

APLICACIONES DIAGNÓSTICAS DEL FISH EN PATOLOGÍA

FISH EN TUMORES DE UROTELIO: UROVYSION^â

Dra. Blanca Espinet. Servicio de Patología. Hospital del Mar-IMAS. Barcelona

Dr. José Placer. Servicio de Urología. Hospital del Mar-IMAS. Barcelona

Los tumores que surgen en la mucosa urotelial que recubre la vejiga urinaria, los uréteres y la pelvis renal se conocen como carcinomas uroteliales y representan el tipo de neoplasia más común de la vejiga y el tracto urinario superior. La mayoría de casos aparecen en la vejiga, aunque el 5% de ellos se encuentran en la pelvis renal y en los uréteres. En la vejiga, podemos encontrar dos tipos de carcinoma urotelial: el carcinoma de vejiga superficial y el carcinoma de vejiga invasivo (que invade la muscularis). En el segundo caso, a los pacientes se les realiza una cistectomía radical para prevenir el cáncer de vejiga metastásico. Sin embargo, los carcinomas superficiales se siguen en intervalos regulares para controlar las recurrencias y la progresión, con cistoscopia y citología. Numerosos estudios han demostrado que la citología es una técnica altamente específica pero que presenta una baja sensibilidad en la detección del cáncer de vejiga. Además, la sensibilidad de esta técnica está muy influenciada por la experiencia del observador¹. Además de la citología, se han desarrollado muchos tests de citometría de flujo (BTA-STAT, NMP22, productos de degradación de fibrina), la base de los cuales es la detección de antígenos que se encuentran en niveles elevados en la orina de los pacientes con carcinoma urotelial. Muchos de estos tests presentan una elevada sensibilidad pero una baja especificidad respecto a la citología².

Durante los últimos 20 años, los conocimientos de las alteraciones genéticas que se asocian a la aparición y a la progresión del carcinoma urotelial han aumentado enormemente. Las deleciones de parte del cromosoma 9 (generalmente 9p21 con pérdida de P16) o la monosomía del cromosoma 9 representa la alteración genética más frecuente en esta patología, y se detecta en las primeras fases de desarrollo del carcinoma papilar y del carcinoma urotelial in situ³. La progresión del carcinoma urotelial se acompaña de un aumento en la inestabilidad cromosómica y la aneuploidización. Los estudios

citogenéticos muestran alteraciones recurrentes que afectan a diferentes cromosomas, siendo los más frecuentes los cromosomas 9, 17, 7, 11, 1 y 3⁴. La técnica de hibridación in situ fluorescente (FISH) utiliza sondas de ADN marcadas con un fluorocromo que permiten detectar alteraciones numéricas (sondas centroméricas) y alteraciones estructurales (sondas de locus específico) sobre células en interfase, y tiene la ventaja de no necesitar metafases para hacer el estudio genético. Por esta razón, el análisis de la presencia de células con alteraciones cromosómicas indicativas de malignidad se puede realizar sobre tejidos no viables (congelados, en parafina) y en las células de la orina.

Desde principio de los años 90 se empezaron a realizar estudios con sondas de FISH específicas para diferentes cromosomas o regiones cromosómicas para la detección de células malignas en el carcinoma urotelial⁵. Estos estudios se realizaron en orina o en lavados vesicales, pero no se empezaron a utilizar de forma más rutinaria hasta el desarrollo del kit UroVysion (VYSIS). El ensayo de FISH con múltiples sondas y múltiples colores, posteriormente llamado UroVysion, fue puesto a punto por Sokolova y cols⁶. El objetivo de este grupo fue desarrollar un kit de FISH para detectar carcinoma urotelial en muestras de orina que permitiese su uso en los laboratorios de diagnóstico clínico para monitorizar pacientes con carcinoma urotelial superficial. Se analizaron 30 pacientes, 21 con carcinoma urotelial y 9 controles sanos, con 8 sondas diferentes (centroméricas de los cromosomas 3, 7, 8, 11, 15, 17, 18, Y y para el locus 9p21) y se llegó a la conclusión de que el conjunto de sondas más sensible era el formado por las sondas centroméricas de los cromosomas 3, 7, 17 y la de locus específico para 9p21⁶. Los criterios que se establecieron para dar un caso como positivo fueron los siguientes: a) Hallar 5 o más células con ganancias de 2 o más cromosomas y b) Hallar >50% de células con pérdida homocigótica de 9p21, contando 100 nucleos consecutivos. La sensibilidad del test en el primer estudio se situó en el 84.2% y la especificidad en el 91.8%. También se demostró que las sondas centroméricas y la sonda de locus específico se complementaban muy bien, ya que las primeras detectaban hiperdiploidías, hallazgo frecuente en carcinoma invasivo y carcinoma urotelial in situ, mientras que la sonda de locus específico detectaba deleciones de 9p21, muy frecuentes en los carcinomas uroteliales papilares no invasivos.

Desde aquel momento, el kit UroVysion ha sido usado ampliamente en diferentes estudios, que avalan su utilidad en la detección de células malignas en la orina de pacientes con carcinoma urotelial, sobretodo en la detección de recurrencias, en las cuales el número de células patológicas puede ser bajo y de difícil detección con las técnicas citológicas convencionales⁷⁻¹⁰. Este kit fue aprobado por la FDA para detectar recurrencias en cáncer de vejiga el año 2002¹¹.

Nuestro grupo puso a punto este kit en el año 2001. Realizamos un estudio para evaluar la utilidad clínica de este test en orina para detección de cancer de vejiga y sus recurrencias, comparando los resultados obtenidos con la técnica de citología urinaria convencional¹². Se evaluaron 86 pacientes con las dos técnicas, y en todos los pacientes se realizó cistoscopia con biopsia o resección del tumor. Se compararon los resultados de la citología y del FISH en orina con los datos obtenidos del estudio anatomopatológico del tumor.

La sensibilidad y especificidad de las dos técnicas se detallan a continuación:

Grado Tumoral	Sensibilidad Citología (%)	Sensibilidad FISH (%)
G1	25%	53.3%
G2	66.6%	83.3%
G3	94.7%	100%

Técnica	Sensibilidad Global (%)	Especificidad Global (%)
Citología	63.8%	86.1%
FISH	80.4%	85.3%

La técnica de FISH con el kit UroVysion mejoró la sensibilidad obtenida con la citología urinaria en todos los grados y estadios tumorales y mostró una especificidad similar. La técnica de FISH dobló la precisión de la citología en la detección de los tumores de bajo grado y detectó todos los tumores infiltrantes de alto grado.

REFERENCIAS

1. Maier U, Simak R, Neuhold N. The clinical value of urinary cytology: 12 years of experience with 615 patients. *J Clin Pathol* 1995;48(4):314-7.
2. Ramakumar S, Bhuiyan J, Besse JA, Roberts SG, Wollan PC, Blute ML, O'Kane DJ. Comparison of screening methods in the detection of bladder cancer. *J Urol* 1999;161(2):388-94.
3. Orlow I, Lacombe L, Hannon GJ, Serrano M, Pellicer I, Dalbagni G, Reuter VE, Zhang ZF, Beach D, Cordon-Cardo C. Deletion of the p16 and p15 genes in human bladder tumors. *J Natl Cancer Inst* 1995;87(20):1524-9.
4. Sandberg AA, Berger CS. Review of chromosome studies in urological tumors. II. Cytogenetics and molecular genetics of bladder cancer. *J Urol* 1994;151(3):545-60.
5. Meloni AM, Peier AM, Haddad FS, Powell IJ, Block AW, Huben RP, Todd I, Potter W, Sandberg AA. A new approach in the diagnosis and follow-up of bladder cancer. FISH analysis of urine, bladder washings, and tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1993;71(2):105-18.
6. Sokolova IA, Halling KC, Jenkins RB, Burkhardt HM, Meyer RG, Seelig SA, King W. The development of a multitarget, multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J Mol Diagn* 2000;2(3):116-23.
7. Halling KC, King W, Sokolova IA, Meyer RG, Burkhardt HM, Halling AC, Cheville JC, Sebo TJ, Ramakumar S, Stewart CS, Pankratz S, O'Kane DJ, Seelig SA, Lieber MM, Jenkins RB. A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of urothelial carcinoma. *J Urol* 2000;164(5):1768-75.
8. Bubendorf L, Grilli B, Sauter G, Mihatsch MJ, Gasser TC, Dalquen P. Multiprobe FISH for enhanced detection of bladder cancer in voided urine specimens and bladder washings. *Am J Clin Pathol* 2001;116(1):79-86.
9. Halling KC, King W, Sokolova IA, Karnes RJ, Meyer RG, Powell EL, Sebo TJ, Cheville JC, Clayton AC, Krajnik KL, Ebert TA, Nelson RE, Burkhardt HM, Ramakumar S, Stewart CS, Pankratz VS, Lieber MM, Blute ML, Zincke H, Seelig SA, Jenkins RB, O'Kane DJ. A comparison of BTA stat, hemoglobin dipstick, telomerase and Vysis UroVysion assays for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J Urol* 2002;167(5):2001-6.
10. Kipp BR, Karnes RJ, Brankley SM, Harwood AR, Pankratz VS, Sebo TJ, Blute MM, Lieber MM, Zincke H, Halling KC. Monitoring intravesical therapy for superficial bladder cancer using fluorescence in situ hybridization. *J Urol* 2005;173(2):401-4.
11. Sarosdy MF, Schellhammer P, Bokinsky G, Kahn P, Chao R, Yore L, Zadra J, Burzon D, Osher G, Bridge JA, Anderson S, Johansson SL, Lieber M, Soloway M, Flom K. Clinical evaluation of a multi-target fluorescent in situ hybridization assay for detection of bladder cancer. *J Urol* 2002;168(5):1950-4.
12. Placer J, Espinet B, Salido M, Sole F, Gelabert-Mas A. Clinical utility of a multiprobe FISH assay in voided urine specimens for the detection of bladder cancer and its recurrences, compared with urinary cytology. *Eur Urol* 2002;42(6):547-52.