

APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE FISH EN PATOLOGÍA

Dr. Ángel Concha López

Jefe Servicio Anatomía Patológica

H. U. Virgen de las Nieves. Granada

El mejor conocimiento de los mecanismos moleculares responsables de numerosas enfermedades y la adaptación de técnicas de Biología Básica a las propias de la Anatomía Patológica, han hecho posible que determinados estudios y ensayos que estaban excluidos de la cartera de servicios de un Laboratorio de Patología, puedan ser ahora incorporadas como parte de la oferta de nuestra especialidad, añadiendo un valor extra al diagnóstico molecular: la conjunción de la morfología de la lesión, materia en la que somos exclusivamente expertos, y los datos obtenidos por el ensayo realizado sobre la muestra.

Este hecho devuelve a la Patología el terreno, de alguna forma perdido en el pasado, ya que el diagnóstico en el sentido amplio del término, debe ser la conjunción de los hallazgos morfológicos (macro y microscópicos) y los moleculares asociados a los datos clínicos. En este sentido, son las técnicas de Hibridación in situ Fluorescente (FISH) uno de los mejores ejemplos, ya que es imprescindible el reconocimiento histológico del tejido para identificar qué tipo de células (endotelios, linfocitos, células neoplásicas,..) y en qué localizaciones topográficas (lesiones proliferativas, compartimento intravascular, componente "intraepitelial", estroma, ..) poseen las alteraciones citogenéticas que estamos estudiando, con la dificultad añadida de realizar el estudio sobre un fondo de

campo oscuro, que exige un mayor nivel de destreza y experiencia.

Aunque es posible realizar ensayos de FISH con metodología propia y reactivos preparados por nosotros mismos, que pueden ser contrastados y útiles en investigación, a efectos de diagnóstico clínico, es importante emplear kits que aseguren la estandarización de la técnica, la normalización de la fabricación de los componentes, y la garantía de la reproducibilidad de los resultados, evitando la variabilidad que presentan muchas de las técnicas realizadas en nuestros laboratorios.

Las técnicas de Hibridación "in situ" que utilizan cromógenos no fluorescentes (CISH), poseen características y posibilidades similares, con la ventaja de ofrecer preparaciones permanentes y con una mejor representación microscópica de la lesión, aunque el espectro de aplicaciones es inferior ya que no se pueden realizar técnicas de marcaje múltiple ni los complejos sistemas de análisis de imagen y aplicaciones informáticas aptos para metodologías con fluorocromos.

La existencia de kits que cumplen las normas de garantía de calidad exigidas y la adaptación de las técnicas a sistemas automatizados similares a los inmunoteñidores actuales, están permitiendo que podamos incorporar el FISH sin sobrecarga apreciable de trabajo en el laboratorio, en cuanto a recursos humanos se refiere, y probablemente, con una buena relación coste-efectividad atendiendo al proceso diagnóstico-terapéutico en su conjunto.

Las técnicas de FISH tienen dos características comunes; a) el uso de sondas específicas optimizadas para su hibridación con las secuencias diana en un sustrato sólido (una preparación de tejido/células sobre un portaobjetos) y b) el uso de sondas o reactivos conjugados con fluorocromos que permiten evidenciar al microscopio el resultado del ensayo (visualización).

Por ello, dependiendo del tipo de alteración a estudiar y de la muestra (corte de parafina, tejido congelado, extensiones celulares,...) debemos diseñar el ensayo más conveniente.

Sin entrar en consideraciones técnicas específicas, sólo apuntamos unos pasos indicativos básicos, en gran medida similares a los seguidos en técnicas de inmunohistoquímica (IHQ).

Corte del tejido sobre portas tratados con adhesivo tisular

Desparafinización (cuando sea tejido embebido)

Pretratamiento y acondicionamiento del tejido y digestión enzimática

Desnaturalización del ADN celular

Hibridación con la sonda específica conjugados con fluorocromos, (en técnicas directas e Incubación con reactivo "puente" conjugado con el fluorocromo en técnicas indirectas)

Lavado posthibridación

Contratinción nuclear y montaje del cubreobjetos

Visualización con microscopio de epifluorescencia y captura de imágenes

La variedad y tipos de sondas es grande así como el catálogo de marcadores fluorescentes. Esto permite emplear un

número importante de sondas marcadas con distintos fluorocromos y realizar técnicas de marcaje múltiple capaces de aportar información que no puede ser obtenida por sumación de otros métodos más "simples". Este hecho ha permitido diseñar procedimientos complejos que permiten estudiar la carga cromosómica de una célula o globalmente la del tejido al completo, como son el FISH multicolor o la Hibridación Comparativa Genómica (CGH), esta última puede ser además aplicada en tejido parafinado, ya que se realiza sobre células en interfase (y no en metafase como en procedimientos de cariotipado convencional)

Este hecho supone una gran ventaja para los laboratorios de Patología pues, además, permite realizar estudios retrospectivos con material archivado. No obstante, estas técnicas se consideran estudios genéticos, por lo tanto, es necesario observar los principios éticos y respetar el marco jurídico que regula estos estudios especialmente sobre muestras custodiadas en los servicios de Patología y obtenidas sin consentimiento informado específico para la realización de las mismas.

Las aplicaciones del FISH se desprenden directamente de su función: la localización topográfica de una secuencia de ADN específica en un gen/cromosoma. Por tanto, son útiles en estudios para determinar la existencia de amplificaciones, traslocaciones o, deleciones. Por el contrario, el FISH no sirve para identificar mutaciones puntuales o inversiones.

En la actualidad, la disponibilidad de sondas específicas delimita el uso de FISH. Así, los principales terrenos en los que la Patología encuentra utilidad en la aplicación de estas

técnicas son la Hematopatología y la Oncología en general, aunque otros campos, como el de la Patología de Trasplante o la Infecciosa, también pueden utilizar estos métodos. Por otra parte, otras disciplinas en las que el FISH juega un papel crucial, como en el de la Citogenética (diagnóstico de anomalías cromosómicas asociadas a enfermedades hereditarias, diagnóstico preimplantatorio,..) no son de interés en el actual momento para la Anatomía Patológica, aunque se realicen trabajos diferentes, como los estudios cromosómicos en casos de enfermedad trofoblástica, y seguramente en el futuro, también se abran líneas de trabajo en este terreno (estudios de fusión celular,...)

Probablemente sea la Hematopatología el campo en el que se tenga una mayor experiencia en lo que a aplicación del FISH en el diagnóstico clínico, ya que se vienen realizando ampliamente en extensiones de sangre periférica o de aspirados de médula ósea. Recientemente se están aplicando a tejido incluido en parafina, especialmente en el estudio de procesos linfoproliferativos.

Los estudios de FISH más frecuentemente realizados y las principales entidades (no todas) en las que están indicados son, en general los que se describen a continuación, y para ello se utilizan diferentes tipos de sondas según la localización cromosómica que abarcan:

Sondas de pintado cromosómico (WCP).

Sondas centroméricas (CEP).

Sondas de locus específico (LSI).

Sondas teloméricas (Televisión).

Existen sondas para técnicas de rotura que están diseñadas para la detección de alteraciones específicas. Estas sondas abarcan con dos fluorocromos todo el gen. El patrón de normalidad obtenido son dos señales de color juntas, y la separación de ambos colores indicaría la rotura de dicho locus apareciendo los dos fluorocromos separados. Hay otras sondas que marcan en colores distintos genes localizados también en locus separados, en este caso el patrón de normalidad son los dos colores separados, apareciendo fusionados cuando el reordenamiento implica a ambos. A continuación se describen algunos ejemplos:

Traslocaciones:

- bcl-1: t(11;14): Linfoma del Manto

La sonda de elección es la de locus específico, t (11;14) IgH /CCDN1.

- bcl-2: t(14;18)(q32 ;q21): Linfoma Folicular

La sonda de elección es del locus específico t(14 ;18) IgH/BCL2.

- ALK: t (2;5): Linfoma Anaplásico

La sonda de elección de locus específico ALK (reord. 2p23), esta sonda está diseñada para detectar reordenamientos 2p23 en linfomas anaplásicos de células grandes que ocurren en la t (2; 5) y además todos los reordenamientos cromosómicos que impliquen a la región 2p23.

- MALT1 t(11 ;18) : Linfoma Malt

Esta traslocación puede ser detectada con la sonda de locus específico MALT1 (18q21), esta sonda detecta los reordenamientos del gen MALT.

También se puede utilizar la sonda de locus específico t (11;18) API 2/ MALT 1.

- c-myc: t(8;14), t(2;8), t(8;22): Linfoma de Burkitt

La sonda utilizada en este caso es de locus específico MYC, esta sonda detecta los reordenamientos 8q24 que implican al gen MYC.

- bcr/abl: t(9 ;22) : Leucemia Mieloide Crónica

La sonda de elección es de locus específico t (9;22) BCR/ABL es una mezcla de sonda de locus específico, ABL marcada con un fluorocromo y la sonda de locus específico BCR marcada con otro fluorocromo. En caso de translocación, los dos fluorocromos aparecen juntos, al contrario que en las sondas de rotura.

Otras alteraciones relevantes, son :

- Trisomía 8 : Leucemia Linfática Crónica de mal pronóstico.

La sonda de elección es una sonda centromérica del cromosoma 8. Es una sonda a-satélite que hibrida la región centromérica del cromosoma 8. También puede utilizarse otra estrategia, diseñada para la detección y cuantificación de los loci 8p22 (gen lipoproteínlipasa) y c-myc 8q24. En este caso se puede utilizar tres sondas para el análisis simultáneo de los tres marcadores: una sonda centromérica del cromosoma 8 a-satélite, otra sonda de locus específico del gen lipoproteínlipasa y otra también de locus específico para el gen c-MYC.

- Trisomía 2 : Linfoma Anaplásico ALK-negativo.

La sonda de elección es una sonda de locus específico ALK que detecta ese gen.

- Amplificación c-myc: Leucemia Linfoblástica

La sonda de elección es una sonda de locus específico c-MYC (8q 24.2-q24.3) que puede identificar amplificaciones de este gen.

- Delección de 5q: Un tipo específico de Síndrome Mielodisplásico

La sonda de elección es una sonda de locus específico EGR1 (5q31) que detecta delecciones de 5q31.

En el terreno de la Oncología no hematológica, destacamos:

- HER 2: Amplificación en cáncer de mama.

La sonda utilizada en este caso es una sonda de locus específico para el gen HER 2/neu, y una sonda centromérica del cromosoma 17.

- EGFr: Amplificación en cáncer de cabeza y cuello, pulmón, colon

La sonda de elección es una sonda de locus específico para EGFr diseñada para cuantificar el número de copias de dicho gen localizado en el 7p12. Es una mezcla de dos sondas de locus específico, EGFr y CEP 7.

- c-myc: Amplificación en cáncer de mama, de pulmón

La sonda de elección es una sonda de locus específico c-MYC (8q 24.2-q24.3) que puede identificar amplificaciones de este gen.

- 3p: Delección en los Carcinomas de Células Renales

La sonda de elección en este caso puede ser una sonda de pintado cromosómico para el cromosoma 3 que hibrida en el

brazo 3p, el brazo 3q y el centrómero del cromosoma 3 humano. La intensidad de fluorescencia es moderada a lo largo de todo el cromosoma 3 y las bandas 3p21 y 3p11 pueden aparecer ligeramente menos intensas.

- Cromosomas 2, 8,10 y 17: Delecciones en Carcinomas de Células Cromófobas.

Las sondas de elección en el caso de la detección de cromosomas concretos, son sondas centroméricas, son secuencias específicas de ADN que hibridan en zonas concretas de estos cromosomas normalmente localizados en el centrómero. Estas sondas permiten la identificación y enumeración de cromosomas en células en interfase y en metafase.

- Alteraciones en Carcinomas Transicionales de Vejiga. Se puede utilizar en este caso, una mezcla de cuatro sondas centroméricas y de locus específico, para los cromosomas 3, 7 y 17 y otra sonda de locus específico para el 9p21.

- LOH 19q: Gliomas primarios.
- N-myc: Amplificación en neuroblastomas.

En este caso se utiliza una sonda de locus específico para el gen N-myc (2p23p24) con la que se detecta el número de copias del gen.

- EWS-WT1: t(11;22): Tumor Desmoplásico Intrabdominal de Células Pequeñas.
- EWS-FLI1: t(11;22): Sarcoma de Ewing, PNETs.

Para ambos casos la sonda de elección es de locus específico, EWSR1 (22q12), que detecta los reordenamientos de dicho locus.

- Topoisomerasa II Alfa :17q : Amplificación en tumores sensibles a Antraciclinas.

La sonda de elección es la sonda de locus específico para el gen de la Topoisomerasa II y otra sonda centromérica para el cromosoma 17.

Otras aplicaciones son:

- Centrómeros: para determinar aneusomías cromosómicas. Para ello se utilizan sondas centroméricas en función del cromosoma que se quiere detectar.

- Telómeros: para determinar la actividad telomerasa. Las sondas utilizadas para la detección de desórdenes, en los que están implicadas las zonas teloméricas y subteloméricas de cualquier cromosoma, se denominan sondas teloméricas.

- Cromosomas X, Y: En estudios de Transgénesis, Fusión Celular, Se utiliza una sonda a-satélite para la región centromérica del cromosoma X y una sonda satélite III para la región Yq12 del cromosoma Y.

Por todo ello, en un futuro próximo es lógico pensar que las técnicas de FISH se implanten en los laboratorios de Patología como ocurrió hace un par de décadas con las técnicas de IHQ. Así, debemos preparar nuestros departamentos en lo que a recursos materiales y humanos se refiere, y muy especialmente, realizar una adaptación de nuestra mentalidad a las nuevas

exigencias. Según el perfil y nivel de cada laboratorio, debemos disponer de una batería básica de estudios de FISH que hayan demostrado un alto nivel de evidencia científica en el diagnóstico-pronóstico de las entidades objeto de estudio de la Anatomía Patológica.