restriction by simultaneous analysis of immunophenotype and genotype in interphase cells by fluorescence in situ hybridization. *Br J Haematol* 1994; 87: 44-50.
  12. GAHN B, SCHAFFER C, NEEF J, TROFF C, FEURING-BUSKE M, HIDDEMANN W *et al.* Detection of trisomy 12 and Rb-deletion in CD34+ cells of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1997; 89: 4275-4281.
  13. GAHN B, WENDENBURG B, TROFF C, NEEF J, GROVE D, HAFERLACH T *et al.* Analysis of progenitor cell involvement in B-CLL by simultaneous immunophenotypic and genotypic analysis at the single cell level. *Br J Haematol* 1999; 105: 955-959.
  14. KNUUTILA S. Immunophenotyping and molecular cytogenetics. *J Histochem Cytochem* 1992; 40: 1427.
  15. WEBER-MATTHIESEN. Immunophenotyping and molecular cytogenetics. Author's response. *J Histochem Cytochem* 1992; 40: 1428.
  16. GOZZETTI A, LE BEAU MM. Fluorescence in situ hybridization: uses and limitations. *Semin Hematol* 2000; 37: 320-333.
  17. CALASANZ MJ. Revisión de técnicas de citogenética convencional y molecular y su implicación en el diagnóstico y pronóstico del cáncer. *ANALES Sis San Navarra* 2001; 24: 17-29.
  18. MARTIN-SUBERO JI, GESK S, HARDER L, GROTE W, SIEBERT R. Interphase cytogenetics of hematological neoplasms under the perspective of the novel WHO classification. *Anticancer Res.* (En prensa).
  19. KEARNEY L. The impact of the new fish technologies on the cytogenetics of haematological malignancies. *Br J Haematol* 1999; 104: 648-658.
  20. WEBER-MATTHIESEN K, MULLER-HERMELINK A, DEERBERG J, SCHERTHAN H, SCHLEGELBERGER B, GROTE W. Discrimination of distinct subpopulations within a tumor with combined double immunophenotyping and interphase cytogenetics. *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 1641-1644.
  21. WEBER-MATTHIESEN K, PRESSL S, SCHLEGELBERGER B, GROTE W. Combined immunophenotyping and interphase cytogenetics on cryostat sections by the new FICTION method. *Leukemia* 1993; 7: 646-649.
  22. SCHLEGELBERGER B, METZKE S, HARDER S, ZÜHLKE-JENISCH R, ZHANG Y, SIEBERT R. Classical and molecular cytogenetics of tumor cells. En: Wegner R, editor. *Diagnostic cytogenetics*. Nueva York: Springer-Verlag, 1999: 151-185.
  23. BRUNNING RD, MATUTES E, FLANDRIN G, VARDIMAN J, BENNET J, HEAD D *et al.* Acute myeloid leukaemia with recurrent genetic abnormalities. En: Jaffe E S, Harris N L, Stein

- H, Vardiman J W, editores. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of haemopoietic and lymphoid tissues. Lion (Francia): IARC, 2001: 81-87.
24. KNUUTILA S, TEERENHOVI L, LARRAMENDY ML, ELONEN E, FRANSSILA KO, NYLUND SJ et al. Cell lineage involvement of recurrent chromosomal abnormalities in hematologic neoplasms. *Genes Chromosomes Cancer* 1994; 10: 95-102.
  25. GARCÍA-MARCO JA, PRICE CM, ELLIS J, MOREY M, MATUTES E, LENS D et al. Correlation of trisomy 12 with proliferating cells by combined immunocytochemistry and fluorescence in situ hybridization in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1996; 10: 1705-1711.
  26. ZANDECKI M, LAI JL, GENEVIEVE F, BERNARDI F, VOLLE-REMY H, BLANCHET O et al. Several cytogenetic subclones may be identified within plasma cells from patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, both at diagnosis and during the indolent course of this condition. *Blood* 1997; 90: 3682-3690.
  27. HARRIS NL. Hodgkin's disease: classification and differential diagnosis. *Mod Pathol* 1999; 12: 159-175.
  28. WEBER-MATTHIEN K, DEERBERG J, POETSCH M, GROTE W, SCHLEGELBERGER B. Numerical chromosome aberrations are present within the CD30+ Hodgkin and Reed-Sternberg cells in 100% of analyzed cases of Hodgkin's disease. *Blood* 1995; 86: 1464-1468.
  29. SIEBERT R, ROSENWALD A, STAUDT LM, MORRIS SW. Molecular features of B-cell lymphoma. *Curr Opin Oncol* 2001; 13: 316-324.
  30. WILLIS TG, DYER MJ. The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. *Blood* 2000; 96: 808-822.
  31. WEBER-MATTHIEN K, DEERBERG-WITTRAM J, ROSENWALD A, POETSCH M, GROTE W, SCHLEGELBERGER B. Translocation t(2;5) is not a primary event in Hodgkin's disease. Simultaneous immunophenotyping and interphase cytogenetics. *Am J Pathol* 1996; 149: 463-468.
  32. TRÜMPER L, PFREUNDSCHUH M, BONIN FV, DAUS H. Detection of the t(2;5)-associated NPM/ALK fusion cDNA in peripheral blood cells of healthy individuals. *Br J Haematol* 1998; 103: 1138-1144.
  33. KALLIONIEMI A, KALLIONIEMI OP, SUDAR D, RUTOVITZ D, GRAY JW, WALDMAN F et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258: 818-821.
  34. ZUDAIRE MI, ODERO MD, CABALLERO MC, VALENTI C, MARTÍNEZ-PEÑUELA JM, CALASANZ MJ. Identificación de nuevos marcadores citogenéticos con valor pronóstico en cáncer de mama. *Anales Sis San Navarra* 2001; 24: 25-37.
  35. KUUKASJARVI T, TANNER M, PENNANEN S, KARHU R, VISAKORPI T, ISOLA J. Optimizing DOP-PCR for universal amplification of small DNA samples in comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 18: 94-101.
  36. JOOS S, MENZ CK, WROBEL G, SIEBERT R, GESK S, OHL S et al. Classical Hodgkin lymphoma is characterized by recurrent copy number gains of the short arm of chromosome 2. *Blood* 2002; 99: 1381-1387.
  37. BARGOU RC, LENG C, KRAPPMANN D, EMMERICH F, MAPARA MY, BOMMERT K et al. High-level nuclear NF-kappa B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* 1996; 87: 4340-4347.
  38. HINZ M, LOSER P, MATHAS S, KRAPPMANN D, DORKEN B, SCHEIDEREIT C. Constitutive NF-kappaB maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* 200; 97: 2798-2807.
  39. MARTIN-SUBERO JI, GESK S, HARDER L, SONOKI T, TUCKER PW, SCHLEGELBERGER B et al. Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2002; 99: 1474-1477.
  40. SATTERWHITE E, SONOKI T, WILLIS TG, HARDER L, NOWAK R, ARRIOLA EL et al. The BCL11 gene family: involvement of BCL11A in lymphoid malignancies. *Blood* 2001; 98: 3413-3420.
  41. MARTIN-SUBERO JI, SIEBERT R, HARDER L, GESK S, SCHWINDT P, BRAUNINGER A et al. Cytogenetic and molecular characterization of a patient with simultaneous B-cell chronic lymphocytic leukemia and peripheral T-cell lymphoma. *Am J Hematol* 2001; 68: 276-279.
  42. SPEICHER MR, GWYN BALLARD S, WARD DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 1996; 12: 368-375.
  43. SCHRÖCK E, DU MANOIR S, VELDMAN T, SCHOELL B, WIENBERG J, FERGUSON-SMITH MA et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996; 273: 494-497.
  44. CHAGANTI RS, NANJANGUD G, SCHMIDT H, TERUYA-FELDSTEIN J. Recurring chromosomal abnormalities in non-Hodgkin's lymphoma:

- biologic and clinical significance. *Semin Hematol* 2000; 37: 396-411.
45. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 89: 3909-3918.
  46. SCHNEIDER NR, CARROLL AJ, SHUSTER JJ, PULLEN DJ, LINK MP, BOROWITZ MJ et al. New recurrent cytogenetic abnormalities and association of blast cell karyotypes with prognosis in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group report of 343 cases. *Blood* 2000; 96: 2543-2549.
  47. RABBITS TH. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 1994; 372: 143-149.
  48. DREXLER HG, GIGNAC SM, VON WASIELEWSKI R, WERNER M, DIRKS WG. Pathobiology of NPM-ALK and variant fusion genes in anaplastic large cell lymphoma and other lymphomas. *Leukemia* 2000; 14: 1533-1559.
  49. SHIOTA M, NAKAMURA S, ICHINOHASAMA R, ABE M, AKAGI T, TAKESHITA M et al. Anaplastic large cell lymphomas expressing the novel chimeric protein p80NPM/ALK: a distinct clinicopathologic entity. *Blood* 1995; 86: 1954-1960.
  50. FALINI B, PULFORD K, PUCCIARINI A, CARBONE A, DE WOLF-PEETERS C, CORDELL J et al. Lymphomas expressing ALK fusion protein(s) other than NPM-ALK. *Blood* 1999; 94: 3509-3515.
  51. MARTIN-SUBERO JI, CHUDOBA I, HARDER L, GESK S, GROTE W, NOVO FJ et al. Multicolor-FICTION: Expanding the possibilities of combined morphologic, immunophenotypic and genetic single cell analyses. *Am J Pathol*. (En prensa).
  52. SHIPP MA, ROSS KN, TAMAYO P, WENG AP, KUTOK JL, AGUIAR RC et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 2002; 8: 68-74.
  53. KONONEN J, BUBENDORF L, KALLIONIEMI A, BARLUND M, SCHRAML P, LEIGHTON S et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Med* 1998; 4: 844-847.