

TÉCNICA DE CITOGENÉTICA, EL CARIOTIPO. APLICACIÓN AL ESTUDIO DE LAS NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS Y SÓLIDAS

Marta Salido

Servicio de anatomía patológica

Laboratorio de citogenética molecular

Hospital del Mar-Parc de Salut Mar

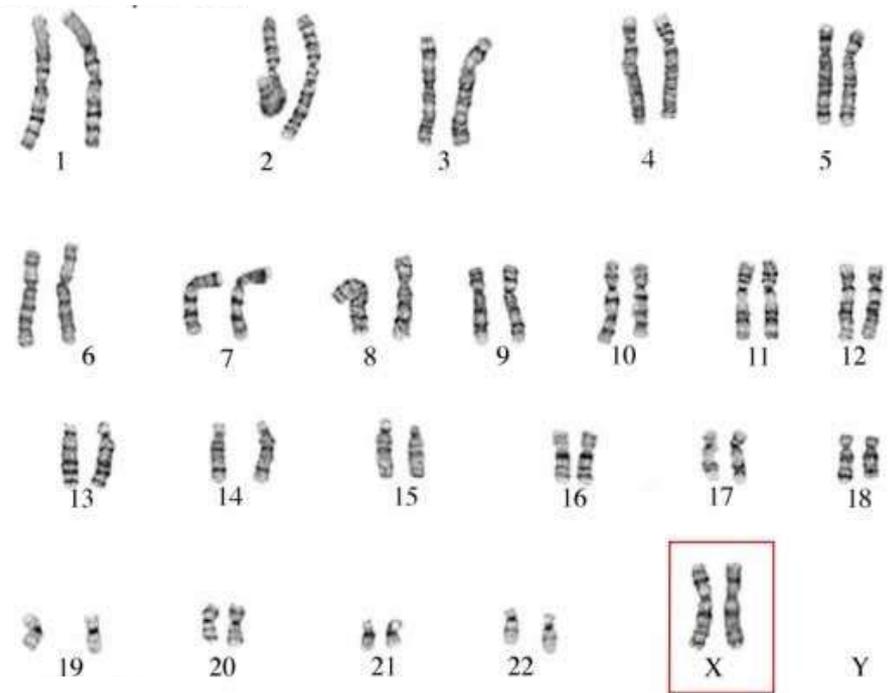
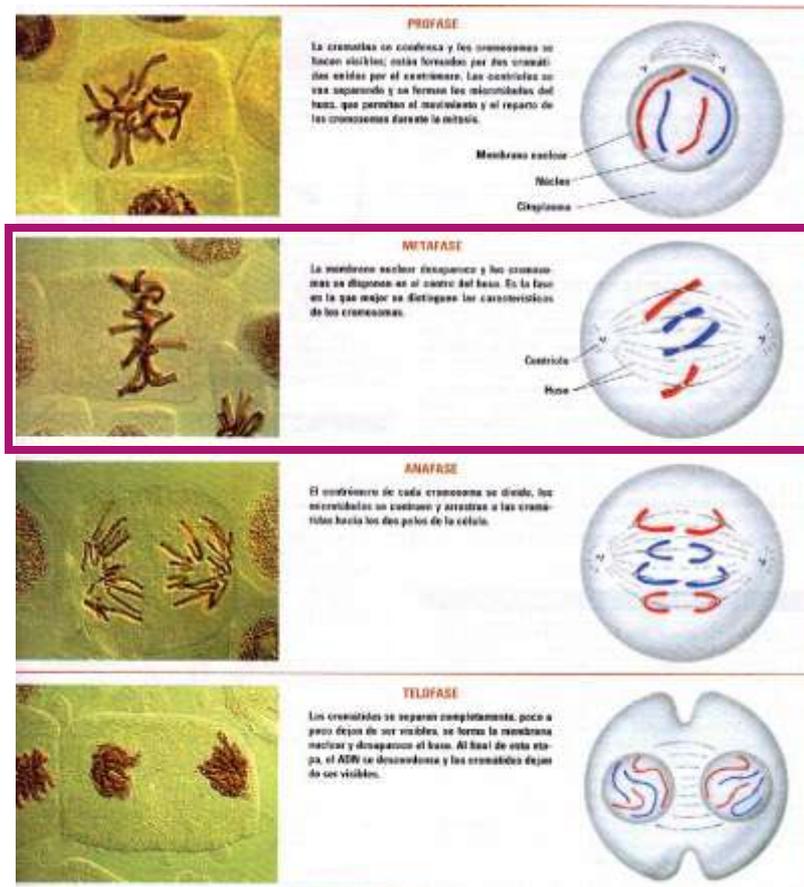


EL CARIOTIPO

Estudio de los cromosomas (fase de metafase):

- cromatina altamente condensada y morfología cromosómica bien definida

Ordenación de los cromosomas: cariotipo



Fórmula cromosómica: 46,XX

CONCEPTOS METODOLÓGICOS BÁSICOS

- Requiere tejido “vivo” con capacidad de dividirse (estudio de metafases):
 - Sangre periférica
 - Médula ósea
 - Biopsias: Máxima esterilidad, eliminar zonas necróticas
 - Líquidos biológicos (LCR, pleural, etc...)
- Requiere cultivo “*in vitro*”
 - 24-72horas: neoplasias hematológicas
 - 5-7 días: tumores sólidos
- Muestra a estudiar según orientación diagnóstica:
 - Leucemias, SMD, SMPC, mielomas: médula ósea
 - SLPC-B/T con expresión periférica: sangre periférica
 - SLP-B/T: ganglio, bazo,...
 - Tumor sólido: muestra tumoral esteril

El correcto procesamiento de la muestra es básico para poder obtener conclusiones diagnósticas

FLUIDOS (SP y MO)

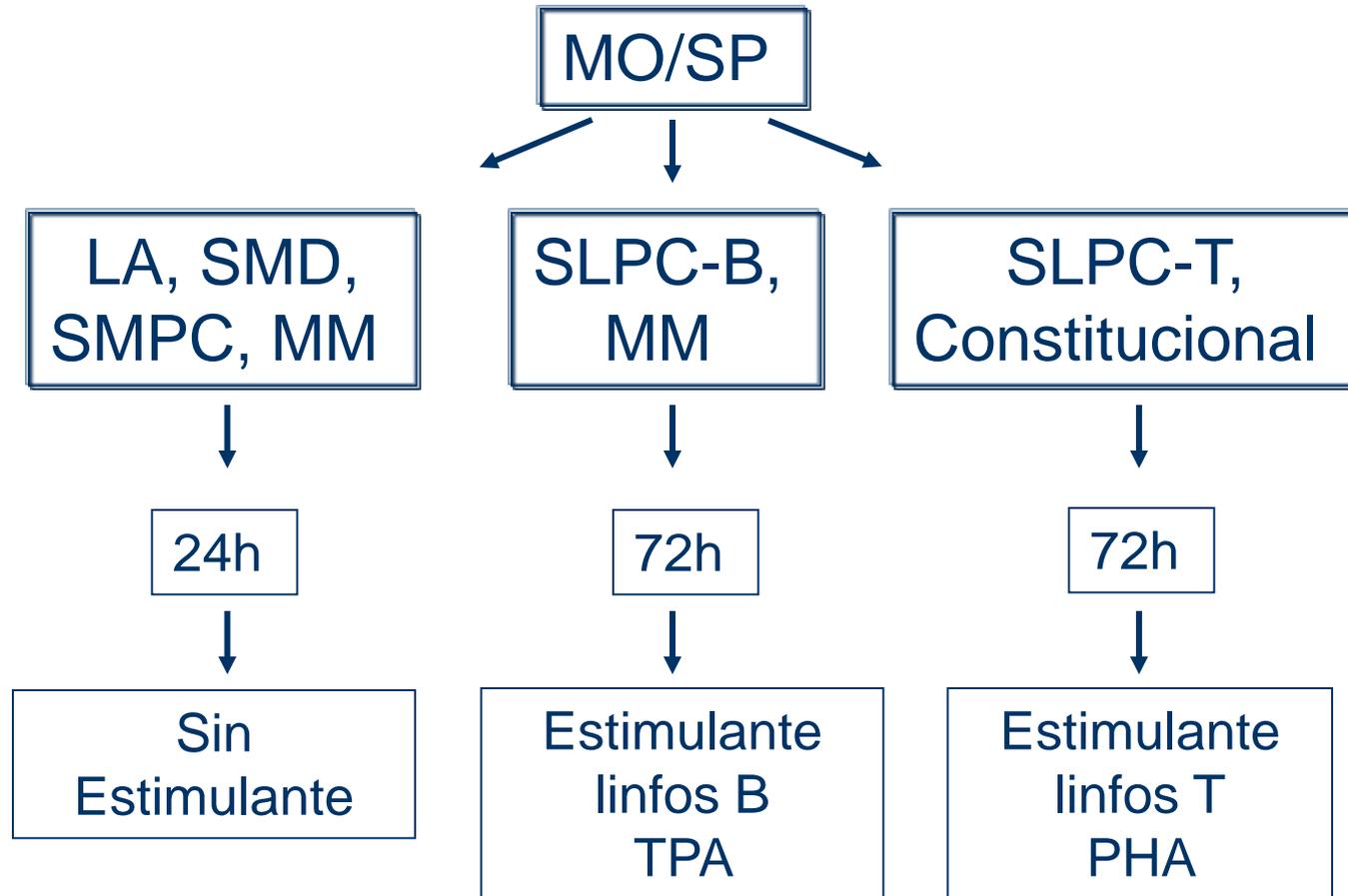
Heparina sódica

~~EDTA~~



incidencias

CONCEPTOS METODOLÓGICOS BÁSICOS



PROTOCOLO

- Cultivo “*in vitro*” (2×10^6 células por mililitro):
 - Medio de cultivo (10ml):
 - RPMI/DMEM
 - Glutamina
 - 10-20% Suero Fetal
 - Penicilina/streptomycin
- Antimitótico: incubación con colcemid
 - Inhibe la formación del huso mitótico “parando” la célula en estadio de metafase
- Solución Hipotónica
 - Hincha la célula y separa los cromosomas
- Fijación: Carnoy (metanol+ ac. acético)
 - fija y elimina restos citoplasmáticos
- Extensión de metafases sobre portaobjetos
- Envejecimiento
 - Placa térmica 1 hora a 100°C o estufa 2 días a 65°C
- Bandeado cromosómico: Bandas G, Q, R, C,...



TÉCNICA DE CITOGENÉTICA

Muestra en fresco



Disgregación Mecánica + Colagenasa
(*Sólo tumores sólidos*)



cultivo (estufa 37°C/5%CO₂)



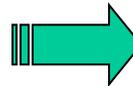
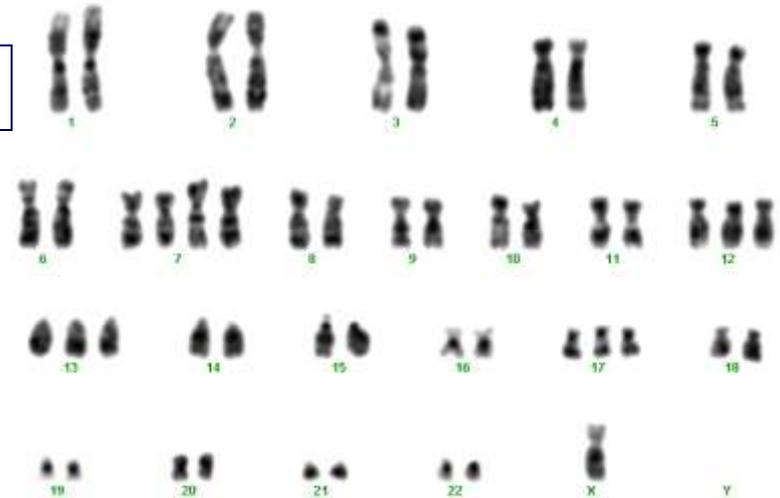
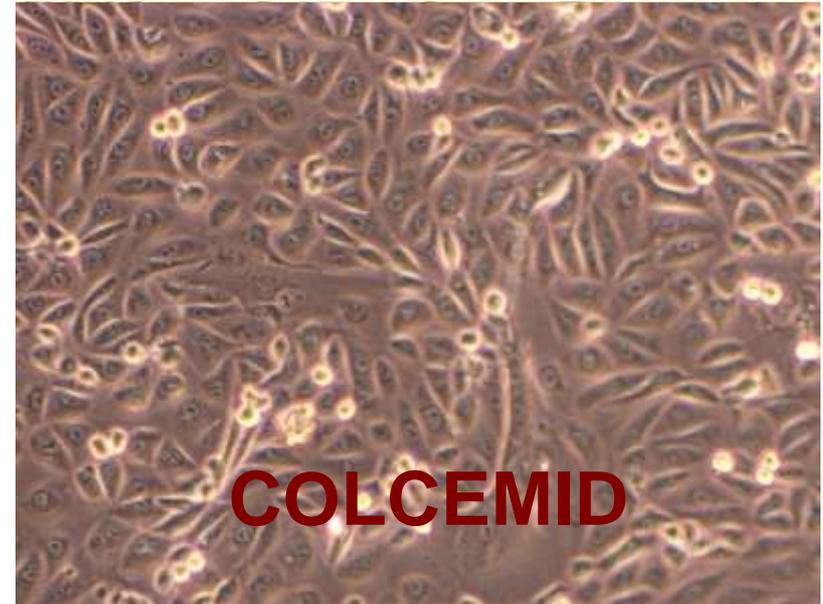
Extracción del cultivo (Hipotónico+fijación)



Tinción para Bandas G



Evaluación al Microscopio



BANDEO CROMOSÓMICO

- Bandas G: tinción con Giemsa, ..., Wright, ...
 - Pretratamiento con soluciones salinas (2XSSC) o enzimas proteolíticas
 - Zonas ricas en AT: bandas claras; CG: bandas oscuras
- Bandas R: negativo de las bandas G
 - Pretratamiento con soluciones alcalinas + Giemsa
- Bandas C: tiñen las regiones centroméricas (cromosomas: 1, 9, 16 i Y)
- Bandas Q: tinción con quinacrina. Generan el mismo patrón que las bandas G



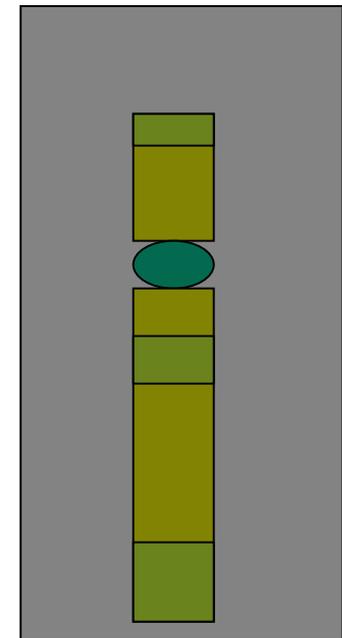
Bandes G



Bandes R



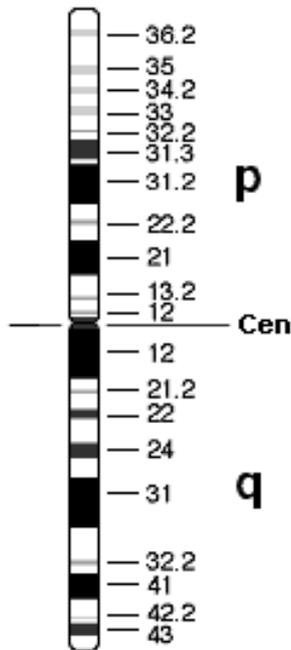
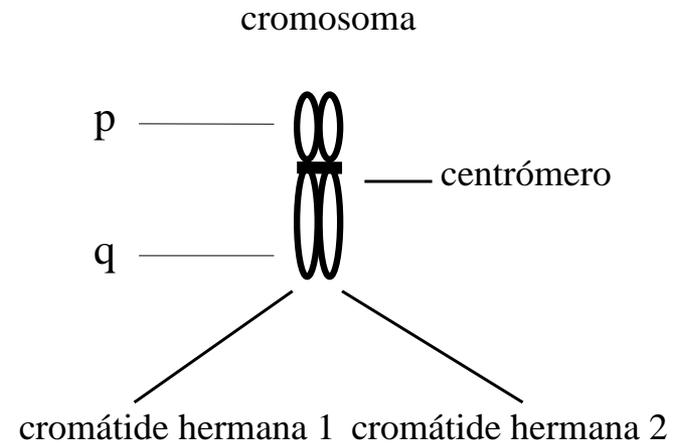
Bandes C



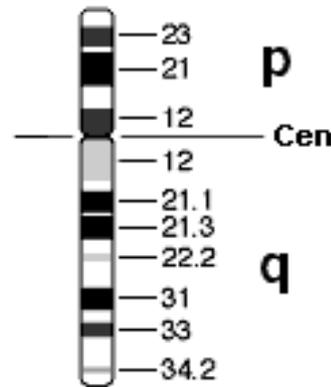
Bandes Q

ESTRUCTURA DE LOS CROMOSOMAS

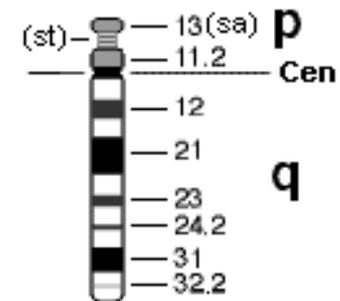
- p: brazo corto del cromosoma
- q: brazo largo del cromosoma



Cromosoma 1
Metacéntrico



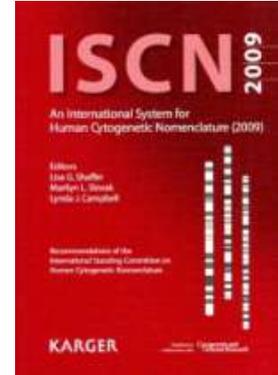
Cromosoma 9
submetacéntrico



Cromosoma 14
acrocéntrico

NOMENCLATURA

- La nomenclatura utilizada para describir un cariotipo normal o patológico se ha estandarizado en una nomenclatura aceptada internacionalmente, ISCN (International System for Human Cytogenetics Nomenclature)

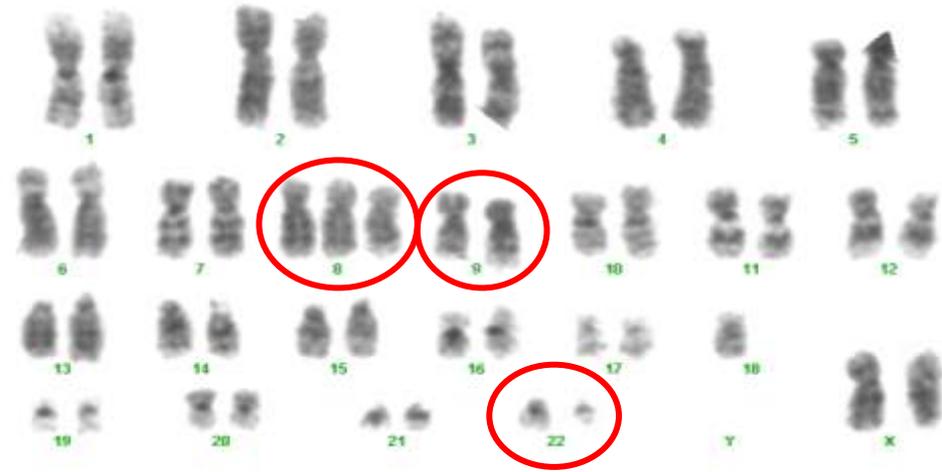


Formulación de alteraciones más frecuentes:

- del: deleción (pérdida de material genético)
- dup: duplicación (ganancia de material genético)
- t: translocación (intercambio de material genético)
- inv: inversión (fragmento cromosómico invertido)
- -7: monosomía 7 (una sola copia del cr. 7)
- +8: trisomía 8 (tres copias del cr. 8)
- ...

CARIOTIPADO

- **Cariotipo:** clasificación de los 23 pares de cromosomas humanos
 - 22 cromosomas autosómicos
 - XX o XY cromosomas sexuales
- Permite el análisis de todo el genoma
- Esencial para encontrar nuevas alteraciones genéticas
- Detecta alteraciones cromosómicas (cambios que afectan a regiones grandes ~ 5-10 Mb)



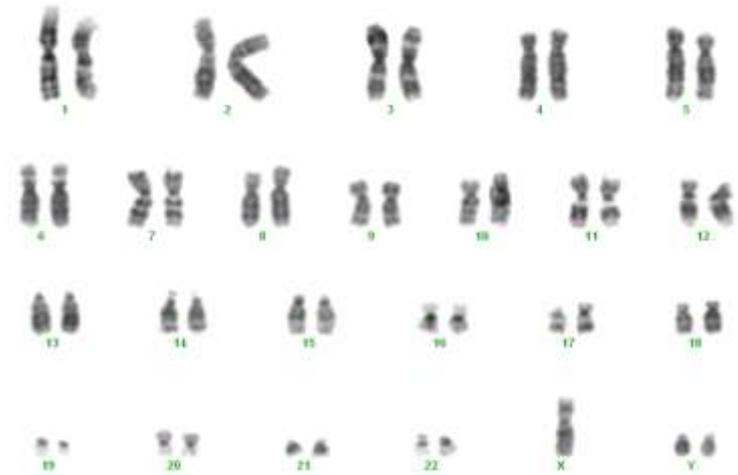
47, XX, +8, t(9;22)(q34;q11.2)

ALTERACIONES CROMOSÓMICAS CONSTITUCIONALES

- Alteraciones presentes en todas las células del individuo
 - Mosaicismo: pacientes con ≥ 2 poblaciones celulares distintas
 - Ej: 47,XX,+21[10]/46,XX[10]
 - Si la alteración es **no balanceada** (ganancia/pérdida de genes) produce dismorfologías, malformaciones, retraso mental o psicomotor

- Alteraciones más frecuentes:

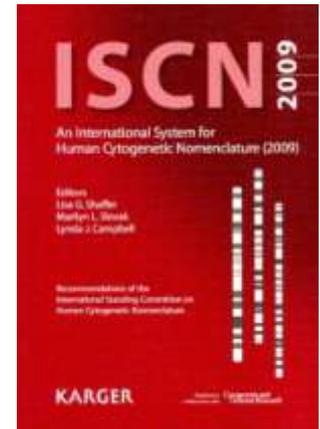
- Síndrome de Down (trisomía 21)
- Síndrome de Patau (trisomía 13)
- Síndrome de Edwards (trisomía 18)
- Síndrome de Klinefelter (XXY)
- Síndrome de Turner XO
- Síndrome XYY
- Síndrome de “cri du chat” (deleción 5p)
- Síndrome de Prader-Willi/Angelman (deleción 15q)



47,XXY

DEFINICIONES EN CITOGENÉTICA DEL CÁNCER

- Recomendable analizar 20 metafases
- CLON:
 - Ganancia o alteración estructural: dos metafases con la misma alteración
 - Pérdida de un cromosoma: tres metafases con la misma alteración
- Nomenclatura ISCN (1.995, 2.005, **2.009**)
- Cariotipo complejo: >3 alteraciones citogenéticas



Informe de citogenética (Ej):

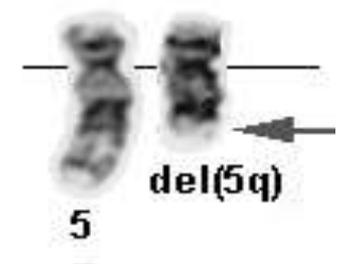
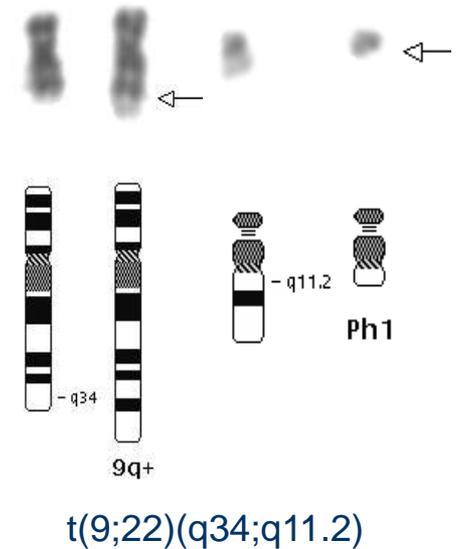
Se ha efectuado el cultivo de médula ósea y realizado el recuento de 30 metafases que presentaban 46 cromosomas.

Con la técnica de bandas G se ha detectado, en todas las células analizadas, la presencia de una delección intersticial del brazo largo del cromosoma 5, con puntos de rotura a nivel de las bandas 5q13 a 5q33.

Cariotipo (ISCN 2009): 46,XX,del(5)(q13q33)[30]

ALTERACIONES CROMOSÓMICAS Y CÁNCER

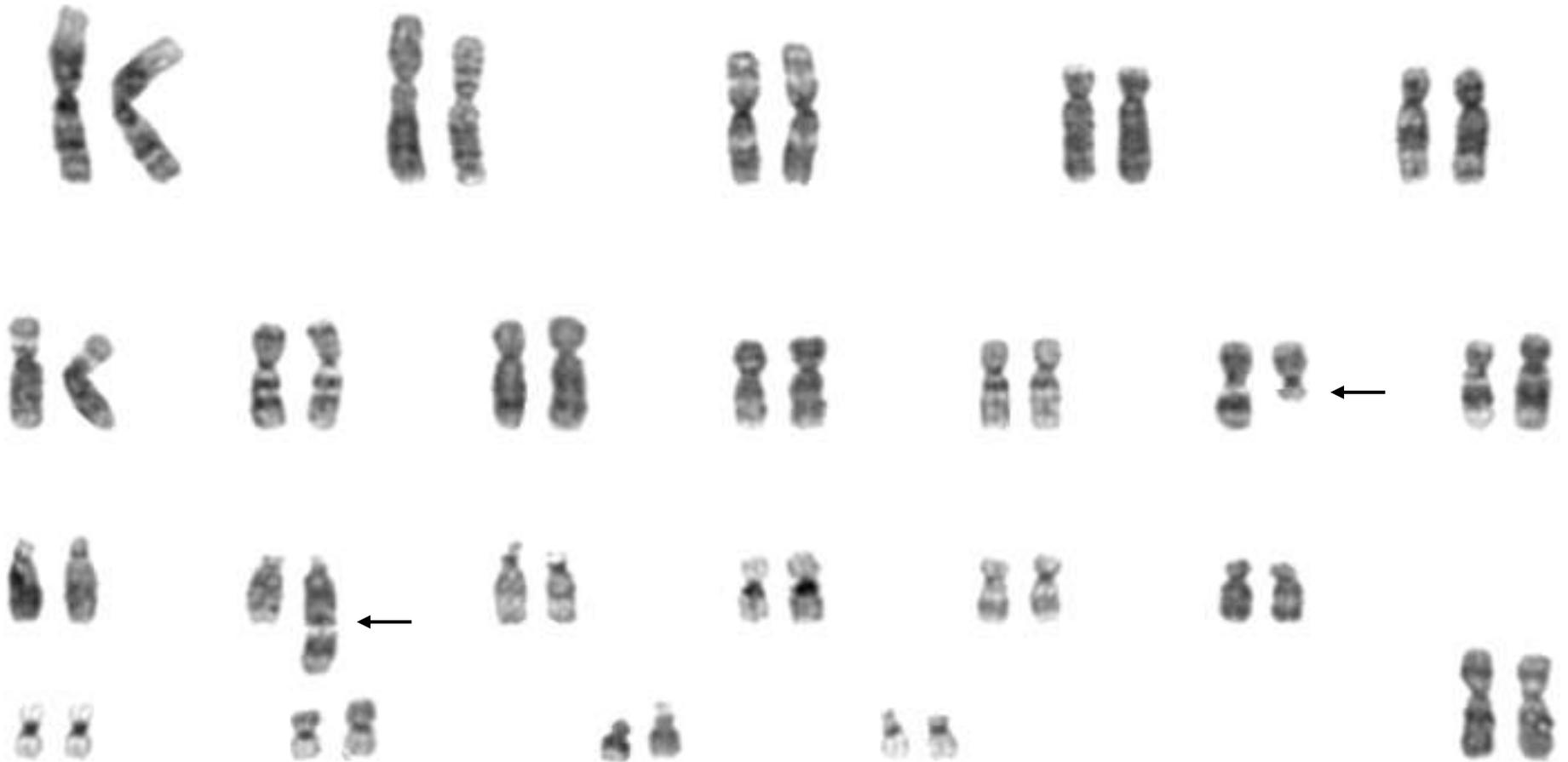
- Alteraciones asociadas a una neoplasia sólida o hematológica
 - Frecuentemente se observan en mosaico:
 - células neoplásicas+células no-neoplásicas
- Alteraciones más frecuentes:
 - Alteraciones numéricas:
 - Ej: +12 asociada a la LLC-B
 - Alteraciones balanceadas:
 - Translocaciones
 - Gen de fusión: Ej: **BCR/ABL**: LMC
 - Sobreexpresión por posicionamiento:
 - Ej: t(14;18)(q32;q21): *BCL2/IGH* en LF
 - Inversiones
 - Alteraciones no balanceadas:
 - Deleción: pérdida de un segmento cromosómico
 - **del(5)(q13q33)**: pérdida asociada a un SMD
 - Cromosomas en anillo ("ring"): deleción+duplicación
 - Inserciones
 - Duplicaciones
 - HSR o dobles diminutos (dmins): amplificaciones génicas



IMPORTANCIA DEL ESTUDIO CITOGENÉTICO EN LAS NEOPLASIAS

- **Diagnóstico:** clasificación OMS (WHO)
- **Pronóstico:** papel de las alteraciones cromosómicas (secundarias)
- **Seguimiento** de la enfermedad mínima residual (PCR más sensible)
- Conocimiento de los **genes implicados** en el origen y evolución de la enfermedad
- El cambio genético define el **tratamiento más eficaz** (LMC, BCR/ABL y Glivec; Cáncer de mama, ERBB2 y Herceptin)

Cariotipo de un paciente de sexo femenino afecto de un linfoma del manto(LM) con una translocación t(11;14)(q13;q32).

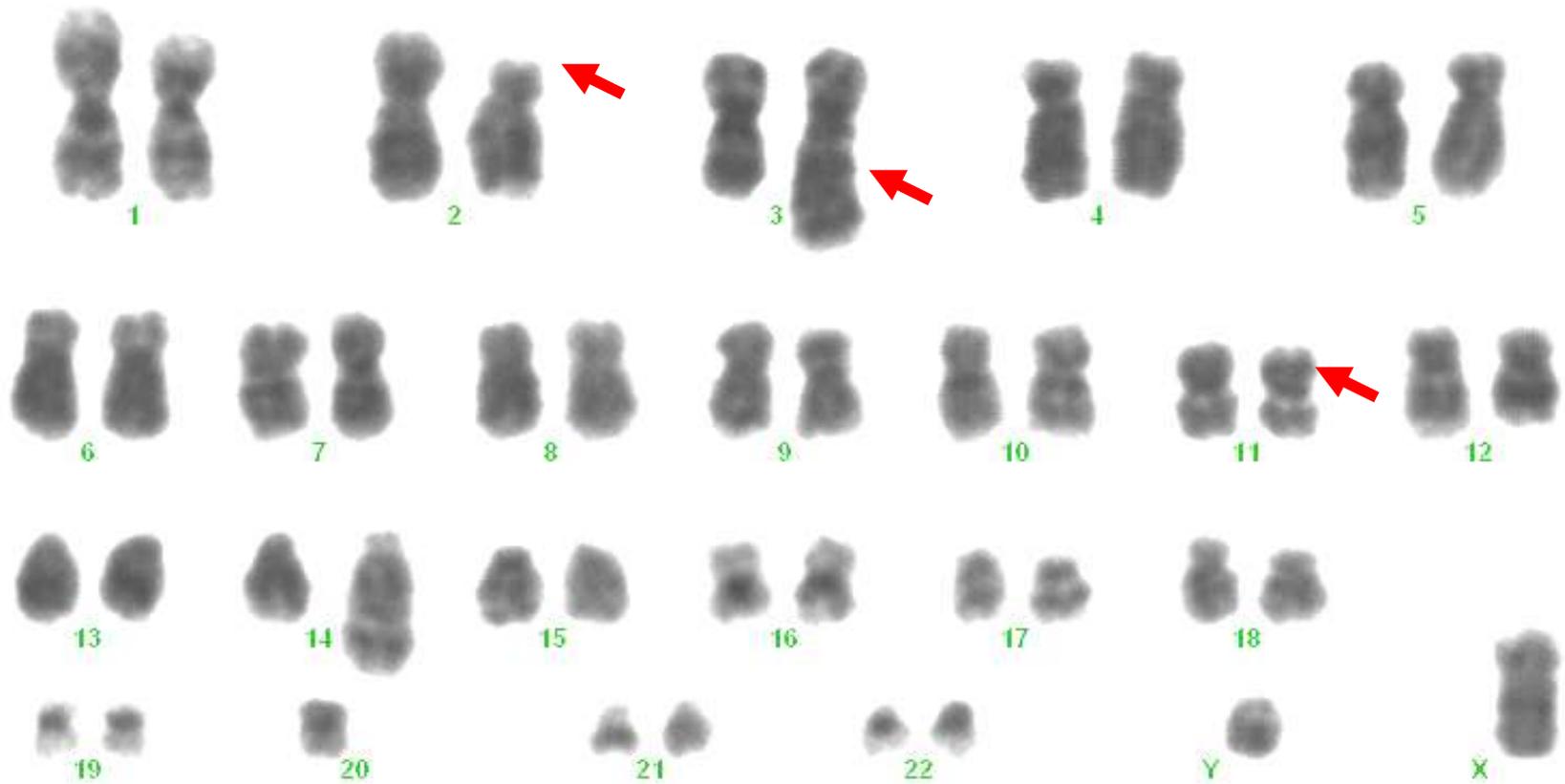


46,XX,t(11;14)(q13;q32)

IMPORTANCIA DEL ESTUDIO CITOGENÉTICO EN LAS NEOPLASIAS

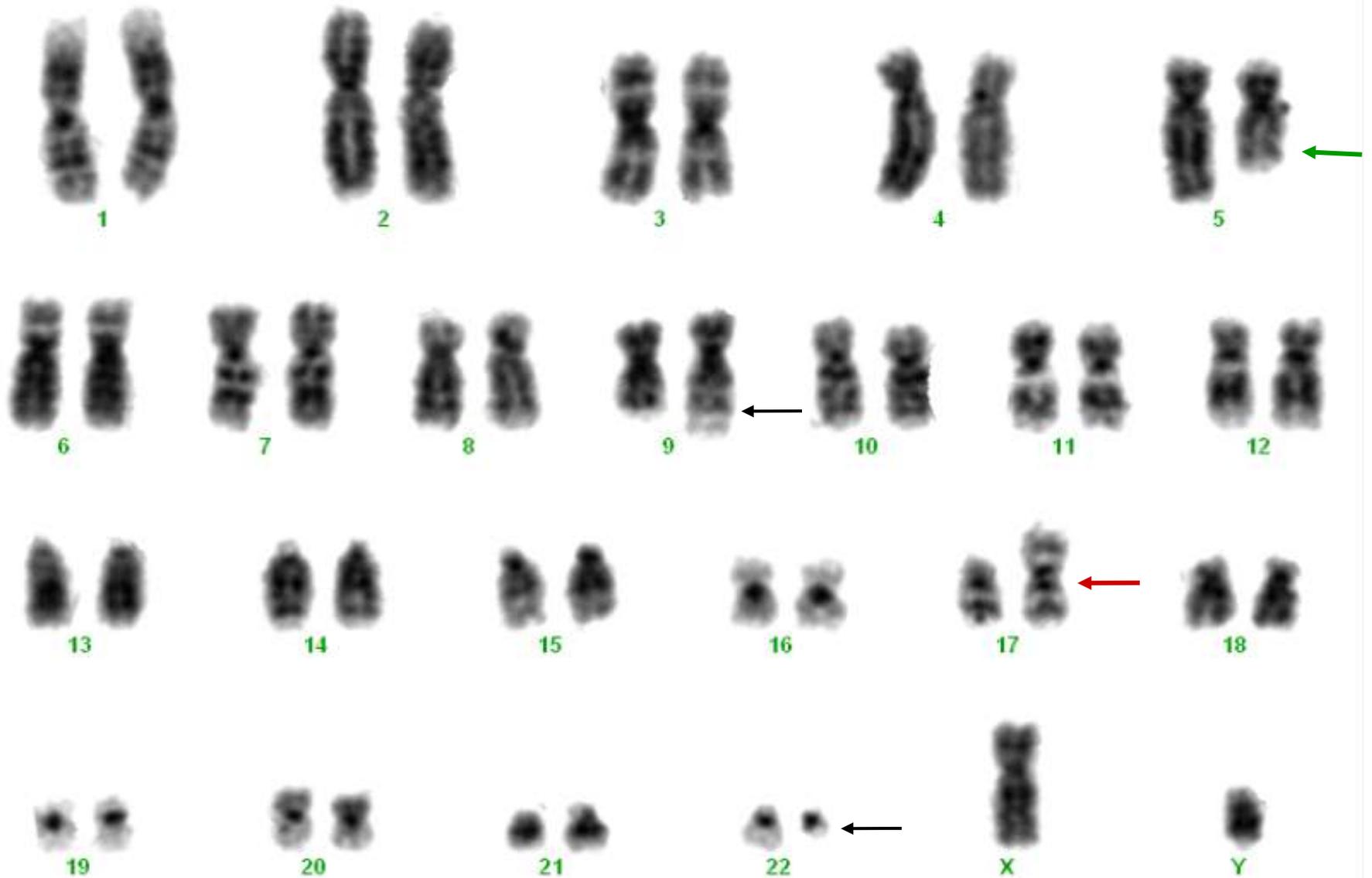
- **Diagnóstico:** clasificación OMS (WHO)
- **Pronóstico:** papel de las alteraciones cromosómicas (secundarias)
- **Seguimiento** de la enfermedad mínima residual (PCR más sensible)
- Conocimiento de los **genes implicados** en el origen y evolución de la enfermedad
- El cambio genético define el **tratamiento más eficaz** (LMC, BCR/ABL y Glivec; Cáncer de mama, ERBB2 y Herceptin)

Cariotipo de un paciente de sexo masculino afecto de un linfoma del manto(LM) con una translocación t(11;14)(q13;q32) y un cariotipo complejo



IMPORTANCIA DEL ESTUDIO CITOGENÉTICO EN LAS NEOPLASIAS

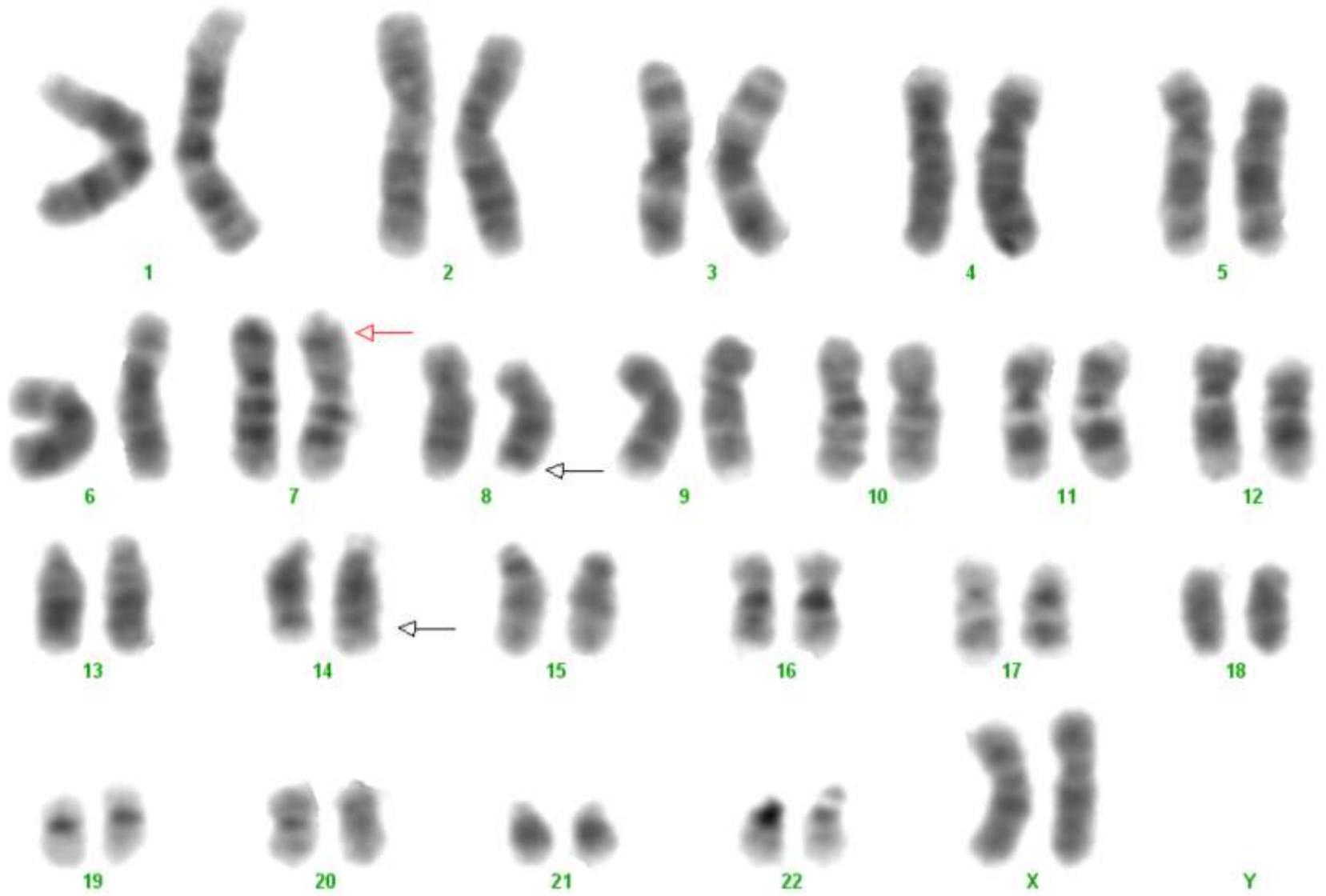
- **Diagnóstico:** clasificación OMS (WHO)
- **Pronóstico:** papel de las alteraciones cromosómicas (secundarias)
- **Seguimiento** de la enfermedad mínima residual (PCR más sensible)
- Conocimiento de los **genes implicados** en el origen y evolución de la enfermedad
- El cambio genético define el **tratamiento más eficaz** (LMC, BCR/ABL y Glivec; Cáncer de mama, ERBB2 y Herceptin)



- t(9;22)(q34;q11.2)
- i(17)(q10)
- del(5)(q21q31)

IMPORTANCIA DEL ESTUDIO CITOGENÉTICO EN LAS NEOPLASIAS

- **Diagnóstico:** clasificación OMS (WHO)
- **Pronóstico:** papel de las alteraciones cromosómicas (secundarias)
- **Seguimiento** de la enfermedad mínima residual (PCR más sensible)
- Conocimiento de los **genes implicados** en el origen y evolución de la enfermedad
- El cambio genético define el **tratamiento más eficaz** (LMC, BCR/ABL y Glivec; Cáncer de mama, ERBB2 y Herceptin)

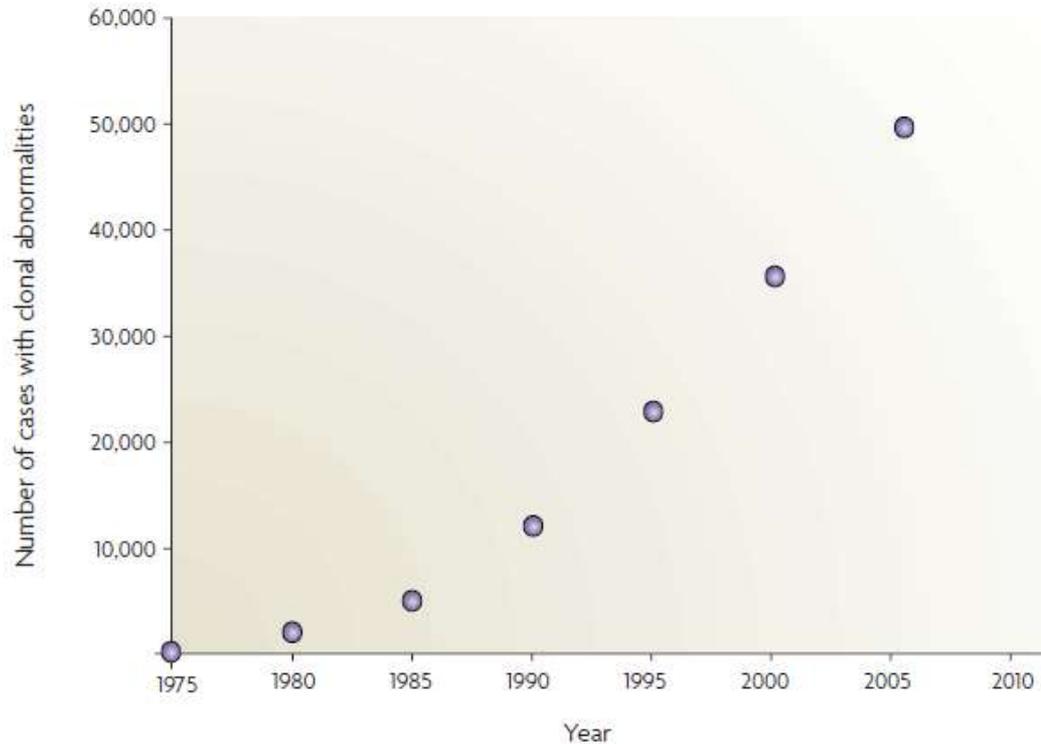


46,XX,t(7;8)(p12;q24), t(3;14)(q27;q32)

IMPORTANCIA DEL ESTUDIO CITOGENÉTICO EN LAS NEOPLASIAS

- **Diagnóstico:** clasificación OMS (WHO)
- **Pronóstico:** papel de las alteraciones cromosómicas (secundarias)
- **Seguimiento** de la enfermedad mínima residual (PCR más sensible)
- Conocimiento de los **genes implicados** en el origen y evolución de la enfermedad
- El cambio genético define el **tratamiento más eficaz (LMC, BCR/ABL y Glivec; Cáncer de mama, ERBB2 y Herceptin)**

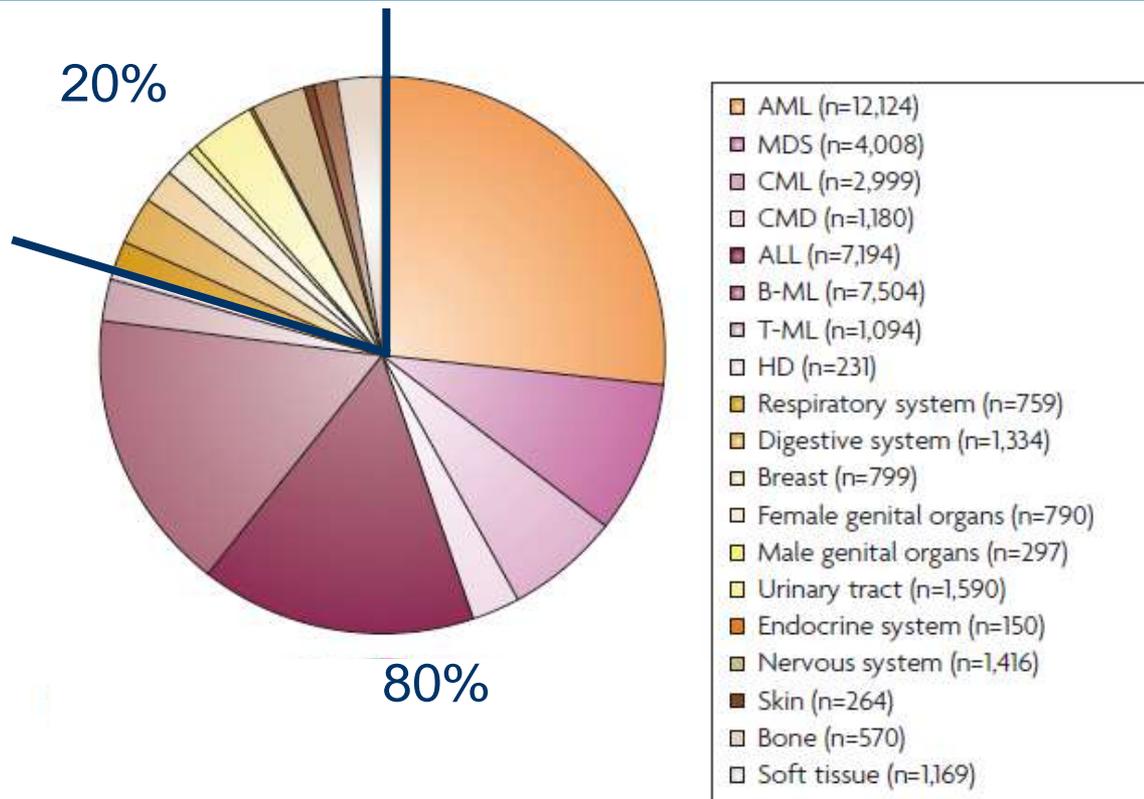
ALTERACIONES CITOGENETICAS EN NEOPLASIAS



Mitelman F, Nature Reviews 2007

Información de casos con alteraciones citogenéticas clonales: <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/>

ALTERACIONES CITOGENETICAS EN NEOPLASIAS



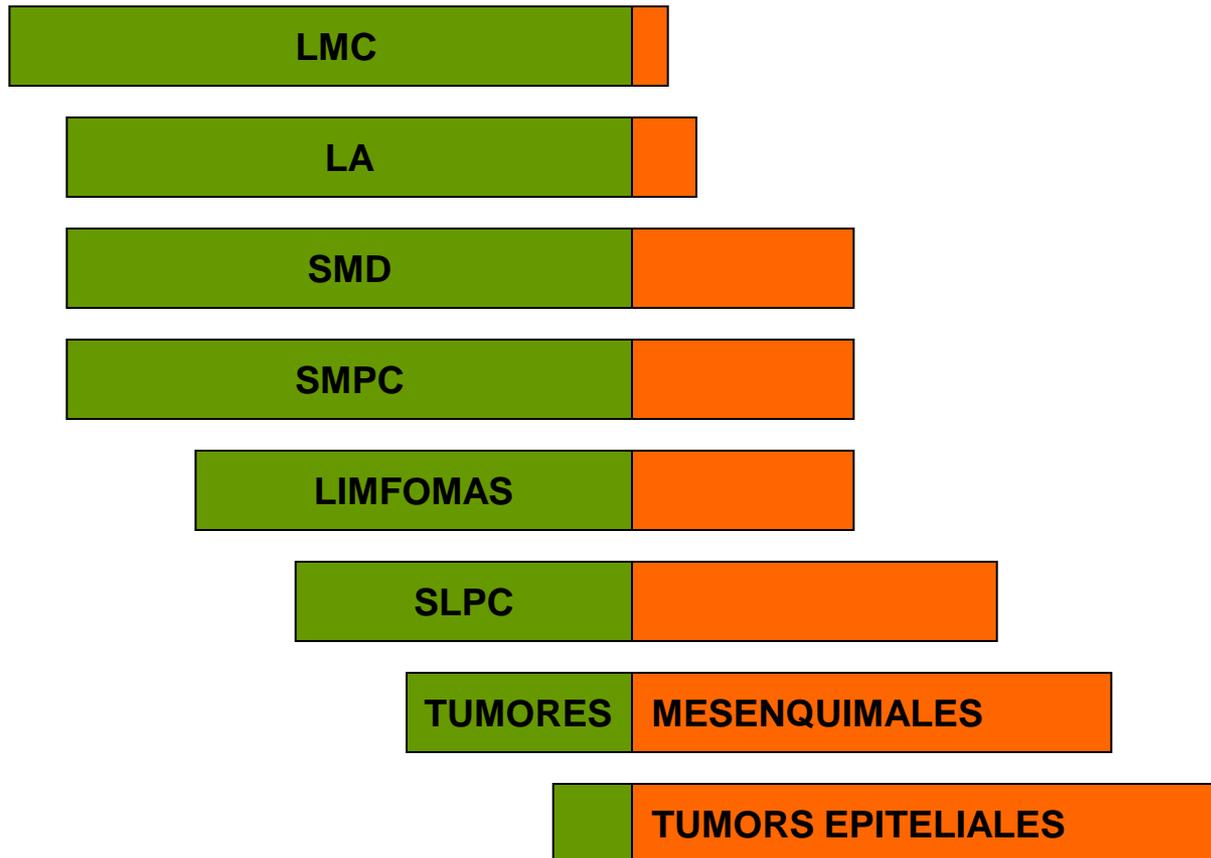
45.472 citogenéticas alteradas descritas en la literatura

Pocos estudio es tumores epiteliales respecto a los hematológicos

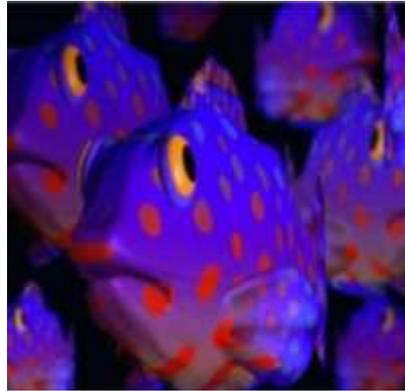
ALTERACIONES CROMOSÓMICAS Y CÁNCER

SIMPLES Y ESPECÍFICAS

MÚLTIPLES Y NO ESPECÍFICAS

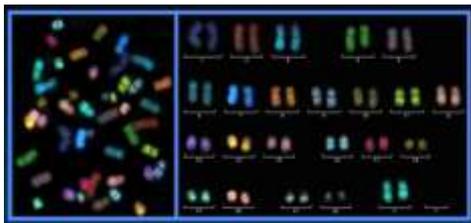


TÉCNICAS DE MULTICOLOR FISH



Cariotipado multicolor

M-FISH



Speicher et al., 1996

SKY



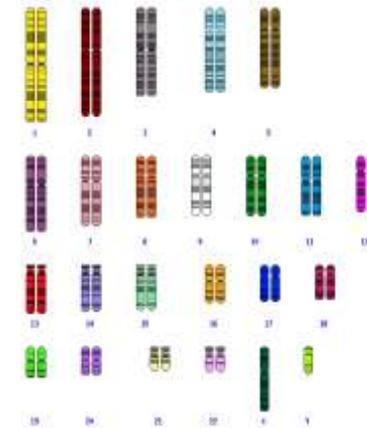
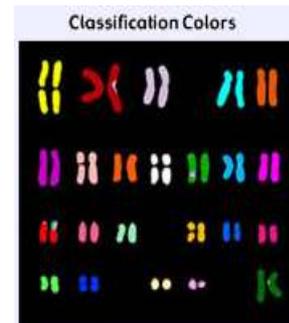
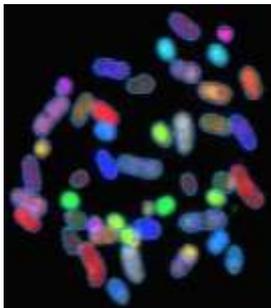
Schröck et al., 1996

Técnicas de Hibridación *In Situ* Fluorescente que utilizan un conjunto de sondas de pintado cromosómico, marcadas combinadamente con diferentes fluorocromos, que permiten la clasificación de los 24 cromosomas en colores distintos

TÉCNICAS DE MULTICOLOR FISH (SKY)

Analisis de resultados:

- 1) Selección de metafases
 - 2) Captura mediante el filtro espectral – Spectracube™ procesa la imagen a partir de la cámara CCD
 - 3) Captura de la contratinción – cámara CCD
- Procesado de la imagen con el programa HiSKY (*Spectral Imaging*)



SKYgram



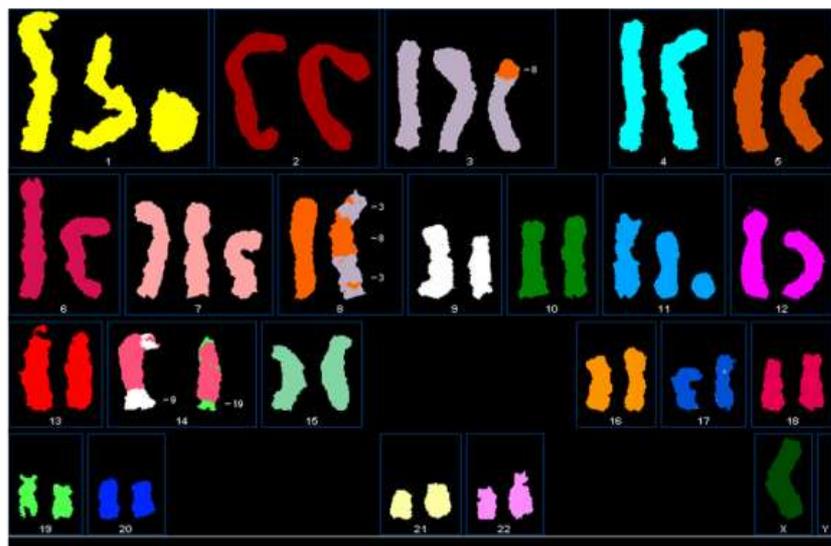
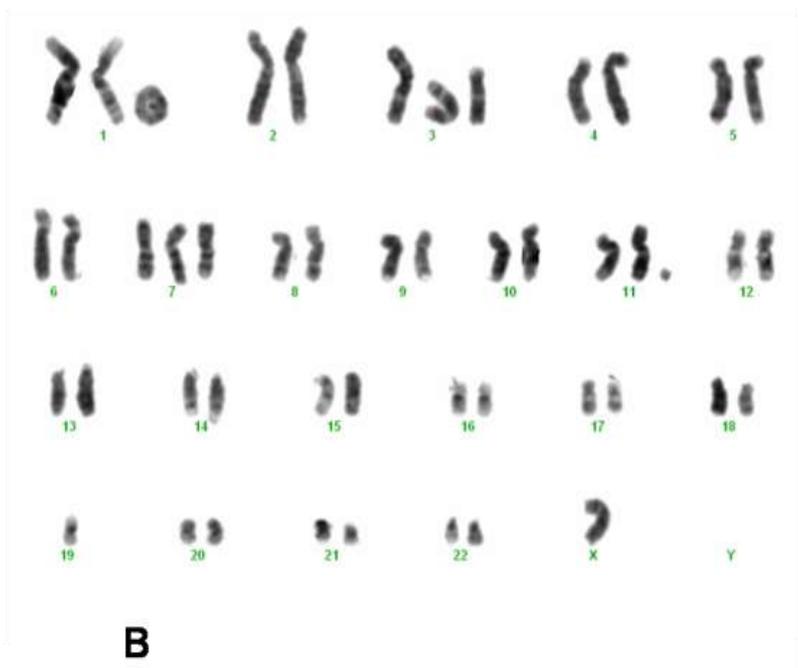
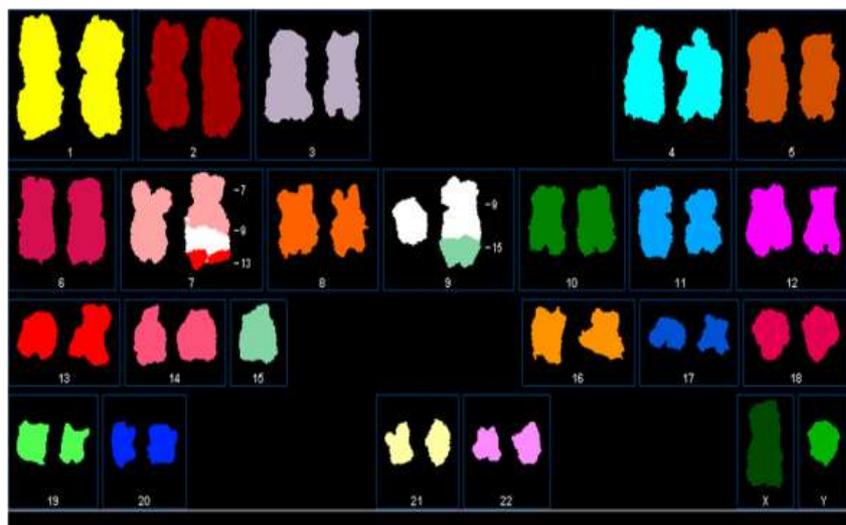
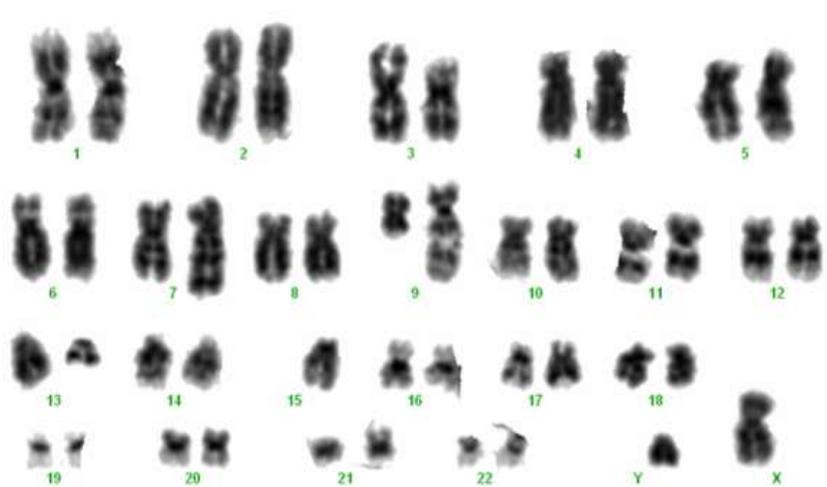
Ventajas

- Información de todos los cromosomas en un único experimento
- Descripción de cariotipos complejos
- Detección de translocaciones crípticas por CC
- Definición de translocaciones detectas por CC
- Definición de cromosomas marcadores



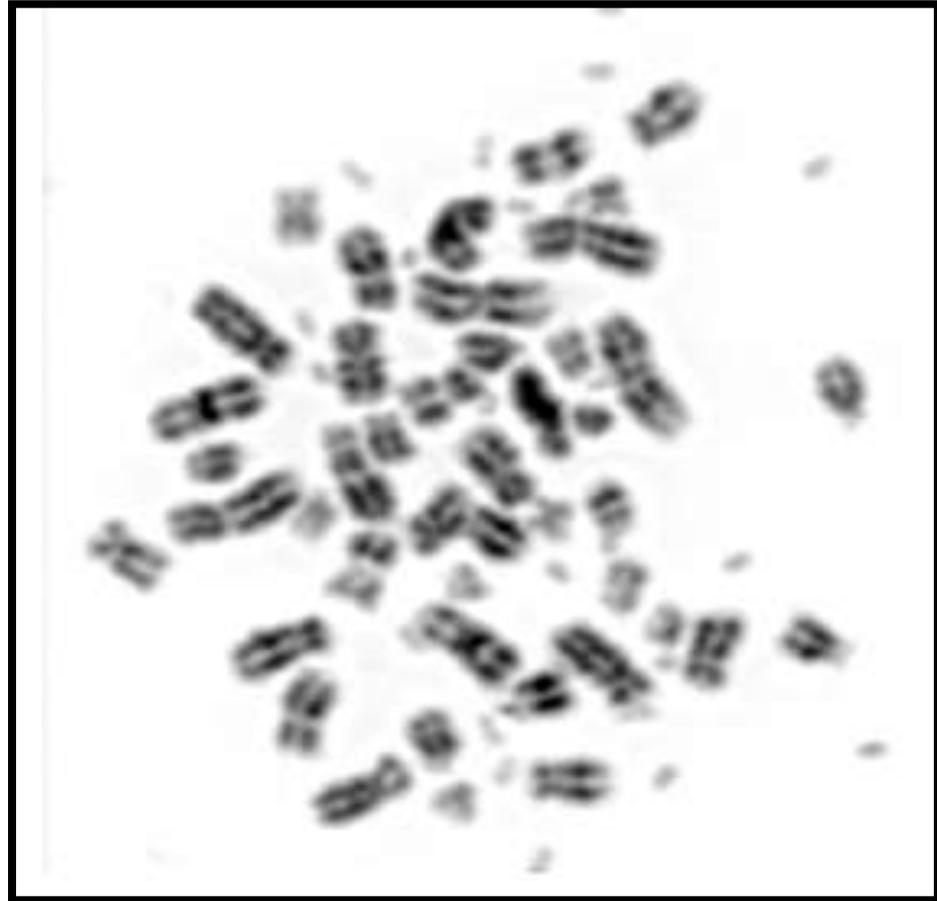
Inconvenientes

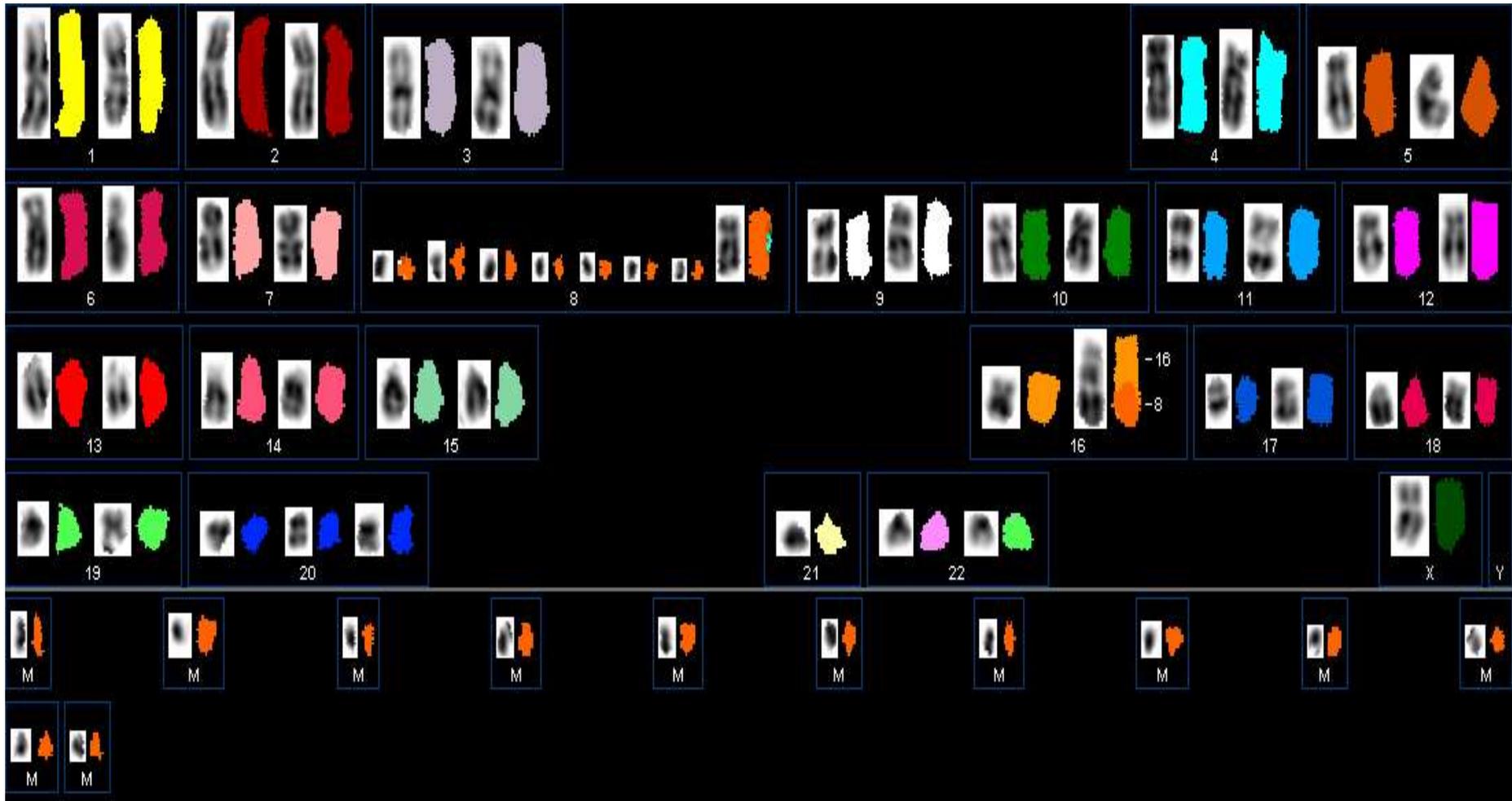
- Necesidad de metafases
- No visualización de alteraciones dentro de un mismo cromosoma o su homólogo
- No detección de alteraciones <3-10 Mb (resolución similar a la CC)
- Elevado coste económico

A**B**

Handwritten text in a circular arrangement, possibly a seal or stamp, containing characters that are difficult to decipher due to blurriness and rotation.

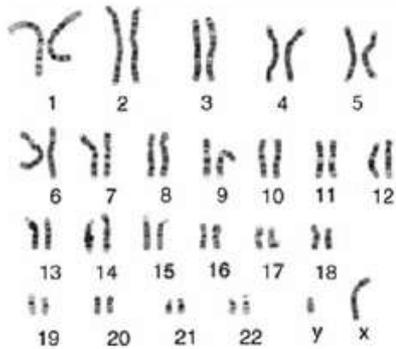
SKY: CARIOTIPO ESPECTRAL



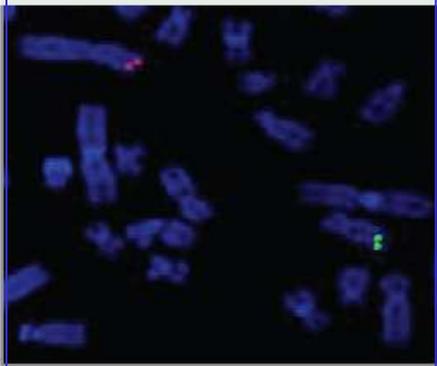


EVOLUCIÓN DE LA CITOGENÉTICA

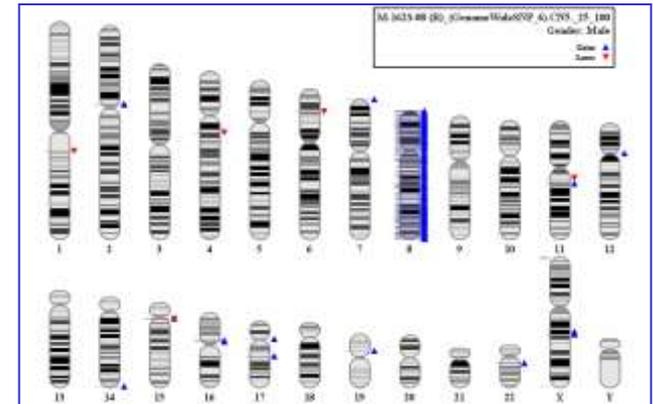
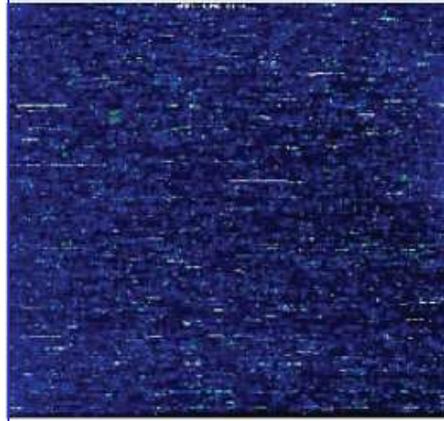
Karyotyping



FISH



SNP Microarrays



VENTAJAS:

- Mayor resolución:
- Definición precisa de puntos de rotura
- Detección de alteraciones de pequeño tamaño (5 Kb)

A micrograph showing several cells with a light blue/purple background. Numerous small, dark purple/black and red dots are scattered throughout the cells, representing the SISH signal. The text 'SISH' is overlaid in large black font, and 'SILVER IN SITU HYBRIDIZATION' is overlaid in smaller black font below it.

SISH

SILVER IN SITU HYBRIDIZATION

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO (SISH)

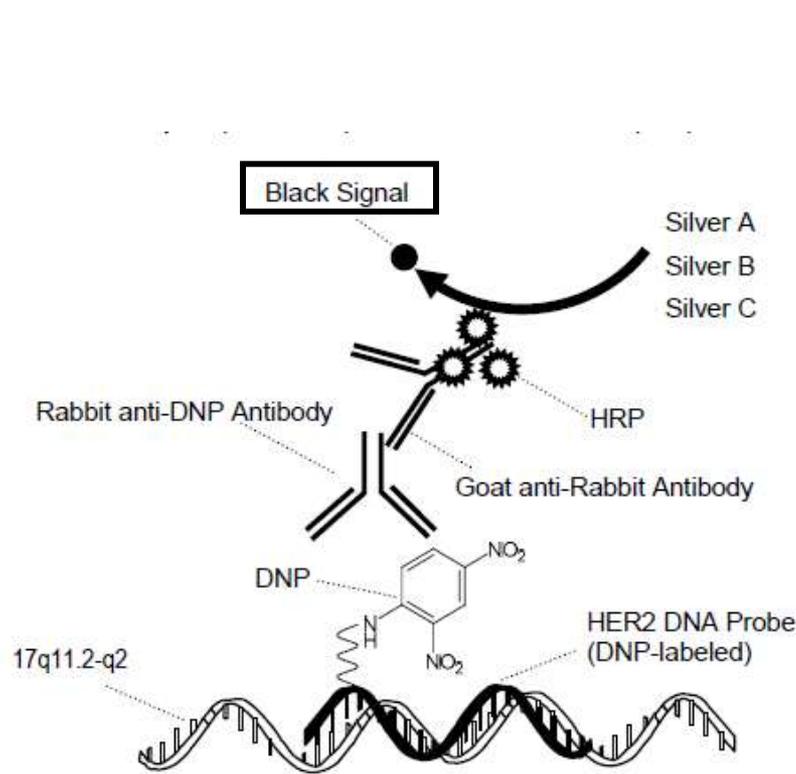


Figura 1. SISH Reaction for HER2 Detection

Sonda HER2: reacción enzimática antígeno-anticuerpo (Rabbit-anti-DNP), utilizando la plata como cromógeno

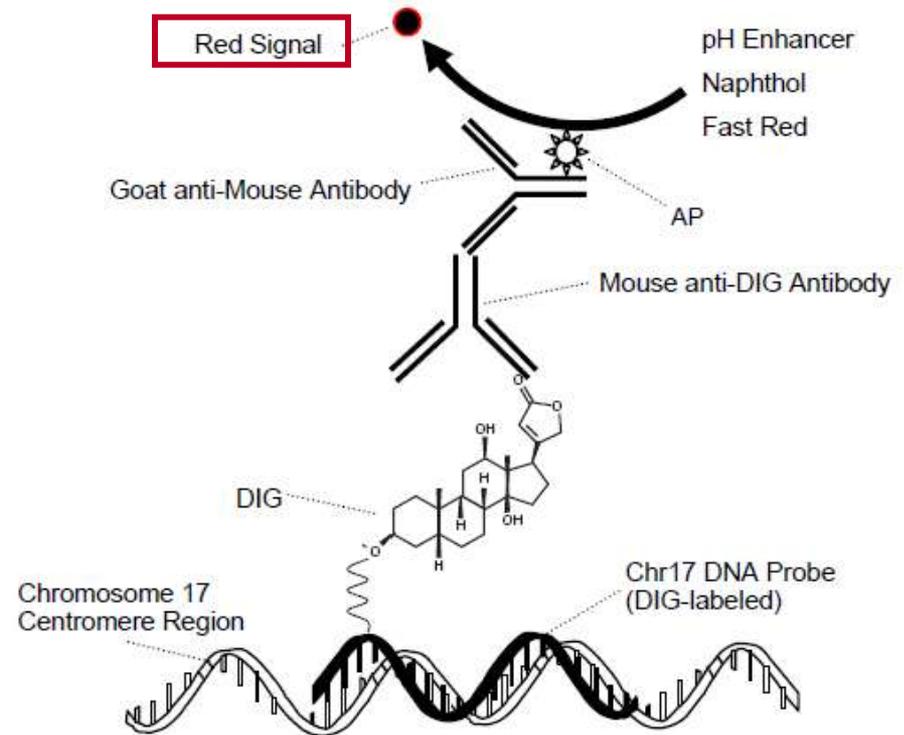
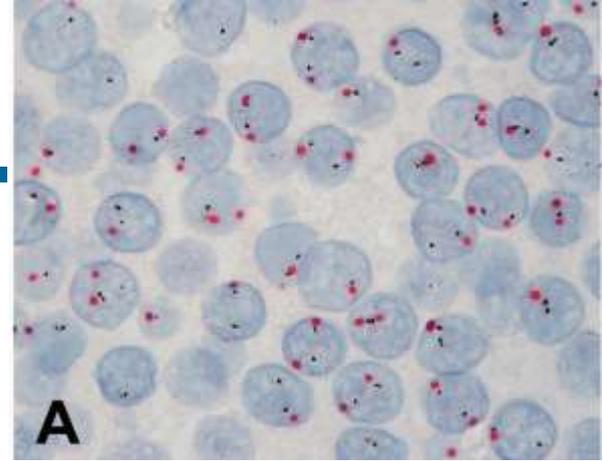


Figura 2. Red ISH Reaction for Chromosome 17 Detection

Sonda CEP17: reacción enzimática antígeno-anticuerpo (Mouse anti-DIG), utilizando la fosfatasa alcalina (AP) como cromógeno

VENTAJAS DE LA TÉCNICA SISH



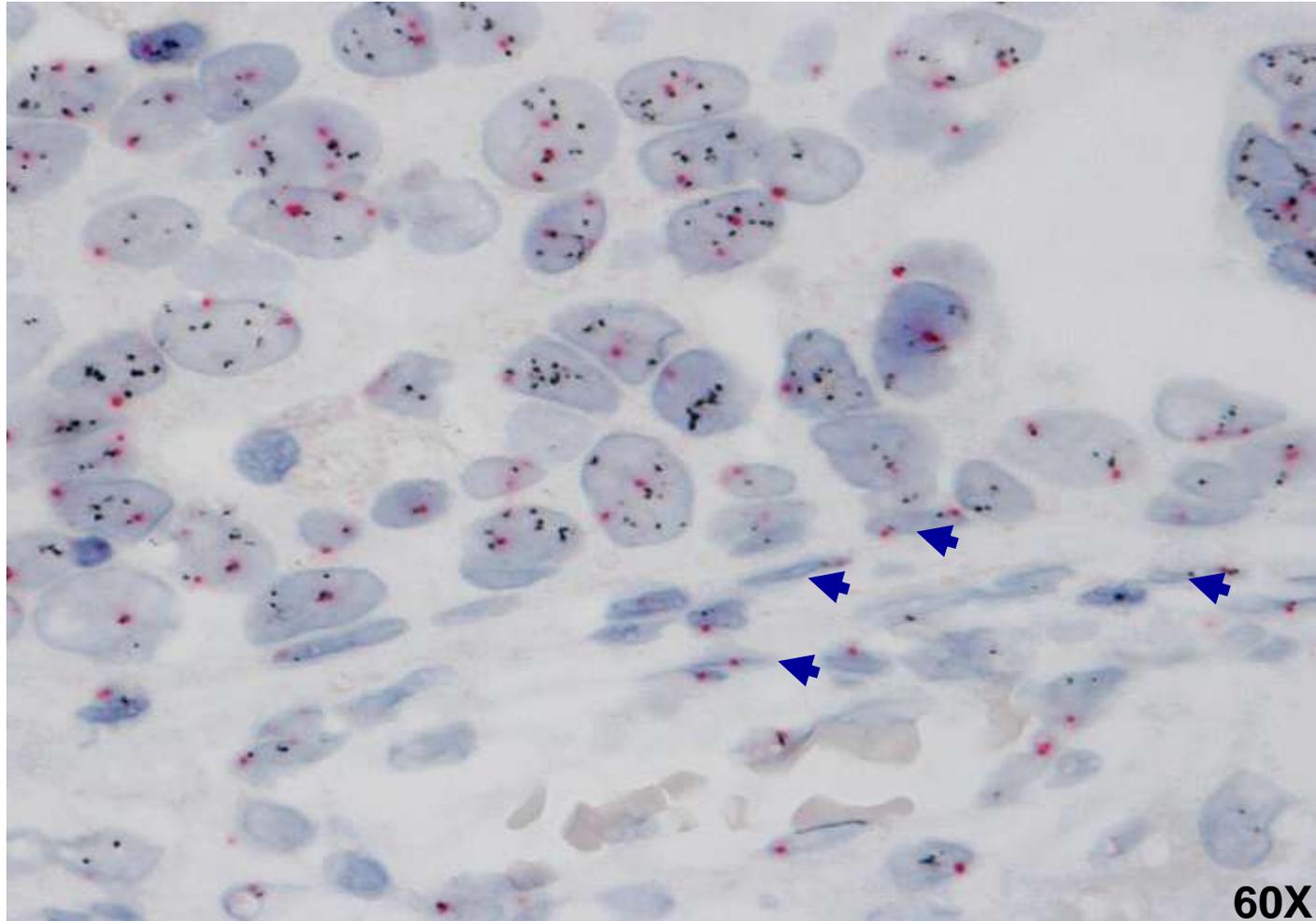
- Proceso totalmente **automatizado**
- Observación en **microscopio óptico** de campo claro
- Identificación del área histológica a analizar con mayor precisión
- Portaobjetos archivables
- Elevada sensibilidad, detección de hasta una sola copia del gen
- Flexibilidad, puede ser programado como DUAL SISH o SINGLE SISH

INTERPRETACIÓN DE LA HIBRIDACIÓN

- Identificación del área histológica con infiltración tumoral (20x, **40x**, 60x, 100x)
- Localización de señales de hibridación en células control (fibroblastos, linfocitos, células endoteliales, etc.)
- Si las células control muestran señales de hibridación correctas, proceder al estudio del área tumoral
- HER2/CEP17
 - En aquellas áreas heterogéneas para número de copias de HER2, contar únicamente aquellos núcleos que son representativos de la población tumoral, con el máximo número de señales para las dos sondas
 - Analizar 60 núcleos, y de cada uno de ellos anotar el número de copias para HER2 y para CEP
 - Calcular el ratio HER2/CEP17 (media o moda)

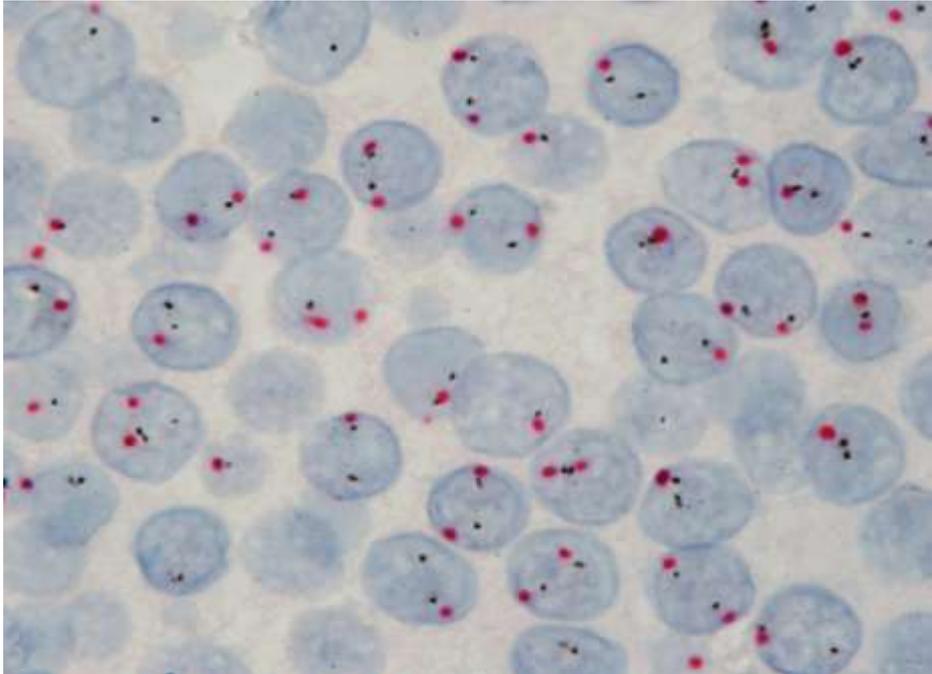
HER2/CEP17

HER2
Cromosoma 17 (CEP17)

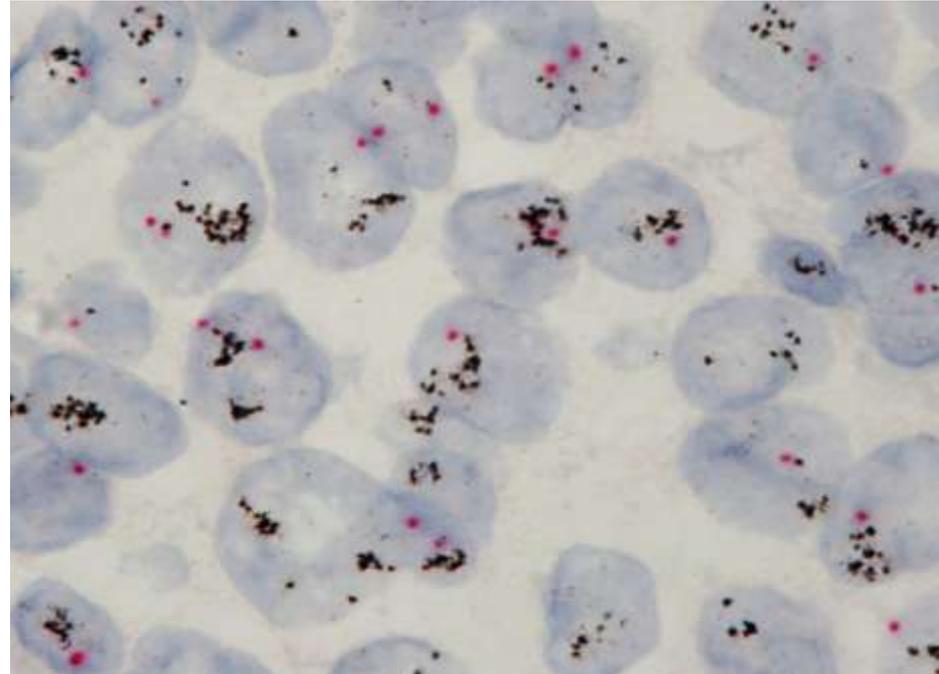


Control interno. Fibroblastos

HER2 EN CÁNCER DE MAMA



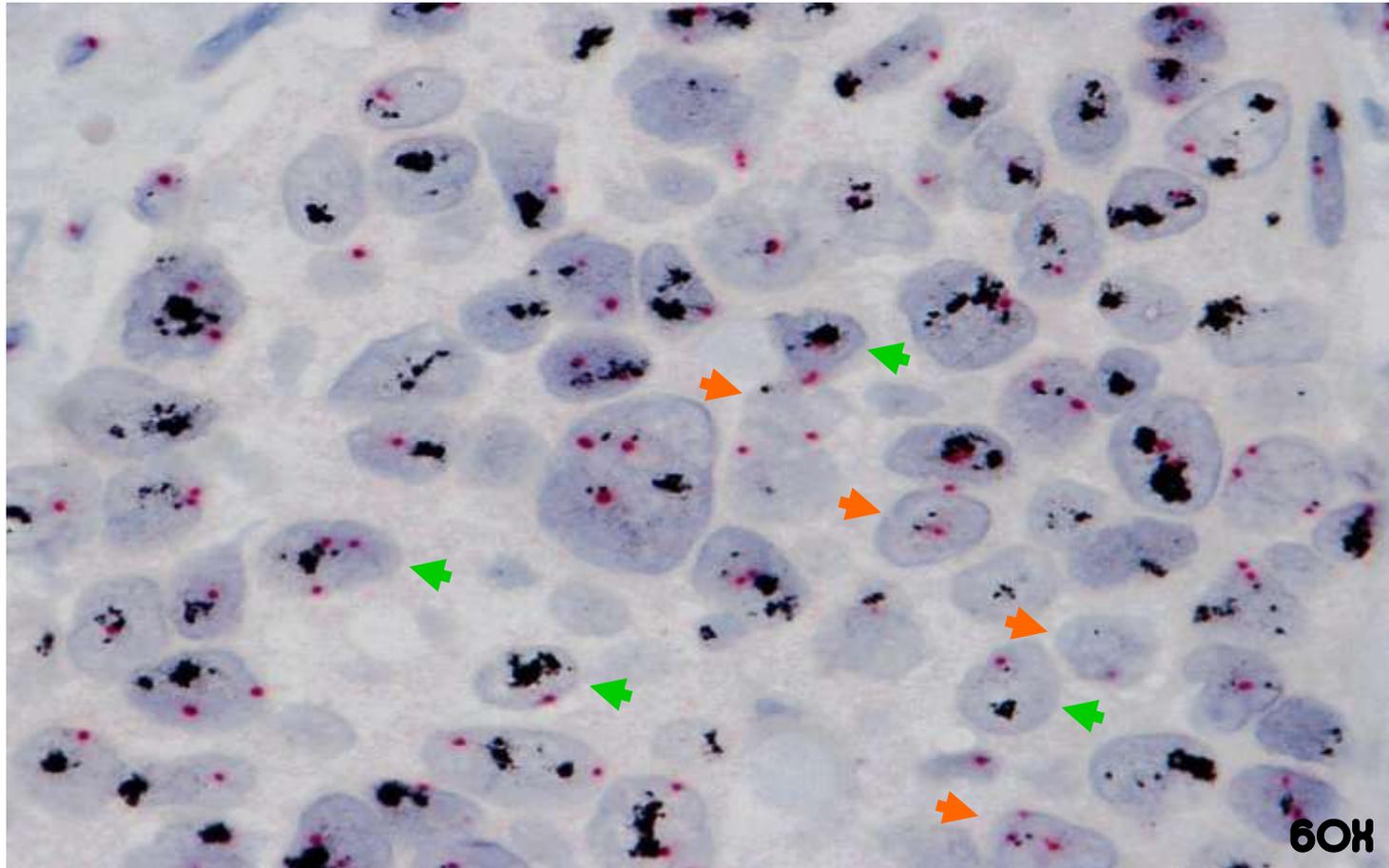
***HER2* no amplificado**



***HER2* amplificado**

HER2
Cromosoma 17 (CEP17)

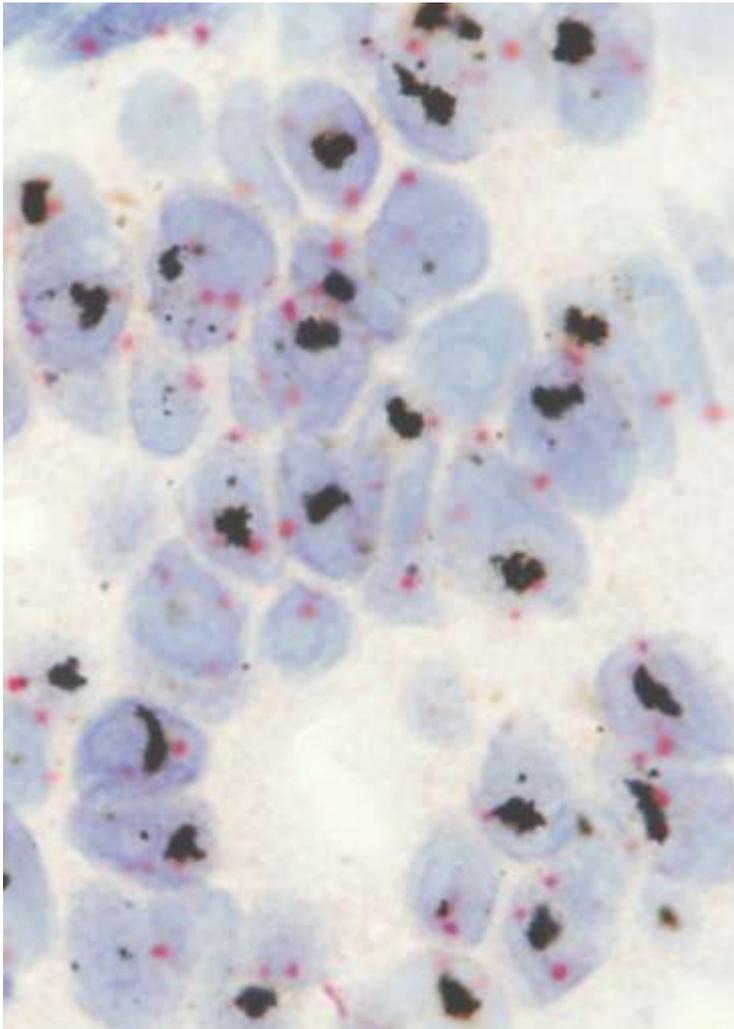
HER2 EN CÁNCER DE MAMA



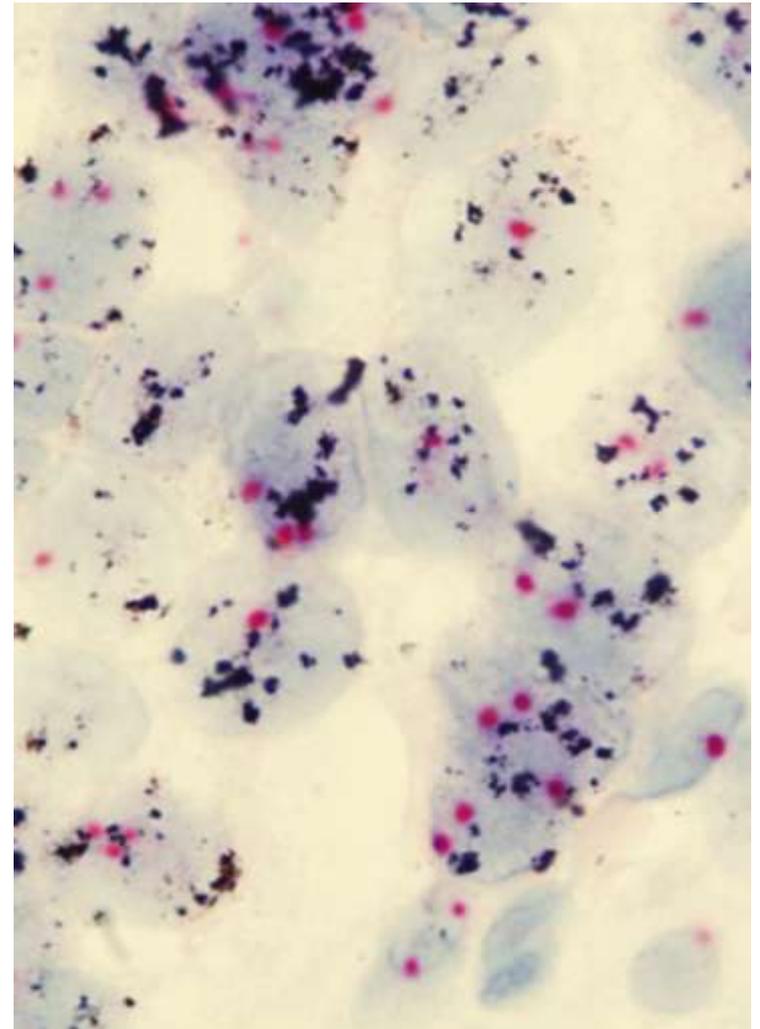
Heterogeneidad entre la población tumoral

HER2 EN CÁNCER GÁSTRICO

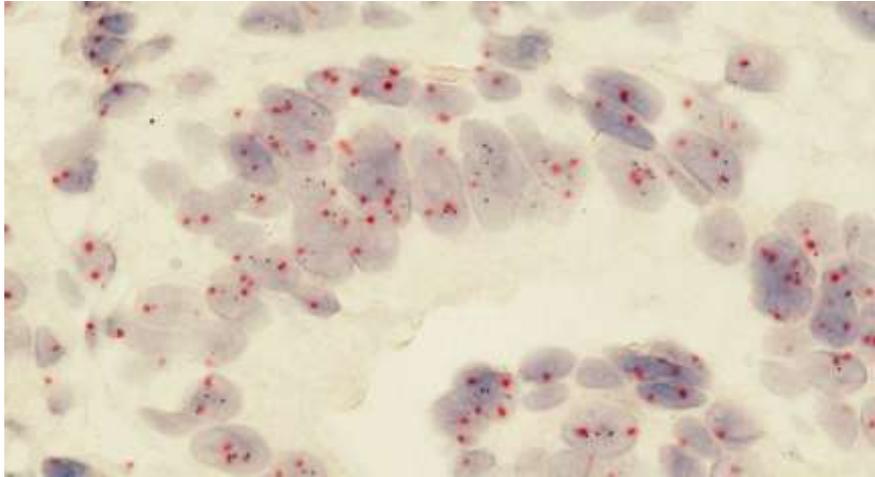
Amplificación en clusters



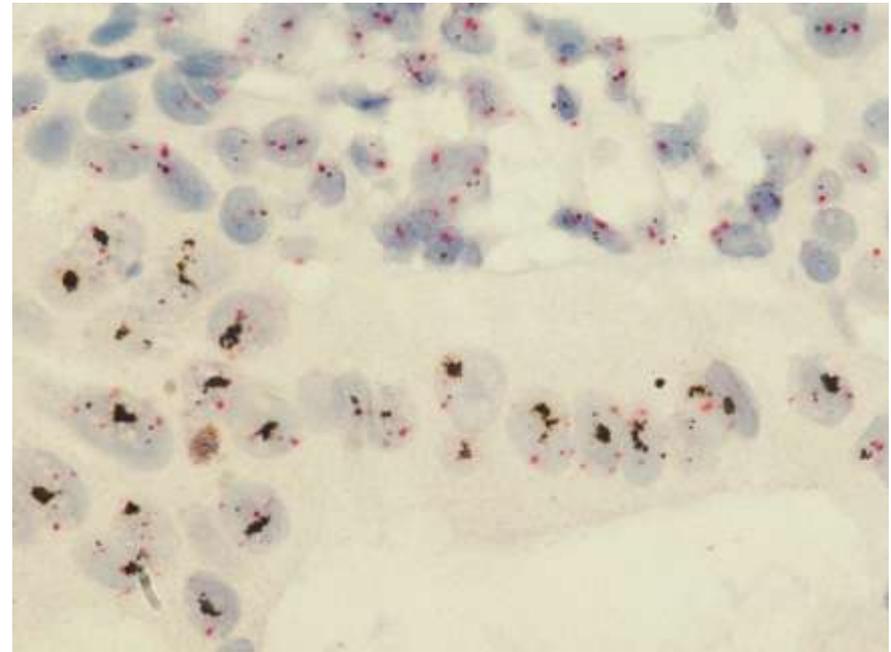
Amplificación dispersa



HER2 EN CÁNCER GÁSTRICO

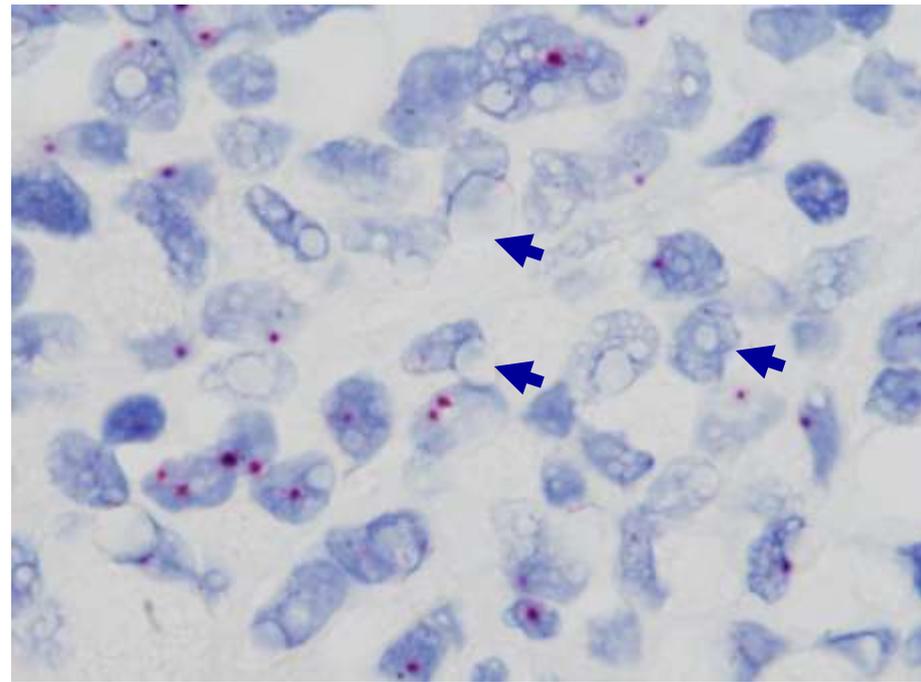
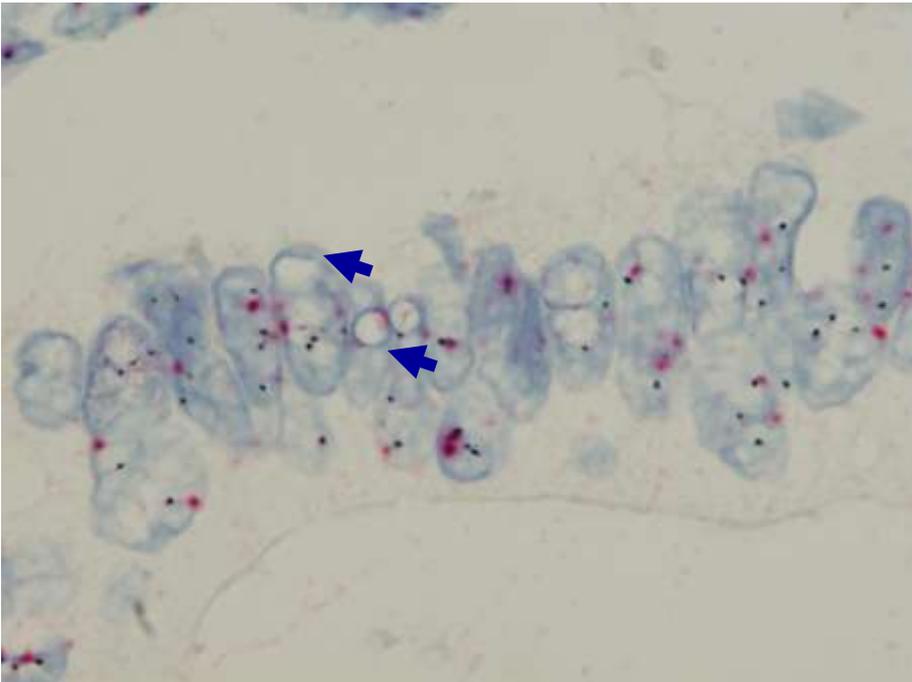


**HETEROGENEIDAD DE LA
AMPLIFICACIÓN/POLISOMIA**



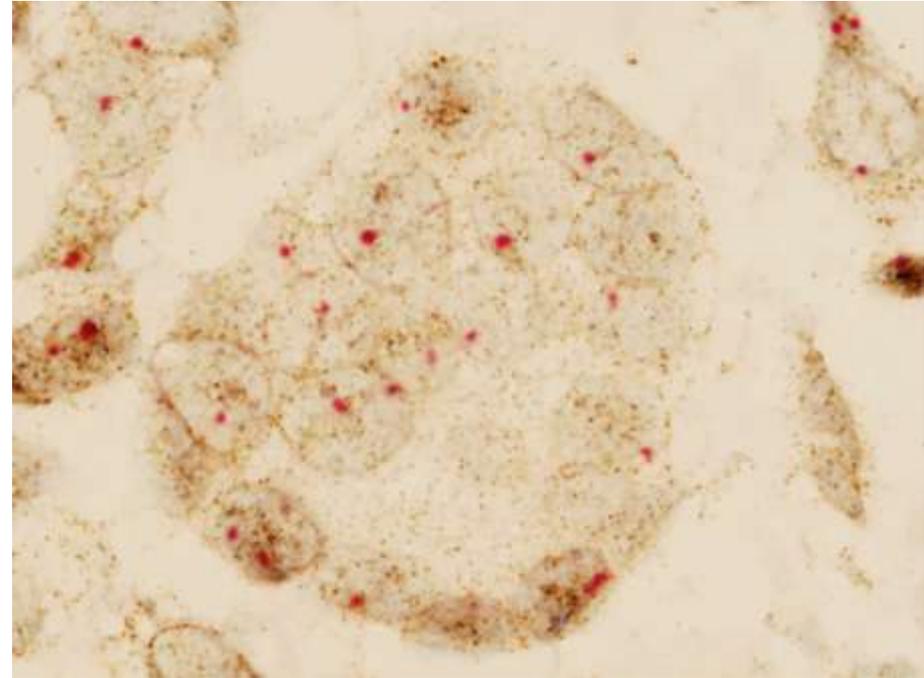
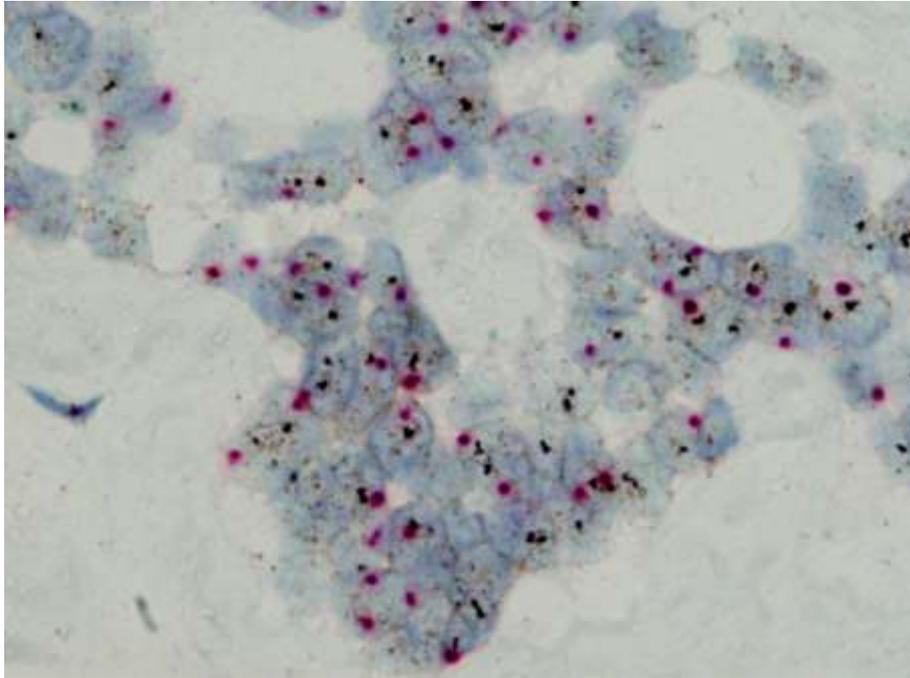
**FOCALIDAD DE LA
AMPLIFICACIÓN/POLISOMIA**

ARTEFACTOS QUE INVALIDAN LA VALORACIÓN DEL SISH



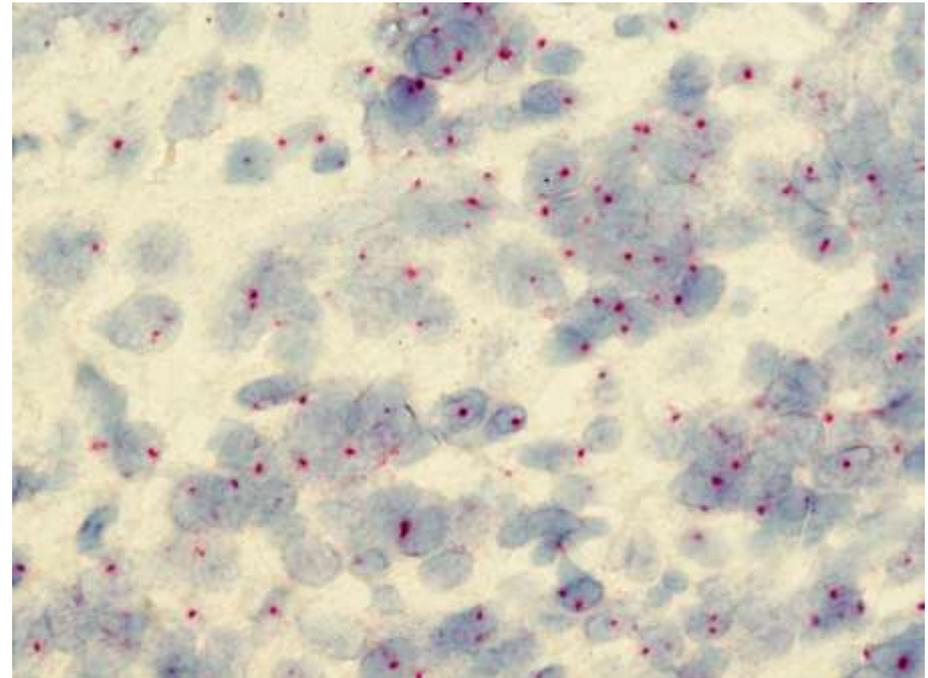
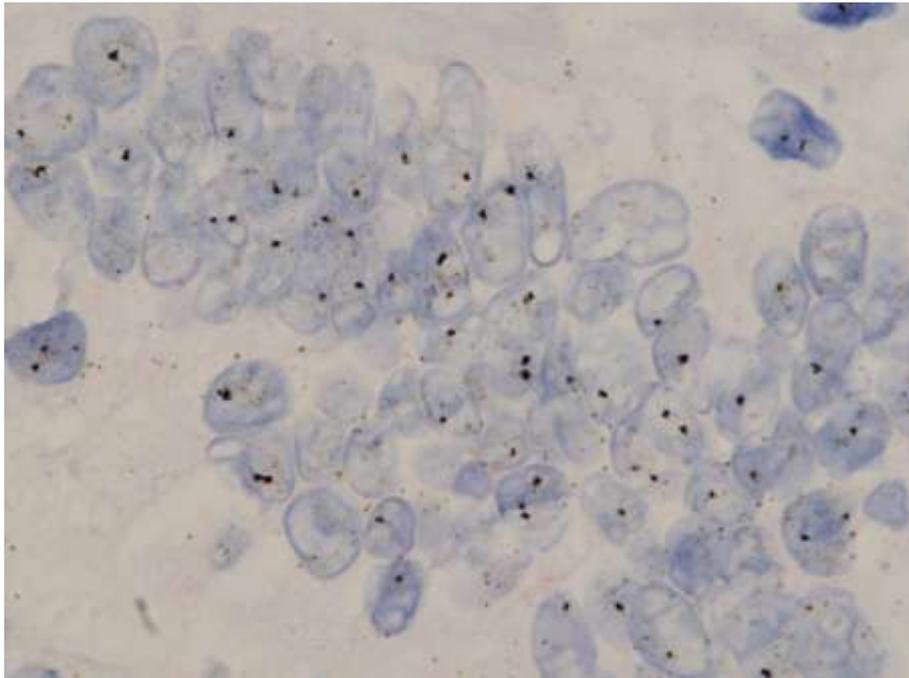
Desparafinado insuficiente, *nuclear bubbling*

ARTEFACTOS QUE INVALIDAN LA VALORACIÓN DEL SISH



Ruido de Fondo, polvo nuclear

ARTEFACTOS QUE INVALIDAN LA VALORACIÓN DEL SISH



Falta de hibridación de una de las dos sondas

Agradecimientos



Laboratori de Citogenètica Molecular
Laboratori de Citologia Hematològica
Laboratori de Biologia Molecular
Servei de Patologia

