
Revisión de técnicas de citogenética convencional y molecular y su implicación en el diagnóstico y pronóstico del cáncer

Review of conventional and molecular cytogenetic techniques and their use in the diagnosis and prognosis of cancer

M.J. Calasanz

RESUMEN

El análisis citogenético de las células tumorales ha proporcionado importante información acerca de la biología del cáncer. En el último Catálogo de Alteraciones Cromosómicas en Cáncer se describen aproximadamente 100.000 alteraciones cromosómicas clonales en más de 30.000 neoplasias humanas. Muchas de ellas, se han caracterizado molecularmente, permitiendo la identificación de nuevos oncogenes y genes supresores de tumores implicados en la génesis tumoral.

En neoplasias hematológicas, y sarcomas, el análisis citogenético constituye una importante herramienta diagnóstica y pronóstica incorporada a la rutina del laboratorio. Sin embargo, en tumores sólidos su uso ha estado más limitado debido a problemas técnicos con los cultivos de las muestras, o a la presencia de múltiples clones celulares y cariotipos complejos.

El desarrollo de técnicas de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) ha supuesto un enorme avance en la citogenética del cáncer, especialmente de tumores sólidos. Hoy la técnica de FISH tiene numerosas variantes tecnológicas como la hibridación genómica comparada (CGH), el cariotipo espectral (SKY-FISH), o el multiplex FISH (M-FISH), entre otras. Todas ellas, constituyen una nueva disciplina denominada citogenética molecular y proporcionan nuevos métodos más precisos de detección de las alteraciones cromosómicas en las células tumorales.

La combinación de citogenética convencional, FISH y análisis molecular permite la aproximación diagnóstica, la clasificación de las neoplasias en subgrupos con distinto valor pronóstico, y la monitorización del efecto del tratamiento.

En esta revisión, describiremos las distintas técnicas genéticas y analizaremos su impacto en el diagnóstico y pronóstico del cáncer.

Palabras clave: Citogenética. Cáncer. FISH. CGH

ABSTRACT

Cytogenetic analysis of tumour cells has provided important information for understanding the biology of cancer. Around 100,000 clonal chromosomal abnormalities belonging to more than 30,000 human neoplasms are described in the latest catalogue of chromosome aberrations in cancer. Some of them have been molecularly characterised, making possible the identification of new oncogenes and tumour suppressor genes involved in tumourigenesis.

In haematologic neoplasms and sarcomas, cytogenetic analysis is a powerful tool of diagnosis and prognosis, and has been incorporated into routine laboratory methods. However, in solid tumours, cytogenetics have been hampered by difficulties in obtaining high quality metaphase spreads, or by the presence of multiple cellular clones or complex karyotypes.

The development of fluorescence *in situ* hybridisation techniques (FISH) has provided a notable advance in cancer cytogenetics, especially in solid tumours. Nowadays, the FISH technique has evolved into numerous variants, such as comparative genomic hybridisation (CGH), spectral karyotyping (SKY) or multiple FISH (M-FISH), among others. All these techniques constitute a new discipline named molecular cytogenetics, and provide new and more accurate methods for detecting chromosomal aberrations in tumour cells.

The combination of conventional cytogenetics, FISH and molecular analysis makes possible more accurate diagnoses, improved classification of neoplasms in subgroups of different prognostic value, and the post-treatment follow-up of patients affected with cancer.

In this review, the different genetic techniques are described as well as their impact on the diagnosis and prognosis of cancer.

Key words: Cytogenetics. Cancer. FISH. CGH

ANALES Sis San Navarra 2001; 24 (Supl. 1): 17-29.

Departamento de Genética. Universidad de Navarra. Pamplona

Correspondencia:
María José Calasanz Abinzano
Departamento de Genética
Universidad de Navarra
Irunlarrea, s/n
31008 Pamplona
Tfno. 948 425600 ext.6357
Fax 948 425649
E-mail: mjcal@unav.es

INTRODUCCIÓN

El análisis citogenético de las células tumorales ha revelado la presencia de alteraciones cromosómicas clonales en más de 30.000 neoplasias humanas¹. Hoy sabemos que la presencia de determinadas alteraciones cromosómicas aporta información importante con valor diagnóstico y pronóstico en neoplasias hematológicas y tumores sólidos^{2,3}. El conocimiento de la alteración cromosómica asociada a un determinado diagnóstico permite hacer un seguimiento de la evolución de la enfermedad, valorar la respuesta a tratamiento y detectar y cuantificar la enfermedad mínima residual (EMR). Cada vez en más protocolos clínicos, especialmente en neoplasias hematológicas y sarcomas, las decisiones terapéuticas están basadas, entre otros parámetros, en el análisis genético de las células neoplásicas⁴.

Desde la observación en los años 60 por Nowell y Hungerford de la aparición de un pequeño cromosoma, al que denominaron Philadelphia (Ph)⁵, en pacientes con leucemia mieloide crónica, y la posterior descripción en los 70 por Caspersson⁶ de técnicas de bandeo cromosómico, el análisis citogenético ha sido en los últimos 30 años, una de las áreas de la gené-

tica que se ha desarrollado con más rapidez (Tabla 1). Proporciona información muy valiosa no sólo clínica, sino también básica en la investigación del cáncer. La descripción de alteraciones cromosómicas asociadas específicamente a un tipo de cáncer, y su posterior seguimiento, ha permitido conocer la significación clínica de muchos marcadores citogenéticos y, más importante todavía, se ha constituido como un paso previo a la detección y localización de los genes implicados en la génesis tumoral.

En neoplasias hematológicas, debido a la facilidad de obtener metafases de calidad a partir de cultivos de médula ósea, el análisis citogenético convencional se ha incorporado en los laboratorios de Genética como una técnica de rutina, que complementa al diagnóstico morfológico e inmunofenotípico. Existe mucha información a través de grandes series publicadas, y por la experiencia, no sólo de las alteraciones cromosómicas que se asocian específicamente a un determinado tipo de leucemia y linfoma⁷ (Tablas 2, 3), sino también del valor pronóstico de las mismas⁸. Por ejemplo, la presencia en el cariotipo de un cromosoma Philadelphia $-t(9;22)-$, en un paciente diagnosticado de leucemia aguda

Tabla 1. Algunas fechas de interés en el área de la citogenética.

1956	Tjio y Levan	Establecen el número de cromosomas del hombre en 46.
1960	Nowell/Hungerford	Describen el cromosoma Philadelphia (Ph) en LMC.
1970	Caspersson y col.	Describen las primeras técnicas de bandeo cromosómico.
1971	Conferencia París	3ª conferencia de nomenclatura cromosómica, 1ª con bandas.
1973	Rowley	Describe al cromosoma Ph como una $t(9;22)$.
1975	Southern	Describe la técnica de Southern-blot.
1981	Langer y col.	Describen sondas no radioactivas para hibridación <i>in situ</i> .
1981	Wake y col.	Describen mejoras en el cultivo de tumores sólidos utilizando la disociación con colagenasa.
1985	Mulis	Describe la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
1992	Kallioniemi y col.	Describen la técnica de hibridación genómica comparada (CGH).
1996	Schrök y col.	Describen la técnica de cariotipo espectral (SKY-FISH).
1996	Speicher y col.	Describen la técnica de multiplex-FISH (M-FISH)

Tabla 2. Alteraciones cromosómicas recurrentes en leucemias y genes implicados*

	Alteración citogenética	Genes implicados
Mieloides:		
LMC	t(9;22)(q34;q11)	<i>ABL-BCR</i>
LMC crisis blástica	t(9;22)(q34;q11), +8,+19,+Ph,i(17q)	<i>ABL-BCR</i>
LANL-M2	t(8;21)(q22;q22)	<i>ETO-AML1</i>
LANL-M3	t(15;17)(q22;q11-12)	<i>PML-RARA</i>
LANL-M4Eo	inv(16)(p13q22) ó t(16;16)	<i>MYH11-CBFB</i>
LANL-M5	t(9;11)p22;q23)	<i>AF10-MLL</i>
LANL	t(6;9)(p23;q34) t(3;3)(q21;q26) ó inv(3)(q21q26)	<i>DEK-CAN</i> <i>EVII</i>
LANL-secundaria	+8,-7,-5,del(5q),del(20q),12p -7,del(7q),-5,del(5q) t(11q23)	<i>MLL</i>
LMMC	t(5;12)(q33;p13)	<i>PDGFRB-TEL(ETV6)</i>
SMD	-7,del(7q),-5,del(5q), +8,del(11q),del(20q), del(11q),del(12p)	
Linfoides:		
LAL preB	t(1;19)(q23;p13) t(5;14)(q31;q32) t(12;21)(p13;q22)	<i>PBX1-E2A</i> <i>IL3-IGH</i> <i>TEL-AML1</i>
LAL B(Sig+)	t(8;14)(q24;q32) t(2;8)(p12;q24) t(8;22)(q24;q11)	<i>MYC-IGH</i> <i>IGK-MYC</i> <i>MYC-IGL</i>
LAL B o B-mieloide	t(9;22)(q34;q11) t(4;11)(q21;q23)	<i>ABL-BCR</i> <i>AF4-MLL</i>
LAL T	t(1;14)(p32;q11) t(1;7)(p34;q34) t(8;14)(q24;q11) t(7;9)(q35;q34) t(7;9)(q34;q34.3) t(7;10)(q35;q24) t(10;14)(q24;q11) t(11;14)(p13;q11) t(7;11)(q35;p13) t(11;14)(p15;q11)	<i>TAL1/SCL-TCRA</i> <i>LCK-TCRB</i> <i>MYC-TCRA</i> <i>TCRB-TAL2</i> <i>TCRB-TAN1</i> <i>TCRB-HOX11</i> <i>HOX11-TCRA</i> <i>RBTN2/TTG2-TCRA/D</i> <i>TCRB-RBTN2/TTG2</i> <i>RBTN1/TTG1-TCRA/D</i>
LLC-B	del(9p),t(9p) t(14;18)(q32;q21) t(11;14)(q13;q32) t(14;19)(q32;q13) t(2;14)(p13;q32) +12,del(13q) del(11)(q21q23)	<i>IGH-BCL2</i> <i>BCL1-IGH</i> <i>IGH-BCL3</i> <i>BCL11A-IGH</i>
LLC-T	t(8;14)(q24;q11) t(14;14)(q11q32) inv(14)(q11q32)	<i>MYC-TCRA</i> <i>TCRA-TCL1</i> <i>TCRA-TCL1</i>
MM	t(11;14)(q13;q32) t(4;14)(p16;q32) t(14;16)(q32;q23) t(6;14)(p25;q32) t(1;14)(q21;q32) 1q, 13q,del(6q) del(7q)	<i>BCL1(CyclinD1)-IGH</i> <i>FGFR/MMSET3-IGH</i> <i>IGH-CMAF</i> <i>MUM1(IRF4)-IGH</i> <i>MUM2/3-IGH</i> <i>TNF</i> <i>GP170</i>

* La lista completa de alteraciones cromosómicas y genes implicados en leucemias puede ser consultada en: (<http://www.ncbi.nlm.gov/CCAP>).

Tabla 3. Translocaciones cromosómicas recurrentes en Linfomas no Hodgkin y genes implicados*.

	Alteración citogenética	Genes implicados
LNH-B:		
Burkitt	t(8;14)(q24;q32)	<i>MYC</i> -IGH
	t(2;8)(p11;q24)	IGK- <i>MYC</i>
	t(8;22)(q24;q11)	<i>MYC</i> -IGL
Folicular	t(14;18)(q32;q21)	IGH- <i>BCL2</i>
	t(2;18)(p12;q21)	IGK- <i>BCL2</i>
	t(18;22)(q21;q11)	<i>BCL2</i> -IGL
	t(1;22)(q22;q11)	<i>FCGR1IB</i> -IGL
DCG	t(3;22)(q27;q32)	<i>BCL6</i> -IGL
	t(3;14)(q27;q32)	<i>BCL6</i> -IGH
	t(2;3)(p12;q27)	IGK- <i>BCL6</i>
	t(14;15)(q32;q11-q13)	IGH- <i>BCL8</i>
	t(10;14)(q24;q32)	<i>NFKB2(LYT10)</i> -IGH
	t(14;18)(q32;q21)	IGH- <i>BCL2</i>
	t(8;14)(q24;q32)	<i>MYC</i> -IGH
	t(6;14)(p21;q32)	<i>CyclinD3</i> -IGH
t(1;14)(q21;q32)	<i>MUC1</i> -IGH	
Manto	t(11;14)(q13;q32)	<i>BCL1(CyclinD1)</i> -IGH
Marginal:		
• Linfoplasmocitoide	t(9;14)(p13;q32)	<i>PAX5</i> -IGH
• Malt	t(11;18)(q21;q21)	<i>API2</i> -MLT
	t(1;14)(p22;q32)	<i>BCL10</i> -IGH
• Linfocítico (small)	t(14;19)(q32;q13)	IGH- <i>BCL3</i>
• Esplénico veloso	t(7;14)(q21;q32)	<i>CDK6</i> -IGH
	t(2;7)(p12;q21)	IGK- <i>CDK6</i>
• Otros	t(11;14)(q23;q32)	<i>PAFAH2</i> -IGH
	t(11;14)(q23;q32)	<i>RCK</i> -IGH
	t(12;14)(q24;q32)	<i>BCL7A</i> -IGH
	t(12;22)(q24;q32)	<i>CyclinD2</i> -IGL
LNH T:		
Anaplásico K1+	t(2;5)(p23;q35)	<i>ALK</i> - <i>NPM</i>
(T o B)		
variable	t(10q24)	<i>NFKB2(LYT10)</i>
	t(7;14)(q35;q11)	TRCB-TRCA/D
	t(7;14)(p15;q11)	TCRG-TCRA/D
	t(7;7)(p15;q11)	TCRG
	t(11;14)(p13;q11)	<i>RBTV2</i> -TRCD
	inv(14)(q11q32)	TCRA- <i>TCL1</i>
	t(14;14)((q11;q32)	TCRA-IGH

* La lista completa de alteraciones cromosómicas y genes implicados linfomas puede ser consultada en: (<http://www.ncbi.nlm.gov/CCAP>).

linfoblástica, confiere un pronóstico muy desfavorable. Esta observación llevaría a una actitud terapéutica distinta y más agresiva que si se detectara en el mismo diagnóstico una alteración cromosómica de buen pronóstico, como por ejemplo un cariotipo hiperdiploide de más de 50 cromosomas.

En los síndromes linfoproliferativos crónicos (SLP), debido a su bajo índice mitótico, la incidencia de anomalías citogenéticas es muy dependiente de las técnicas utilizadas para su detección⁹. La información acerca de marcadores citogenéticos en los SLP es menor¹, resultando una mayor proporción de cariotipos normales. Una de las formas de evitar esta dificultad es añadir al cultivo mitógenos (TPA, TNF, IL2, PK, entre otros), que permiten detectar con mayor frecuencia cariotipos anómalos. No obstante, mediante el uso de mitógenos puede también seleccionarse el crecimiento de la población celular no neoplásica. En el caso de los linfomas, el análisis citogenético convencional presenta más dificultades que en las leucemias: los cariotipos tienden a ser más complejos, el acceso al tejido implicado es más limitado y existen numerosos tipos histopatológicos con características clínicas distintas¹⁰. Sin embargo, los estudios que han correlacionado los marcadores citogenéticos con el pronóstico sugieren que, al igual que en las leucemias, algunas alteraciones cromosómicas en linfomas tiene significación pronóstica independiente¹¹.

En el caso de los tumores sólidos hay factores, fundamentalmente metodológicos, que han frenado la incorporación del análisis citogenético convencional a la rutina diagnóstica, que pudiera complementar al diagnóstico anatómo-patológico. Entre los obstáculos técnicos para obtener metafases analizables a partir de muestras de tumor caben destacar, entre otros: baja viabilidad celular debido a la necrosis de la muestra; necesidad de disgregación enzimática de la muestra; contaminación microbiana; "contaminación" con células normales y, por último, debido al tiempo de manifestación clínica de la mayor parte de los tumores, la ocurrencia de alteraciones cromosómicas muy complejas y variables que hacen difícil determinar el cam-

bio cromosómico primario asociado con un tipo de tumor¹² (Tabla 4).

Estos factores han llevado al desarrollo, en los últimos años, de métodos citogenéticos alternativos para identificar alteraciones cromosómicas. La incorporación de nuevas técnicas de citogenética molecular basadas en la hibridación *in situ* con fluorescencia, y la mayor coordinación y colaboración entre cirujanos, patólogos, oncólogos y genetistas ha hecho que el análisis citogenético de tumores sólidos haya experimentado un enorme avance. En el penúltimo catálogo de alteraciones cromosómicas asociadas a neoplasias¹, de 22.076 alteraciones cromosómicas descritas, un 27% corresponden a tumores sólidos, el resto a neoplasias hematológicas. Sólo 4 años después, el último catálogo recoge cerca de 100.000 alteraciones en más de 30.000 neoplasias, de los que aproximadamente 21.000 son leucemias, 3.000 linfomas y 8.100 se refieren a tumores sólidos¹³. Todas las alteraciones cromosómicas descritas en cáncer pueden ser consultadas en la base de datos del Proyecto de Alteraciones Cromosómicas en Cáncer (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCAP>).

Paralelamente a la acumulación de datos puramente citogenéticos, implicando cambios genéticos en el proceso tumoral, el desarrollo de las técnicas de genética molecular durante los años 80 (Tabla 1), han permitido conocer los mecanismos patogénicos subyacentes. Se han identificado hasta el momento 1.800 puntos de rotura en las alteraciones cromosómicas asociadas a neoplasias. Muchos de ellos han sido ya caracterizados a nivel molecular lo que ha permitido la identificación de nuevos oncogenes y genes supresores de tumores^{7,14,15}. Existen bases de datos actualizadas que permiten consultar información detallada acerca de los aproximadamente 100 genes identificados hasta el momento en las 600 reordenaciones cromosómicas equilibradas y recurrentes asociados a neoplasias humanas: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CGAP>), (<http://infobiogen.fr/services/chromcancer>).

Tabla 4. Algunas de las alteraciones cromosómicas recurrentes descritas en tumores sólidos.*

Alteraciones cromosómicas y genes implicados	
• Benignos	
adenoma de colon	+7, +8,+12, del(12q)
lipoma	t(3;12)(q27;q14)(<i>LPP-HMGIC</i>),t(1;12),t(2;12), t(5;12),del(12q),del(13q)
neuroepitelioma	t(11;22)(q24;q12)
neurinoma	-22,-Y
adenoma de ovario	+12
fibroma de ovario	+12
leiomioma de útero	r(1),t(2;12),del(7q)(q21q31),t(12;14),+12,t(12q13), 1p36,10q22,-13,-22,t(1;2),inv(X)(p22q13)
glándulas salivares	t(1;8),t(3;8)(p21;q12)(<i>CTNNB1- PLAG1</i>),t(6;8),t(8;13),del(8q),t(8;9),t(9;12),inv(12)(p13q13)
adenoma renal	-Y,+7,+17
• Malignos	
liposarcoma (mix)	t(12;16)(q13;p11),(<i>DDIT3-FUS</i>)
sarcoma sinovial	t(X;18)(p11;q11, genes <i>SYT-SSX1/2</i>)
sarcoma de Ewing	t(11;22)(q24;q12)(<i>FLI- EWS</i>),t(21;22)(q22;q12)(<i>ERG- EWS</i>),t(1;16)(q11;q11),+8
rabdomiosarcoma	t(2;13)(q35;q14)(<i>PAX3FKHR</i>),t(1;13)(p36;q14) (<i>PAX7-FKHR</i>)
condrosarcoma	-Y,t(9;22)(q22;q12)(<i>C5MF-EWS</i>)
fibrosarcoma	-Y
sarcoma (<i>clear cell</i>)	t(12;22)(q13,q12)(<i>ATF1-EWS</i>)
vejiga	+7,del(10p),i(5p),i(11p),del(11p),i(11q),13q14, LOH, 3p,12q,mutac. p53
próstata	del(10)q24,+7,-Y,ganancias:3q,7q,8q,Xq
pulmón(SCLC)	del(3)(p14p23)(<i>FHIT</i>),+7,del(5q),13q(<i>RB</i>);LOH (3p),5q,6,9p,(p16),17q,17p(p53), <i>MYC,RAS</i>
colon	del(17p),-18,dmin,LOH18q(gen <i>DCC</i>),mutac gen APC, p53,12q,17q,+12,del(1p)
riñón	del(3p),t(3;5),t(3;8),i(5p),del(6q),t(X;1)(p11;q21)(<i>TFE31-PRCC</i>),-3,+7,+8,+10,- Y, inv(7)(p15q34)+10,i(1q),del(6)(q21),1q21
útero	del(6q),del(3p),t(1;17),dmin,hsr,gen <i>AKT2,KRAS, BRCA1, OVC</i> ,+12,+7,+8
ovario	del(6q),del(3p),t(1;17),dmin,hsr,gen <i>AKT2,KRAS, BRCA1, OVC</i> ,+12,+7,+8
tiroides	inv(10)(q11q21)(<i>RET</i>),t(7;10)(q35;q21)
gliomas	+8,fusiones teloméricas,-7,-10,-22,-X,Y,del(22)q11,del(9p), amplif.12q, inactivación de <i>p53,p16, RB, PTEN</i> . Sobreexpresión de <i>CDK4,EGFR, VEGF</i>
melanoma	t(1;6),t(1;19),i(6p),+7,del(9p)(13),del(6q),1q11, del(1)(p11p22)
mesotelioma	t,dup,del,inv (3)(p21p23)
retinoblastoma	i(6p),del(13)(q14),1q,LOH13q
neuroblastoma	del(1)(p32p36),t(1;17)(p36;q14),dmin,amplif <i>NMYC</i> , ganancias 1q21-q25
testicular	i(12p)(10), amplif <i>KRAS</i>
Wilms	del(11)(p13),del(11)(p15),i(1q),t(1;16)(q10;q10),LOH 11p
mama	-17,i(1q),t(1;16),del(1q),del(3p)(p12p14),del(6q), +7,+18,+20,del,t1p, t(1q),t(7q), t(11q),dup(11q),dmin,hsr (8p),mutaciones <i>p53, BRCA1</i> ,amplificación de <i>HER2/neu</i> , amplificación 20q.

* La lista completa de alteraciones cromosómicas y genes implicados en tumores sólidos puede ser consultada en: (<http://www.ncbi.nlm.gov/CCAP>) y (http://www.helsinki.fi/~igl_www/CMG.html).

Así, cada día son más conocidas las alteraciones citogenéticas responsables de la transformación neoplásica, y los mecanismos moleculares que subyacen. En los linfomas, las translocaciones t(8;14), t(14;18), t(11;14) asociadas a linfomas de Burkitt, folicular y del manto, respectivamente, han permitido localizar y aislar los oncogenes implicados en estas patologías: *c-MYC*^{16,17}, *BCL2*^{18,19} y *BCL1*²⁰. En estos casos, el mecanismo molecular subyacente consiste en la activación de estos protooncogenes por yuxtaposición con secuencias reguladoras de un gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IGH), provocando una sobreexpresión de la proteína codificada por el protooncogén²¹.

La translocación t(9;22) asociada a leucemia mieloide crónica (LMC) permitió describir otro mecanismo molecular. En este caso se produce la activación oncogénica por la translocación del oncogén *ABL* con el oncogén *BCR*, formando un gen de fusión híbrido *BCR-ABL*²² que codifica para una proteína quimérica con potencial neoplásico. Este mecanismo es muy frecuente en numerosas translocaciones descritas en leucemias y sarcomas^{23, 24}.

La activación de un protooncogén puede darse no sólo por translocaciones cromosómicas sino por amplificación génica como en el caso de los genes *REL* y *c-MYC*²⁵ o *ERBB2*²⁶.

Por último, otro tipo de alteración citogenética frecuente en neoplasias es la deleción cromosómica que a nivel molecular puede ser un mecanismo de inactivación de genes supresores tumorales. Por ejemplo, deleciones del brazo corto del cromosoma 17 provocan pérdida de un alelo del gen *TP53*, y si el otro alelo está mutado el gen se inactiva²⁷.

En resumen, el enorme avance en el conocimiento de las alteraciones cromosómicas recurrentes en cáncer ha permitido, no sólo conocer la importancia clínica de dichas alteraciones, sino también, caracterizar molecularmente muchas de ellas, identificando y clonando los genes implicados¹³ (Tablas 2, 3, 4). El descubrimiento de nuevos genes que participan en la génesis y progresión tumoral permitirá cono-

cer mejor la biología del tumor, y hará posible el diseño de nuevas estrategias terapéuticas y de nuevos análisis moleculares para el correcto diagnóstico y monitorización de los pacientes.

TÉCNICAS DE ANÁLISIS GENÉTICO

De todas las técnicas genéticas que existen, tanto citogénicas como estrictamente moleculares, describiremos las características, ventajas y limitaciones, sólo de aquellas que se han incorporado como rutina diagnóstica: cariotipo, hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH convencional), y reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y de algunas de las que todavía son utilizadas como investigación: hibridación genómica comparada (CGH), cariotipo espectral (SKY-FISH) y multiplex-FISH (M-FISH).

ANÁLISIS CITOGENÉTICO

Citogenética convencional (cariotipo de bandas G)

El análisis citogenético convencional consiste en el estudio de las alteraciones cromosómicas en las metafases de las células neoplásicas obtenidas tras el cultivo "in vitro", a corto plazo y sin mitógenos de células de médula ósea, sangre periférica, ganglios, biopsias, etc. El estudio de la morfología de los cromosomas, teñidos fundamentalmente con bandas G (Tripsina-Giemsa), permite detectar en un único experimento, tanto las alteraciones numéricas (monosomías, trisomías, etc.), como las estructurales (translocaciones, inversiones, deleciones, etc.) presentes en todo el genoma.

Citogenética molecular (hibridación "in situ" con fluorescencia)

Las técnicas de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) se basan en la hibridación de una sonda de ADN marcada con una sustancia fluorescente sobre su secuencia complementaria del genoma, bien en la metafase cromosómica o en el núcleo en interfase. Las técnicas de FISH vienen utilizándose desde los años 80²⁸, si bien no se han incorporado en todos los laboratorios de genética como rutina. La alta sensibilidad y especificidad del FISH y

la rapidez de los ensayos han hecho de esta técnica una importante estrategia diagnóstica con numerosas aplicaciones²⁹. Por otra parte, otras técnicas derivadas del FISH han progresado hasta tal punto que hoy es posible, como veremos más adelante, utilizar simultáneamente 24 sondas de pintado cromosómico, consiguiendo identificar cada cromosoma por su color. Entre las técnicas derivadas del FISH convencional, cabe destacar, la hibridación genómica comparada (CGH), de enorme utilidad en tumores sólidos y el cariotipo multicolor (SKY-FISH y M-FISH). Todas ellas, constituyen una nueva disciplina a la que se ha denominado "citogenética molecular", que complementan, pero nunca excluyen al análisis citogenético convencional (cariotipo de bandas G).

FISH convencional

Los dos componentes principales de la técnica de FISH convencional son la sonda de ADN marcada con fluorescencia y la secuencia diana en la muestra tumoral para la cual es específica. Es muy importante destacar que no es una técnica de búsqueda de nuevas alteraciones cromosómicas, sino que detecta únicamente aquello que buscamos. El resto del genoma permanece oculto.

Podemos utilizar sondas de ADN de distintos tipos: centroméricas (marcan únicamente las zonas centroméricas), de pintado cromosómico (marcan todo un cromosoma) o de secuencias específicas de locus (marcan regiones cromosómicas de secuencia única).

Esta técnica complementa perfectamente a la citogenética convencional en todas aquellas situaciones en las que no ha sido posible realizar un cariotipo: al disponer de metafases de poca calidad, o no haber obtenido metafases, o bien en los casos en los que las alteraciones cromosómicas asociadas a un diagnóstico son crípticas no visibles en el cariotipo, como el caso de la t(12;21) en leucemia aguda linfoblástica infantil.

CGH (hibridación genómica comparada)

Como ya se ha mencionado, uno de los mayores problemas a los que se enfrenta la

citogenética convencional, es la ausencia de metafases y su gran ventaja reside en ser una técnica que permite analizar todo el genoma. La técnica de FISH convencional ha resuelto el primer problema, ya que permite analizar núcleos en interfase, pero en cambio su gran limitación es que no es una técnica de screening, como el cariotipo, ya que sólo detecta las alteraciones que buscamos. A principio de los 90, y con especial aplicación en tumores sólidos, en donde obtener metafases de calidad es a menudo complicado, se describió una nueva técnica de citogenética molecular: la hibridación genómica comparada (CGH)³⁰. Esta técnica emplea ADN del tumor y, además, no analiza metafases, obviando la necesidad de células en crecimiento.

Esta técnica derivada del FISH se basa en la hibridación competitiva de dos ADNs, (tumoral y control normal) marcados con distintos fluorocromos, sobre cromosomas normales. En resumen: se marca el ADN del tumor con un fluorocromo verde y un ADN normal (control) con un fluorocromo rojo. Ambos ADNs se mezclan en cantidades equimolares y se realiza una hibridación *in situ* sobre cromosomas metafásicos normales. Ambos ADNs compiten por hibridar en los mismos lugares cromosómicos. En condiciones normales (tumor sin alteraciones genéticas), como la cantidad de ADN marcado en rojo y verde es la misma, el resultado final son cromosomas amarillos (mezcla 1:1 de rojo y verde). En condiciones patológicas, si el tumor contiene alguna ganancia cromosómica, la cantidad de ADN tumoral disponible para hibridar es mayor, y la hibridación de esa zona resultará en una mayor proporción de fluorocromo del tumor (verde). Al contrario, si el tumor contiene una delección (pérdida), la región delecionada del tumor aparecerá en rojo, ya que habrá más cantidad de ADN normal (rojo) para hibridar en esa región cromosómica. La CGH permite, por tanto, la detección de ganancias y pérdidas de regiones cromosómicas en todo el genoma del tumor por la comparación de las intensidades de las señales de hibridación.

La CGH ha contribuido significativamente al conocimiento actual de las altera-

ciones genómicas en las neoplasias humanas. Además de definir patrones de ganancias y pérdidas específicas de tumor, proporciona información para la identificación de nuevos genes implicados en el cáncer. Actualmente esta técnica se utiliza sobre todo para detectar alteraciones cromosómicas en tumores sólidos, donde la obtención de metafases presenta muchas dificultades técnicas. En sólo 8 años desde su aparición, se han publicado más de 3.900 trabajos de CGH en tumores³¹⁻³⁵, de los que sólo 1/10 corresponden a leucemias y linfomas³⁶. En neoplasias hematológicas, la CGH está casi restringida a síndromes linfoproliferativos crónicos, ya que en éstos, el índice mitótico de las células tumorales es generalmente muy bajo³⁷.

Todas las alteraciones cromosómicas, ganancias y pérdidas, descritas en cáncer por CGH pueden ser consultadas en la base de datos actualizada de la Universidad de Helsinki (http://www.helsinki.fi/~lgl_www/CMG.html).

Cariotipo multicolor (SKY-FISH y M-FISH)

El cariotipo espectral (SKY-FISH)³⁸ y el multi-FISH (M-FISH)³⁹ son técnicas de citogenética molecular desarrolladas recientemente, y de momento sólo se utilizan en el campo de la investigación. Su fundamento técnico es sencillo. En resumen: consiste en marcar el ADN de cada cromosoma con uno o varios fluorocromos, de manera que el espectro de emisión de cada cromosoma sea único y diferenciable de los demás. Esta técnica, por tanto, pinta a cada cromosoma de un color. Con el "cocktail" de 24 sondas de pintado cromosómico obtenido tras el marcaje, se hibrida sobre los cromosomas de las metafases del tumor, el cromosoma anómalo aparecerá no uniforme, sino con los colores de los cromosomas que intervienen en la translocación. Por tanto, es una forma de realizar un cariotipo, pero teñido no con bandas G sino con colores, de forma que podamos clasificar las alteraciones de forma unívoca.

El cariotipo multicolor se ha mostrado muy útil en neoplasias hematológicas, donde no es difícil obtener metafases tumorales. Se han podido caracterizar

correctamente translocaciones complejas, y también detectar alteraciones cromosómicas crípticas en cariotipos aparentemente normales. Esto ha permitido identificar un gran número de nuevas alteraciones cromosómicas (Fig. 1), lo que ha facilitado la búsqueda de nuevos genes implicados^{40,41}. Su uso en tumores sólidos es más limitado por la necesidad de obtener metafases de calidad, aunque de todo lo expuesto, es la única técnica que permitirá averiguar el origen de las múltiples alteraciones cromosómicas que habitualmente aparecen en los cariotipos de tumores sólidos. No obstante, las aplicaciones de esta técnica son crecientes^{42,43}, y ya son cerca de 700 casos las neoplasias humanas analizadas por SKY-FISH, de las cuales 410 son leucemias y linfomas y 146 tumores sólidos. La dirección: <http://www.spectral-imaging.com>, proporciona información técnica, un sumario de aplicaciones y una lista actualizada de publicaciones relevantes sobre el cariotipo espectral.

Las mejoras técnicas del cariotipo multicolor avanzan con gran rapidez y ya se está optimizando el M-FISH con bandas multicolor⁴⁴.

ANÁLISIS MOLECULAR

La técnica que habitualmente se emplea, a nivel no sólo diagnóstico, sino en la monitorización de pacientes con neoplasias es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Cuando los genes son de gran tamaño con puntos de rotura variables o en aquellos casos de genes muy promiscuos (*MLL* y *BCL6*, entre otros), se prefiere el Southern Blot o el FISH convencional.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Desde su descripción en 1985 por Kary Mulis, la PCR probablemente representa uno de los más importantes avances metodológicos en biología molecular. Esta técnica, que tiene multitud de aplicaciones, permite amplificar secuencias específicas de ADN o ARN multiplicando por 10⁶ el número de copias que podemos obtener de un determinado fragmento de ADN.

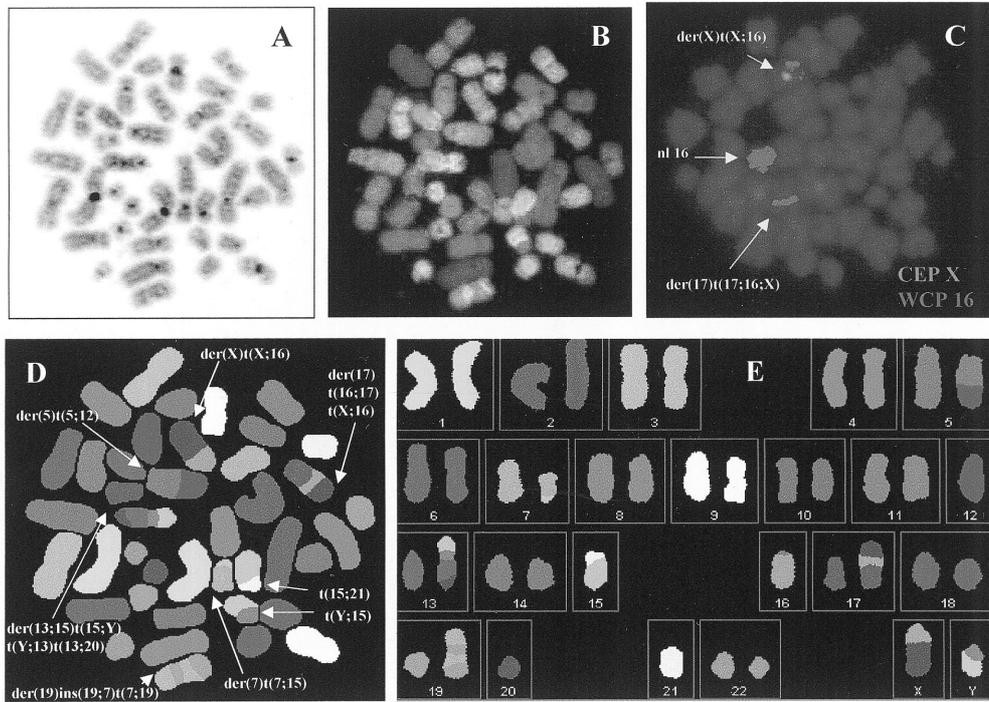


Figura 1. Análisis de un caso con LMA-M4 que presentó un cariotipo complejo, mostrando las imágenes DAPI (A), espectral (B) y classified (D, E) del análisis de SKY, y los resultados de FISH utilizando la sonda centromérica CEP X y la sonda de pintado cromosómico WCP 16 (C). Las flechas indican los cromosomas con reordenaciones (imagen cedida por MD Otero del Departamento de Genética de la Universidad de Navarra)

Una de las aplicaciones más frecuentemente empleadas de la PCR en neoplasias es detectar translocaciones. La caracterización molecular de las translocaciones cromosómicas observadas en el cariotipo y asociadas a determinados tipos de tumor, ha permitido la identificación de los genes responsables. La posterior clonación y secuenciación de dichos oncogenes permiten el estudio de las translocaciones a nivel molecular, mediante el análisis de ADN o fundamentalmente ARN con la técnica de la RT-PCR (PCR reversa).

Un ejemplo característico sería analizar la reordenación *BCL2-IGH* asociada a linfoma folicular. Actualmente, su uso es necesario como complemento al cariotipo o al FISH convencional en el diagnóstico y

en la monitorización de pacientes con neoplasias^{4,23}.

Aunque la mayor parte de los análisis mediante PCR son cualitativos, indicando sólo ausencia o presencia de la alteración, en la monitorización de la respuesta al tratamiento o de la EMR es importante la cuantificación de ésta mediante PCR en tiempo real (real-time PCR)⁴⁵, en la que se detecta el producto específico a medida que se produce, de manera que la comparación de su nivel de amplificación con los estándares adecuados proporciona una medida cuantitativa del grado de afectación.

Además de la PCR utilizada en la rutina diagnóstica para la detección de translocaciones

ciones, existen otras muchas técnicas moleculares de gran interés en la genética del cáncer. Entre ellas, el análisis de mutaciones de genes supresores tumorales y oncogenes o la tecnología de microarrays que, aunque de momento, se utilizan como investigación, en un futuro no muy lejano con la aplicación de nuevos sistemas robotizados como los chips o microarrays de ADN, permitirán el análisis simultáneo de un gran número de genes y de sus niveles de expresión en una muestra. La aplicación de estos nuevos sistemas diagnósticos permitirá establecer terapias específicas, de acuerdo a la alteración molecular detectada^{46,47}.

CONCLUSIONES

Vista la utilización, ventajas e inconvenientes de todos los análisis genéticos que pueden contribuir al diagnóstico y pronóstico del cáncer, puede concluirse que actualmente las numerosas técnicas genéticas son complementarias y nunca excluyentes. Este hecho hay que tenerlo en cuenta, para evitar redundancias, y una utilización inadecuada de las mismas. Y en mi opinión, después de varios años de experiencia en el servicio de citogenética, considero muy importante, que el resultado de cualquier análisis genético, sea comentado entre el clínico y el genetista, para evaluar el grado de concordancia clínico-genética. Sólo así trabajando coordinados, poco a poco conoceremos con más profundidad la significación clínica de las alteraciones genéticas del cáncer y los genes implicados. Todo ello contribuye al desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico más precisas, y de nuevas terapias específicas, más efectivas y menos tóxicas para, en definitiva, mejorar la supervivencia de los pacientes.

Agradecimientos

A todo el equipo del servicio de citogenética de la Universidad de Navarra: M.D. Odero, N. San José, C. Ferreira, A. Díaz, I. Zudaire, I. Martín-Subero, I. Lahortiga, M. Valgañón, M. García-Delgado, J.L. Vizmanos, M.J. Larráyo y F.J. Novo por su valiosa colaboración en la crítica del manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

1. MITELMAN F. Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer. New York, NY, Wiley-Liss Inc 1998.
2. ROWLEY JD. Cytogenetic analysis in leukemia and lymphoma: an introduction. *Semin Hematol* 2000; 37: 315-319.
3. PATEL AS, HAWKINS AL, GRIFFIN CA. Cytogenetics and cancer. *Curr Opin Oncol* 2000; 12: 62-67.
4. LINDBLOM A, LILJEGREN A. Tumour markers in malignancies. *Br Med J* 2000; 320: 424-427.
5. NOWELL PC, HUNGERFORD DA. A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science* 1960; 132: 1497.
6. CASPERSSON T, ZECH L, JOHANSSON C. Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res* 1970; 60: 315-319.
7. MITELMAN F, MERTENS F, JOHANSSON B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat Genet* 1997; Spec No: 417-474.
8. GRIMWADE D, WALKER H, OLIVER F, WHEATLEY K, HARRISON C, HARRISON G et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 1998; 92: 2322-2333.
9. ROULSTON D, LE BEAU M. Cytogenetic analysis of hematologic malignant diseases, en: Barch M, Knutsen T, Spurbeck JL, editores. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. Philadelphia: Lippincott-Raven (3ªed), 1997: 325-350.
10. HARRIS NL, JAFFE ES, STEIN H, BANKS PM, CHAN JK, CLEARY ML et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994; 84: 1361-1392.
11. ONG ST, LE BEAU MM. Chromosomal abnormalities and molecular genetics of non-Hodgkin's lymphoma. *Semin Oncol* 1998; 25: 447-460.
12. THOMPSON FH. Cytogenetic Methods and findings in human solid tumors. En: Barch M, Knutsen T, Spurbeck JL, editores. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. Philadelphia: Lippincott-Raven (3ªed), 1997: 375-408.
13. MITELMAN F. Recurrent chromosome aberrations in cancer. *Mutat Res* 2000; 462: 247-253.

14. HEIM S, MITELMAN F. *Cancer Cytogenetics* (2^{ed}). New York: Wiley-Liss Inc., 1995.
15. KIRSCH IR, RIED T. Integration of cytogenetic data with genome maps and available probes: present status and future promise. *Semin Hematol* 2000; 37: 420-428.
16. DALLA-FAVERA R, BREGNI M, ERIKSON J, PATTERSON D, GALLO RC, CROCE CM. Human c-myc oncogene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79: 7824-7827.
17. TAUB R, KIRSCH I, MORTON C, LENOIR G, SWAN D, TRONICK et al. Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79: 7837-7841.
18. MOTOKURA T, BLOOM T, KIM HG, JUPPNER H, RUDERMAN JV, KRONENBERG HM, et al. A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature* 1991 Apr 11; 350: 512-515.
19. ROSENBERG CL, WONG E, PETTY EM, BALE AE, TSUJIMOTO Y, HARRIS NL, et al. PRAD1, a candidate BCL1 oncogene: mapping and expression in centrocytic lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 9638-9642.
20. TSUJIMOTO Y, COSSMAN J, JAFFE E, CROCE CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985; 228: 1440-1443.
21. WILLIS TG, DYER MJ. The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. *Blood* 2000; 96: 808-822.
22. ROWLEY JD. The Philadelphia chromosome translocation. A paradigm for understanding leukemia. *Cancer* 1990; 65: 2178-2184.
23. RABBITTS TH. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 1994; 372: 143-149.
24. RABBITTS TH. The clinical significance of fusion oncogenes in cancer. *N Engl J Med* 1998; 338: 192-194.
25. RAO PH, HOULDSWORTH J, DYOMINA K, PARSA NZ, CIGUDOSA JC, LOUIE DC et al. Chromosomal and gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1998; 92: 234-40.
26. SLAMON DJ, CLARK GM, WONG SG, LEVIN WJ, ULLRICH A, MCGUIRE WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235: 177-182.
27. IMAMURA J, MIYOSHI I, KOEFFLER HP. p53 in hematologic malignancies. *Blood* 1994; 84: 2412-2421.
28. LANGER PR, WALDROP AA, WARD DC. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 6633-6637.
29. GOZZETTI A, LE BEAU MM. Fluorescence in situ hybridization: uses and limitations. *Semin Hematol* 2000; 37(4): 320-333.
30. 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.
31. FOROZAN F, KARHU R, KONONEN J, KALLIONIEMI A, KALLIONIEMI OP. Genome screening by comparative genomic hybridization. *Trends Genet* 1997; 13: 405-409.
32. KNUUTILA S, AALTO Y, AUTIO K, BJORKQVIST AM, EL-RIFAI W, HEMMER S et al. DNA copy number losses in human neoplasms. *Am J Pathol* 1999; 155: 683-694.
33. KNUUTILA S, BJORKQVIST AM, AUTIO K, TARKKANEN M, WOLF M, MONNI O et al. DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. *Am J Pathol* 1998; 152: 1107-1123.
34. ZITZELSBERGER H, LEHMANN L, WERNER M, BAUCHINGER M. Comparative genomic hybridisation for the analysis of chromosomal imbalances in solid tumours and haematological malignancies. *Histochem Cell Biol* 1997; 108: 403-417.
35. GEBHART E, LIEHR T. Patterns of genomic imbalances in human solid tumors. *Int J Oncol* 2000; 16: 383-399.
36. LICHTER P, JOOS S, BENTZ M, LAMPEL S. Comparative genomic hybridization: uses and limitations. *Semin Hematol* 2000; 37: 348-357.
37. BENTZ M, HUCK K, DU MANOIR S, JOOS S, WERNER CA, FISCHER K et al. Comparative genomic hybridization in chronic B-cell leukemias shows a high incidence of chromosomal gains and losses. *Blood* 1995; 85: 3610-3618.
38. SCHROCK 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.
39. SPEICHER MR, GWYN-BALLARD S, WARD DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 1996; 12: 368-375.
40. RAO PH, CIGUDOSA JC, NING Y, CALASANZ MJ, IIDA S, TAGAWA S et al. Multicolor spectral karyotyping identifies new recurring breakpoints and translocations in multiple myeloma. *Blood* 1998; 92: 1743-1748.

41. SAWYER JR, LUKACS JL, MUNSHI N, DESIKAN KR, SINGHAL S, MEHTA J et al. Identification of new nonrandom translocations in multiple myeloma with multicolor spectral karyotyping. *Blood* 1998; 92: 4269-4278.
42. SCHROCK E, PADILLA-NASH H. Spectral karyotyping and multicolor fluorescence in situ hybridization reveal new tumor-specific chromosomal aberrations. *Semin Hematol* 2000; 37: 334-347.
43. VELDMAN T, VIGNON C, SCHROCK E, ROWLEY JD, RIED T. Hidden chromosome abnormalities in haematological malignancies detected by multicolour spectral karyotyping. *Nat Genet* 1997; 15): 406-410.
44. MULLER S, ROCCHI M, FERGUSON-SMITH MA, WIENBERG J. Toward a multicolor chromosome bar code for the entire human karyotype by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 1997; 100: 271-278.
45. WITTEWER CT, HERRMANN MG, MOSS AA, RASMUSSEN RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997; 22: 130-138.
46. GOING JJ, GUSTERSON BA. Molecular pathology and future developments. *Eur J Cancer* 1999; 35: 1895-1904.
47. LANDER ES. Array of hope. *Nat Genet* 1999; 21(1 Suppl): 3-4.