

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



IMPLEMENTACION DE LA TECNICA DE
HIBRIDACION IN SITU CON FLUORESCENCIA
(FISH) EN EL LABORATORIO DE HEMATOLOGIA
CLINICA PARA EL DIAGNOSTICO Y SEGUIMIENTO
DE PACIENTES CON LEUCEMIA GRANULOCITICA
CRONICA

POR:

Q.C.B. ERIKA JEANETTE QUINTANILLA VILLARREAL

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TITULO DE ESPECIALISTA EN EL LABORATORIO
DE HEMATOLOGIA

MONTERREY, N. L., A AGOSTO DEL 2004

2004

c.1

2004

.Q5

RC643

TE

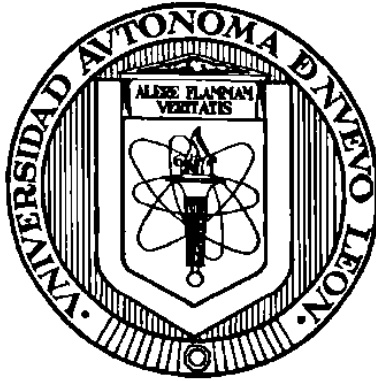
Q.C.B. BARKER JOURNAL QUINTE VILLARREAL



1080111095

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**IMPLEMENTACION DE LA TECNICA DE HIBRIDACION IN SITU
CON FLUORESCENCIA (FISH) EN EL LABORATORIO DE
HEMATOLOGIA CLINICA PARA EL DIAGNOSTICO Y
SEGUIMIENTO DE PACIENTES CON LEUCEMIA
GRANULOCITICA CRONICA**

POR:

Q.C.B. ERIKA JEANETTE QUINTANILLA VILLARREAL

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE
ESPECIALISTA EN EL LABORATORIO DE HEMATOLOGIA**

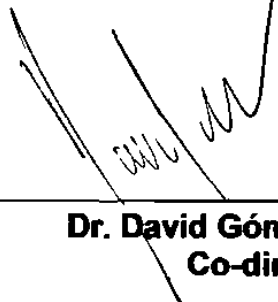
MONTERREY, N. L., A AGOSTO DEL 2004

**IMPLEMENTACION DE LA TECNICA DE HIBRIDACION IN SITU CON
FLUORESCENCIA (FISH) EN EL LABORATORIO DE HEMATOLOGIA
CLINICA PARA EL DIAGNOSTICO Y SEGUIMIENTO DE PACIENTES
CON LEUCEMIA GRANULOCITICA CRONICA**

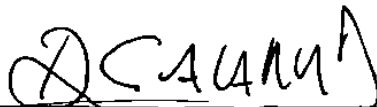
Aprobación de Tesis:



Dr. José Carlos Jaime Pérez
Director



Dr. David Gómez Almaguer
Co-director



Dr. Dionicio A. Galarza Delgado
Subdirector de Investigación y
Estudios de Posgrado

DEDICATORIA

A MIS PADRES.....

Ramón Quintanilla González. y Ma. Guadalupe Villarreal de Q.

Por su gran apoyo en estos pasos de superación,
por su ayuda incondicional, por creer en mí y respetar
siempre mis decisiones, muchas gracias.

A MI HIJO.....

Eduardo Álvarez Quintanilla

A ti especialmente por ser el centro y motor de mi vida,
por ser mi motivo de superación gracias por tu paciencia
y comprensión todo es por ti y para ti.

A MIS HERMANOS.....

Ramón y Ernesto Quintanilla Villarreal

Por su apoyo moral y comprensión
en los momentos difíciles, gracias.

A TI.....

Eduardo Álvarez Lozano

Por tu ayuda y apoyo, por darme lo mejor que tengo en mi vida
y por dejarme aún ser parte de tu corazón, gracias.

AGRADECIMIENTOS

Dr. José Carlos Jaime Pérez....

Por brindarme su confianza, conocimientos, apoyo y su valiosa asesoría para la realización de este trabajo.

Dr. David Gómez Almaguer....

Por aceptarme ser parte del Departamento, por su apoyo y por compartir sus conocimientos y sugerencias en este trabajo.

Q.C.B. Rosario Salazar Riojas....

Por dejarme ser parte de su equipo de trabajo, por su apoyo, su enseñanza, experiencia y conocimientos compartidos

Dr. Luis Javier Marfil Rivera....

Por su enseñanza, por ser un buen maestro y compartir sus conocimientos.

Dra. Rocío Ortiz López....

Por su ayuda brindada, facilitándome valiosa información para la realización de esta tesis.

A todos los Maestros de la Especialidad....

Dr. David Gómez Almaguer, Dr. Luis Javier Marfil Rivera, Dr. José Carlos Jaime Pérez, Dr. José Luis Herrera Garza, Dr. Oscar Martínez Llano, Dr. Carlos Almaguer Gaona.

A todo el Departamento de Hematología....

Q.C.B. Teresa Mayagoitia, Q.C.B. Nereida Méndez, Q.C.B. Odra Martínez, Q.C.B. Martha Reyes, T.L.C. Adriana Carrasco, Dra. Consuelo Mancías, Dra. Olga Cantú, Dr. Homero Gutiérrez, Dra. Carela Sandoval, Dra. Dinorah Barrera, Dra. Laura Bocanegra, Dra. Cristina Tovar, Q.C.B. Mayla Canales, Q.F.B. Arely Hernández, Lupita Cavazos, Lupita Hernández, Ana Elizabeth, Ana María, Claudia, Betty por su apoyo y amistad.

INDICE DE CONTENIDO

PORTADA	I
COMISION DE TESIS	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
INDICE DE FIGURAS	VIII
INDICE DE TABLAS	IX
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA	X
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	4
III. ANTECEDENTES	7
IV. JUSTIFICACIÓN	30
V. HIPÓTESIS	32
VI. OBJETIVO	33
VII. ESTRATEGIA GENERAL	34
VIII. MATERIAL Y MÉTODOS	35
8.1 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE INDIVIDUOS	35
8.2 EXTRACCIÓN DE SANGRE VENOSA	35
8.3 CULTIVO CELULAR	35

8.4 COSECHA CELULAR	36
8.5 PREPARACIÓN DE EXTENSIONES	37
8.6 TÉCNICA DE FISH	37
8.6.1 PREPARACIÓN DE LA SONDA	37
8.6.2 HIBRIDACIÓN	38
8.6.3 LAVADO DE LAS LAMINILLAS	38
8.7 APLICACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE CONTRASTE	39
8.8 OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA	39
8.9 OBTENCION DE RESULTADOS	40
IX. RESULTADOS	41
X. DISCUSIÓN	44
XI. CONCLUSIONES	49
XII. BIBLIOGRAFIA	51

INDICE DE FIGURAS

FIG.	DESCRIPCIÓN	PAGINA
	Fig. 1 Representación esquemática de la translocación 9/22 y la formación del Cromosoma Philadelphia presente en la <i>Leucemia Granulocítica Crónica</i>	14
	Fig. 2. Ilustración esquemática de varios tipos de sondas usadas en al citogenética molecular.	20
	Fig. 3 Representación esquemática de la Hibridación in situ con Fluorescencia.	21
	Fig. 4 Núcleos en Interfase positivos y negativos para la translocación <i>bcr/abl</i> .	43

INDICE DE TABLAS

TABLA	DESCRIPCION	PAGINA
1.	Alteraciones cromosómicas más características, genes implicados y su incidencia en diversas hemopatías malignas.	14
2.	Áreas de interés en la citogenética convencional y la citogenética molecular.	15
3.	Tipos de sondas y técnicas de FISH usadas en el análisis de rutina de citogenética molecular.	19
4.	Comparación de diferentes técnicas de citogenética.	27
5.	Múltiples ventajas de la aplicación del FISH	28
6.	Comparación de la técnica de citogenética convencional con la citogenética interfásica.	29
7.	Comparación de los resultados obtenidos en el Laboratorio de Hematología y el laboratorio de Referencia Internacional IMPATH.	42
8.	Biometría Hemática de los pacientes al momento del estudio.	48

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

ADN.....	Acido desoxirribonucleico
CGH.....	Hibridación Genómica Comparada.
CISS.....	Supresión cromosomal in situ.
Cr.....	Cromosoma.
del.....	Delección.
Fig.....	Figura.
FISH.....	Hibridación in situ con Fluorescencia.
FITC.....	Isiotiocianato de fluoresceína.
HCL.....	Acido clorhídrico.
i, iso.....	Isocromosoma.
inv.....	Inversión.
LGC.....	Leucemia Granulocítica Crónica.
ml.....	Mililitro.
p.....	Brazo corto del cromosoma.
p120.....	Proteína 120.
p190.....	Proteína 190.
Pacs.....	Cromosomas artificiales de filamentos.

PCR.....	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
Ph.....	Philadelphia.
q.....	Brazo largo del cromosoma.
RNA.....	Acido ribonucleico.
t.....	Translocación.
Yacs.....	Cromosomas artificiales de levadura.

I. RESUMEN

La Leucemia Granulocítica Crónica es una malignidad hematológica que proviene de una célula madre pluripotencial, se presenta generalmente en adultos con una mediana de edad alrededor de los 50 años, con un ligero predominio en varones, aunque también puede presentarse rara vez en niños. (1)

Las características patológicas principales de esta enfermedad son la presencia de granulocitosis, anemia, basofilia, trombocitosis y esplenomegalia. (2). El 95 % de los pacientes con Leucemia Granulocítica Crónica presentan cariotipos anormales, lo cual ha llevado a entender la gran utilidad y ayuda que presta la citogenética en el diagnóstico y manejo de esta clase de neoplasias.

La anomalía genética presentada en estos pacientes es la translocación t(9:22)(q34; q11) cuyo derivado 22 q- es el cromosoma Philadelphia (Cr. Ph1). A nivel molecular se forma el gen híbrido bcr/abl. El cromosoma Philadelphia y el gen bcr/abl constituyen los marcadores genéticos para el diagnóstico y seguimiento del clon neoplásico. (3).

Estas alteraciones genéticas pueden observarse por métodos citogenéticos convencionales, sin embargo estos han enfrentado problemas para la

identificación de reordenamientos cromosómicos complejos. La Hibridación In Situ con Fluorescencia ofrece la posibilidad de identificar estas alteraciones con más exactitud ya que detecta solamente aquello que buscamos es por eso que está técnica complementa perfectamente a la citogenética convencional.

Con el propósito de implementar esta técnica se analizaron muestras de sangre periférica de pacientes los cuales presentaban la enfermedad (Leucemia Granulocítica Crónica) y fueron tratados con Gleevec, estas muestras fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (GIBCO, 27016-021 Life Technologies, Long Island, New York) por 24 hrs., posteriormente cosechadas y fijadas con el propósito de obtener células en metafase, (4) después se realizó la técnica de Hibridación In Situ con Fluorescencia utilizando una sonda comercial para los genes *bcr/abl* (LSI BCR/ABL (ES) (Vysis 310191009, Downers, Grove IL, USA) (Protocolo de la Unidad de Genética del Instituto Nacional de Nutrición "Salvador Zubirán"). Se analizaron en el microscopio de fluorescencia, observándose en todos los casos solo núcleos en interfase y se realizó un conteo de 200-500 células para la obtención de los resultados, contándose los núcleos positivos (observándose una señal amarilla producto de la combinación de las señales verde del gen *bcr* y roja del gen *abl* ó la unión de ambas señales) y negativos para la translocación (dos señales verdes y dos rojas).

Finalmente se obtuvo el porcentaje por regla de tres simple de núcleos positivos, estos fueron comparados con los resultados del Laboratorio de Referencia Internacional (IMPATH, Los Angeles C.A., USA) la concordancia obtenida fue del 62 %. Los pacientes siguen siendo tratados y se lleva a cabo su seguimiento periódicamente.

II. INTRODUCCIÓN

La Leucemia Granulocítica Crónica (LGC) es el síndrome mieloproliferativo crónico de mayor importancia clínica por su frecuencia y pronóstico. La LGC representa el 15-20 % de todas las leucemias. Su incidencia en los países occidentales es de 1,5 nuevos casos por 100.000 habitantes y año. Puede aparecer a cualquier edad, pero es muy rara en la infancia, predominando en las edades media y avanzada de la vida, con una mediana de edad en el momento del diagnóstico alrededor de los 50 años en las series recientes y un pico de incidencia máxima de los 30 a los 40 años. Predomina ligeramente en varones y su incidencia familiar es excepcional. (1)

Se trata de una proliferación de carácter clonal que tiene su origen en una célula madre (stem cell) pluripotencial común a las tres series hemopoyéticas, si bien el cuadro clínico, biológico e histológico de la enfermedad, está determinado por una intensa proliferación de la serie granulocítica en la médula ósea, la sangre periférica y otros órganos hematopoyéticos, fundamentalmente el bazo. La enfermedad tiene típicamente un curso evolutivo bifásico, en el que la fase inicial o crónica, fácil de controlar con diferentes medidas terapéuticas, sigue un período agudo final o crisis blástica, similar a una leucemia aguda pero de pronóstico mucho más desfavorable por su resistencia al tratamiento.

En muchos pacientes se intercala entre ambas fases un tercer período, la fase de aceleración. (1).

Desde el punto de vista biológico, el hecho que confiere a la LGC una mayor personalidad es la presencia en la mayoría de los pacientes de una anomalía cromosómica en la médula ósea, el denominado cromosoma Filadelfia o Ph cuya contrapartida molecular es el gen *bcr/abl*, reflejo del intercambio del material genético entre los cromosomas 9 y 22 en las células hematopoyéticas. (5).

Más del 95% de las Leucemias Granulocíticas Crónicas (LGC) presentan la t (9; 22), aproximadamente 5 % de los pacientes con LGC típica pueden presentar variaciones del Ph descrito originalmente, esto es translocaciones de otros cromosomas, aparentemente, pueden ser denominados dos grupos variantes: simples donde un segmento perdido del cromosoma 22 es translocado a otro cromosoma que no es el 9 y múltiples donde tres o más cromosomas están involucrados (2). Además esta es presente en otros desórdenes oncohematológicos como la Leucemia Linfocítica Aguda (25% de los casos adultos y 5% de los casos pediátricos) y la Leucemia Mieloide Aguda (1% de los casos). (6).

Cuando la enfermedad entra en fase aguda, muchos de los pacientes con LGC (80%) muestran evolución cariotípica con la presencia de una nueva anomalía cromosomal en adición al cromosoma Ph.

Estos cambios son considerados como un signo grave de pronóstico. Con excepción de un isocromosoma del brazo largo del cromosoma 17, i (17) (q10) el cual es usualmente asociado con transformación mieloide blástica. (2).

El más común de los cambios es, una ganancia de los cromosomas 8 y 19 ó un segundo cromosoma Ph o una i (17q). (2).

La translocación bcr/abl puede ser detectada por diferentes métodos moleculares PCR, Southern Blot entre ellos la Hibridación In Situ con Fluorescencia esta es una nueva tecnología que se basa 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. La alta sensibilidad y especificidad de la FISH y la rapidez de los ensayos han hecho de esta técnica una importante estrategia diagnóstica con numerosas aplicaciones. (6).

III. ANTECEDENTES

La primera anomalía que fue identificada en varias enfermedades neoplásicas fue la de la Leucemia Granulocítica Crónica, cuyas características principales son: la presencia de anemia, granulocitos, basofilia, trombocitosis y esplenomegalia. (2).

En 1845, Bennet en Escocia y Virchow en Alemania publicaron descripciones de pacientes con esplenomegalia, anemia severa y una enorme concentración de granulocitos en la sangre obtenida durante la autopsia (7). Casos adicionales fueron reportados por Craige y en 1847 Virchow introdujo la designación Leucemia.

En 1878 Neuman señaló que la médula no era solo el sitio de producción de células de la sangre sino, que era el sitio en donde se originaba la leucemia e introdujo el término de leucemia mielógena. (8).

En 1960 Nowell y Hungerford reportaron 2 pacientes con la enfermedad los cuales presentaban la pérdida del brazo largo del cromosoma 21 o 22 esta anomalía fue rápidamente confirmada y se designó como cromosoma Philadelphia. (9).

Esta observación tuvo una enorme repercusión en los métodos de diagnóstico de la LGC proporcionando un marcador para el estudio de la patogénesis y un foco para futuros estudios moleculares de la LGC.

La aparición de más técnicas de bandeado sensibles para definir la estructura de los cromosomas, permitió el descubrimiento de Rowley quien demostró que la aparente pérdida del material del cromosoma 22 era parte de una translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22. (2)

El descubrimiento del oncogen ABL en el cromosoma 9 y el segmento del cromosoma 22 (BCR), y su resultado como translocación estableció la base del estudio molecular de la enfermedad. (10).

La $t(9:22)$ ocurre en las células madre pluripotenciales y es identificada en el 92 % de los pacientes con LGC el otro 6 % presentan una translocación variante que envuelve un tercer cromosoma aparte del 9 y 22. (2) (Tabla 1).

Esta translocación es recíproca, es decir que el cromosoma 9 también transfiere parte del material genético de sus brazos largos al cromosoma 22. (Fig. 1).

En la región 22 se encuentra la región bcr denominada gen BCR, en el cual se puede distinguir la región mayor (M-bcr) entre los exones 12 al 16 y la región menor (m-bcr) ubicada entre los exones e2' y e2 y la micro región (u-bcr) ubicada en el exon 19, cuando una parte del gen ABL (Abelson) localizado en el

cromosoma 9, es transferida e insertada dentro del gen BCR se origina el gen de fusión BCR-ABL. Los puntos de rupturas más frecuentes en el gen BCR ocurren en los exones: 1 (e1), 12(b2), 13(b3) y 19(e19) y el punto de ruptura en el gen ABL habitualmente se produce en el exon 2 (a2), generando los reordenamientos e1a2, b2a2 o b3a2 y e19a2.(11).

Esta fusión del gen bcr/abl da lugar a la formación de dos proteínas quiméricas llamadas respectivamente proteína 120 (p120) y proteína 190 (p190), las cuales incrementan de forma importante la actividad de la enzima tirosina cinasa, que es la encargada de regular el crecimiento y proliferación celular, y cuya actividad está aumentada (1).

Esta proteína anómala es la causante de la transformación neoplásica de las células hematopoyéticas, hipótesis apoyada por la observación de una enfermedad similar a la LGC en animales de experimentación tras infundirles sus propias colonias hematopoyéticas previa incorporación a las mismas del gen de la proteína p 120 en los cultivos hematopoyéticos.

La etiología de la LGC se desconoce, aunque se ha observado un aumento de su incidencia tras la exposición a radiaciones ionizantes o a ciertos agentes químicos como el benceno. No se ha podido demostrar la implicación de virus en la aparición de la enfermedad. (1).

La hibridación in situ (ISH) puede ser definida como la localización morfológica de secuencias genéticas. El objetivo del FISH es determinar la presencia o ausencia de DNA o RNA específicos y su localización en sitios cromosomales de la célula. (12).

La localización de secuencias específicas dentro de la célula se logra explorando las propiedades fundamentales que los ácidos nucleicos tienen para alinearse uno con otro de una manera específica para formar híbridos. Esto no solo se observa en dos cadenas complementarias de DNA sino también en combinaciones de RNA-DNA y RNA-RNA, así como en híbridos entre ácidos nucleicos naturales y artificiales. El marcaje de cada uno de estos puede ser detectado por métodos isotópicos y no isotópicos (fluorescentes y no fluorescentes).

El diagnóstico de cromosomas de rutina utilizando los métodos de bandeo convencionales han sido utilizados durante las últimas tres décadas, sin embargo, la primera identificación de cromosomas fue mucho antes. Los cromosomas fueron originalmente vistos en el siglo pasado y fueron descritos como una estructura de cadena pesada en la célula de ahí su nombre (cromosoma de cadena y soma de cuerpo).

Su estudio ha tomado muchas décadas, sin embargo antes que la función de estos componentes celulares fueran identificados, su composición química ya se conocía.

Pero no fue hasta que Avery y col. demostraron en 1944 que el DNA era un factor transportador (el factor que transportaba la información genética de una célula a otra) fué entonces cuando este rol del material genético fue firmemente establecido. (13).

El desarrollo de los sistemas de cultivo de células junto con la colcemida y el tratamiento hipotónico fue obtenido en 1956 y finalmente se estableció que el hombre tenía 46 cromosomas y nació el campo de la citogenética.

Otro paso importante en la evolución de la citogenética vino con el descubrimiento de Caspersson et al (1968, 1971) quienes encontraron que la mostaza de quinacrina tenía la habilidad de crear discretas bandas fluorescentes longitudinales a lo largo de los cromosomas dando a cada cromosoma una identidad única con lo cual la microscopia fluorescente fue introducida en el campo de la citogenética humana.

La habilidad de identificar las bandas en cada cromosoma fué un paso importante en el incremento del poder de resolución del análisis, pudiendo así observar discretas aberraciones estructurales y su correlación con la enfermedad (13).

La necesidad de conocer el mapa de genes resulto en 1981 cuando el primer gen fue localizado por Hibridación In Situ utilizando marcaje radioactivo,

convirtiéndose en la primera opción de marcaje, sin embargo los métodos isotópicos requieren largos tiempos de exposición (semanas a meses) y la precisión es baja. El desarrollo de métodos fluorescentes basados en la Hibridación In Situ desarrollado en 1986 ofrece mayor rapidez y resolución junto con suficiente sensibilidad comparada con los métodos isotópicos.

Más tarde la fluorescencia fue adoptada como la mejor opción de marcaje , naciendo así el FISH. (Tabla 2).

La técnica de FISH fué desarrollada, independientemente por Pardue y Gall (1969) y John y colaboradores (1969). En esta época, la única forma de marcar los ácidos nucleicos era con isótopos radioactivos y su detección se debía realizar con autoradiografía.

Por otra parte, ya que en estos años las técnicas de clonado de ácidos nucleicos no estaban desarrolladas, las sondas utilizadas se unían a secuencias que podían ser aisladas y purificadas por medios bioquímicos (ADN satélite de ratón, ADN viral, ARNs ribosómicos) etc.

La técnica hibridación in situ con fluorescencia es ahora en día una poderosa y versátil herramienta en la citogenética clínica, la citogenética de tumores y la ciencia.

En sus inicios la técnica presentaba muchos problemas en su desarrollo, sin embargo, ahora esta técnica es establecida en muchos laboratorios citogenéticos clínicos así como también en muchas investigaciones moleculares en todo el mundo, permitiendo visualizar directamente alteraciones genéticas en la célula, su objetivo es el de demostrar estas alteraciones ya sean en forma de ganancias o pérdidas de segmentos de material cromosómico o para demostrar puntos de rupturas con o sin estas ganancias o pérdidas. (13).

El desarrollo de las técnicas de clonación de ácidos nucleicos y la mejora de las técnicas de marcaje han cambiado el panorama de la hibridación "in situ" en los últimos años.

La utilización de los isótopos radioactivos en el marcaje de la sonda hacía que la técnica estuviera circunscrita a los laboratorios de investigación. La preparación de sondas con marcaje no radioactivo, ha permitido que la Hibridación "in situ" sea utilizada en laboratorios tanto de investigación como de diagnóstico. Aunque la técnica puede ser visualizada en un microscopio de campo claro, en la actualidad, la utilización de moléculas fluorescentes ha hecho que, prácticamente la casi totalidad de las hibridaciones citológicas, se realicen mediante la técnica de FISH.

TABLA 1
Alteraciones cromosómicas más características, genes implicados y su incidencia en diversas hemopatías malignas

Enfermedad	Alteración cromosómica	Genes implicados	Frecuencia (%)
Leucemia granulocítica crónica	t(9;22) Ph	ABL-BCR	95
Leucemia aguda no linfoblástica	M2 t(8;21)(q22;q22)	ETO-AML1	20
	M3 t(15;17)(q22;q11-12)	PML-RARA	90
	M4E0 inv(16)(p13q22)	MYH11-CBFB	60-80
	M5 t(9;11)p(22;q23)	AF10-MLL	35
Leucemias agudas secundarias	del(5q)		90
	del(7q)		90
Leucemia linfoblástica aguda	t(9;22) Ph	ABL-BCR	5 (niños) 15-20 (adultos)
	t(12;21)(p13;q22)	IL3-IGH	25
	L3 t(8;14)(q24;q32)	MYCIGH	85
	L3 t(8;22)(q24;q11)	MYC-IGL	10
Leucemia linfática crónica	B		
	t(14;19)(c32;q13)	IGH-BCL3	55
	del(11)(q21q23)		18
	trisomía 12		16
	T		
	inv(14)(q11q32)	TCRA-TCLI	
	t(14;14)(c11q32)	TCRA-TCLI	90
t(8;14)(q24;q11)	MYC-TCRA	80	
	11q23*		43

* Detectado por fibras de ADN

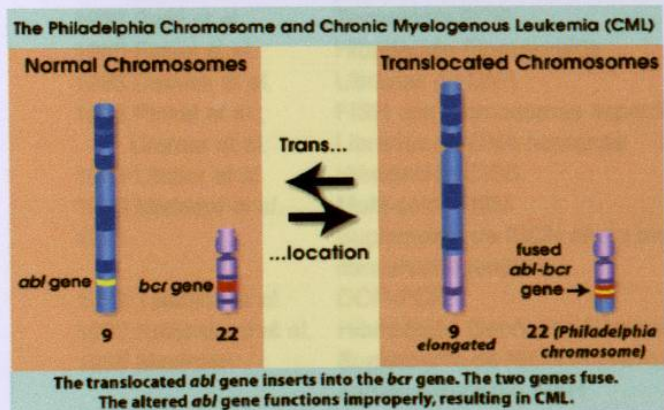


Fig. 1 Representación esquemática de la translocación 9/22 y la formación del cromosoma Philadelphia presente en la LGC

TABLA 2
Áreas de interés en la citogenética convencional
y la citogenética molecular

Primeros descubrimientos	Diferentes autores en el siglo 19	Teoría celular Leyes de la herencia de Mendel Primera identificación de figuras mitóticas
	1882 Flemming	Conducta de los cromosomas en la división celular
	1883 Roux	DNA- factor de transformación
	1944 Avery et al.	La doble hélice del DNA y sus implicaciones genéticas
	1953 Watson y Crick	46 cromosomas
Era pre-bandeo	1958 Tijo y Levan	Primer análisis de cromosomas en leucemias
	1958 Ford, Jacobs y Lajtha	Primer enfermedad cromosomal
	1959 Lejeune et al.	Síndrome de Down trisomía de uno de los cromosomas más pequeños
	1960	Conferencia de Denver los 23 pares de cromosomas divididos por morfología en 7 grupos (A-G)
	1960 Edwards et al.	Trisomía del grupo D y E del cromosoma
	1960 Nowell y Hungerford	Descubrimiento del cromosoma Ph
Era de bandeo	1968 Caspersson et al.	Bandeo con mostaza de quinacrina
	1970 Smith y Wilcox	Nacimiento de la genética molecular:
	1970 Chaudhuri et al.	Refinamiento del bandeo G y Q
	1971	Conferencia de París: Primera nomenclatura de los 23 pares de cromosomas
	1973 Cohen et al.	Primer reporte de DNA usando plásmidos y vectores
	1978 Yunis	Alta resolución del bandeo de cromosomas
Era del FISH	1981	Localización de copias simples de genes por hibridación <i>in situ</i>
	1981 Harper y Saunders Malcolm et al.	Tecnología PCR
	1986 Saiki et al.	Hibridación Fluorescente
	1986 Pinkel et al.	Librerías de DNA
	1986 Deaven et al.	FISH con cromosomas específicos de Librerías de DNA humanas
	1988 Pinkel et al.; Cremer et al.	Hibridación CISS
	1988 Litcher et al.	Multi-color FISH
	1990 Nedertof et al.	Suplemento de ISCN ahora incluyendo cancerocitogenética
	1991	DOP-PCR
	1992 Telenius et al.	Hibridación Genómica Comparada (CGH)
	1992 Kallioniemi et al.	Suplemento de ISCN ahora incluyendo nomenclatura del FISH
	1995 Mitelman	24-color cariotipo espectral
	1996 Schröck et al.; Speicher et al.	Cariotipo multicolor
	1998 Choudoba et al.	bar-coding alta resolución

Los requerimientos básicos de la *Hibridación In Situ con Fluorescencia (FISH)* son los siguientes:

- a) Sonda específica para la secuencia de interés.
- b) Marcaje fluorescente de la sonda que permita una detección apropiada.
- c) Espécimen biológico debidamente preservado para poder determinar la localización de la sonda marcada después de la hibridación. (14).

El protocolo estándar del FISH puede describirse en seis pasos cada uno es crucial para obtener resultados exitosos (Levy 1995, Choo 1994, Wilkinson 1992):

1) Preparación de la muestra: El FISH puede ser usado para analizar una amplia variedad de material celular y cada tipo de muestra requiere de un tratamiento específico. Para la preservación morfológica cuando se usan células individuales o cromosomas obtenidos de cultivos de células se requiere una fijación, usando etanol al 70 % y el fijador convencional usado en citogenética (metanol-ácido acético 3:1) ya que esto permite el almacenamiento indefinido a menos 20 ° C. En cada una de las células que han sido fijadas, los ácidos nucleicos dentro de ellas son desenmascarados, este proceso requiere de una proteólisis, la más frecuentemente usada es la proteinasa K o pepsina HCL sin embargo, otras enzimas pueden ser utilizadas. Este proceso remueve componentes del núcleo o citoplasma de la célula para permitir el acceso de la sonda.

2) Preparación y marcaje de la sonda: Muchos tipos de sondas pueden ser usados en el FISH y el tipo apropiado es determinado por la aplicación y diagnóstico requerido. (Fig. 2). Un punto crucial para decidir la mejor opción es la sensibilidad y considerar que secuencia de interés debe ser detectada, esto depende de varios factores tales como el tamaño de la secuencia de interés, si la secuencia es única o tiene copias múltiples, y el tamaño de la sonda. La elección del marcaje está dado por preferencias personales y en muchas situaciones por cuestiones comerciales. La mayoría de los laboratorios utilizan marcajes no isotópicos exclusivamente, los más comúnmente usados son FITC, Rodamina y Rojo Texas. (Tabla 3).

3) Desnaturalización de la sonda y muestra: Cuando el DNA de la sonda es usado para la detección de DNA de la muestra dentro de células o tejidos la desnaturalización es un paso importante para el éxito de la hibridación, esto se lleva a cabo con componentes químicos o por calor para separar la doble hélice de DNA, usualmente la temperatura de separación es muy elevada para que tome lugar la separación y preservación de la muestra. El DNA de la sonda y la muestra pueden ser desnaturalizados por separado o por co-desnaturalización, sin embargo la separación por separado preserva mejor la morfología, en cambio la co-desnaturalización es más práctica ya que reduce el número de pasos para llevar a cabo la técnica.

4) *Hibridación de la sonda con la muestra:* Esta es llevada a cabo disminuyendo la temperatura para alinear la sonda y la muestra y por un tiempo de incubación largo generalmente 22 horas. (Fig. 3).

5) *Lavado post-hibridación:* Después de la hibridación la sonda no embonada es removida, el lavado de la sonda se realiza con solución salina (SSC salina citrato estándar). La especificidad de este lavado puede ser regulado por los siguientes parámetros: concentración de la sal de la solución de lavado, concentración de formamida, y temperatura.

6) *Detección:* Después del lavado la presencia y localización puede demostrarse visualizando inmediatamente en el microscopio de fluorescencia usando los filtros apropiados de excitación y emisión. Antes de que las muestras sean analizadas, los cromosomas o núcleos son contrastados con DAPI (4,6 diamino-2-fenilindol) el cual emite luz azul, siendo el mas comúnmente usado para contrastar debido a que las sondas son marcadas con FITC (verde), rodamina / rojo Texas (rojo), o ambas si 2 sondas son hibridizadas simultáneamente.(13).

TABLA 3
Tipos de Sondas y Técnicas de FISH usadas en análisis de rutina de citogenética molecular

Origen de la prueba	Tipo de prueba	Tamaño del blanco de prueba	Técnica de FISH	Tipos de aberraciones cromosómicas identificadas
Cromosomas purificados Regiones de cromosomas purificados (ejem. Brazos o bandas de cromosomas)	Sorting Microdissección	> 1 Mb	Marcaje de cromosomas completos (complejidad y marcaje reverso) Marcaje específico de brazos Multicolor FISH y cariotipo 24-color ZOO-FISH	•Translocaciones (simples o compuestas) •Marcaje alrededor del cromosoma
Genes clonados o secuencias de DNA	YACs, PACs, Bacs	< 1 Mb	Locus específico ejem. genes simples ó secuencias centroméricas, sub-teloméricas ó familia de genes	•Microdelecciones •Amplificaciones •Anormalidades numéricas
DNA sintético, análogos sintéticos	Cósmidos Plásmidos Pruebas de RNA Oligonucleótidos PNA y LNA	< 0.1 Mb < 0.01 Mb < 0.01 Mb < 0.10 kb	Expresión PRINS ejem. DNA centromérico ó telomérico	•Anormalidades numéricas •Segmentos anosómicos terminales
DNA purificado de células	DNA genómico	> 1 Gb	Hibridación genómica comparada (CGH)	•Amplificaciones •Delecciones

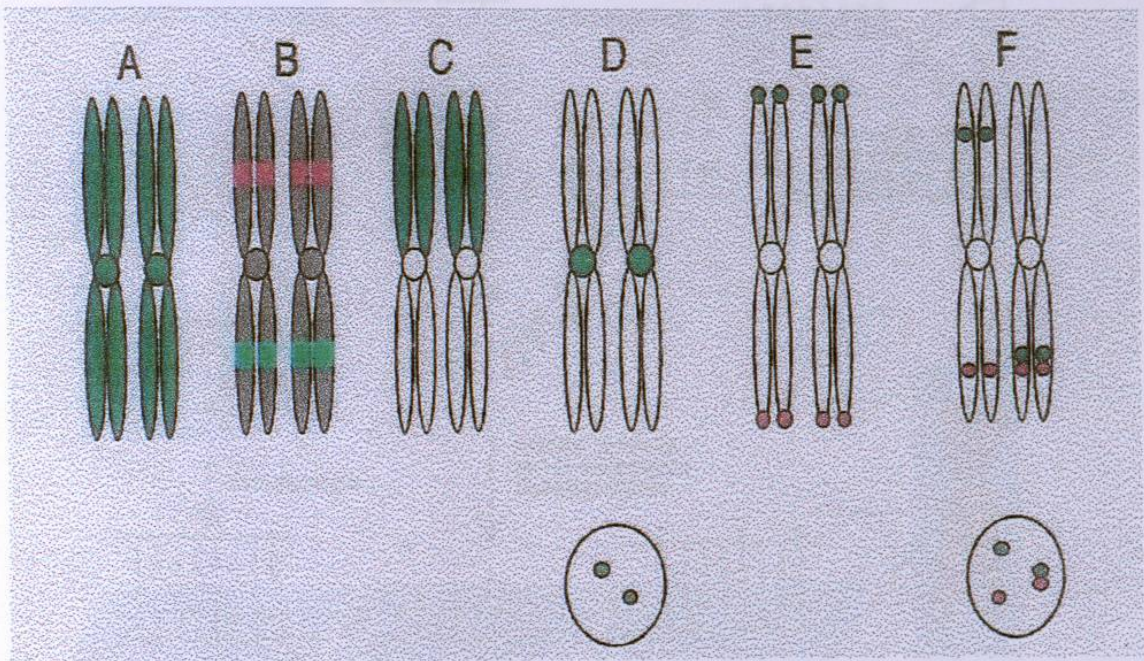


Fig. 2. Ilustración esquemática de varios tipos de sondas usadas en la citogenética molecular de rutina. **A** Sondas que tiñen todo el cromosoma. **B** Sondas usadas en la hibridación genómica comparada (CGH). **C** Sondas que tiñen un brazo específico, ya sea el brazo largo (q) ó el brazo corto (p). **D** Sondas centroméricas. **E** Sondas teloméricas y subteloméricas. **F** Sondas específicas de Locus (segmentos de genes o cromosomas). (13).

La técnica de FISH ha sido aplicada extensivamente con el fin de localizar secuencias específicas sobre preparaciones citológicas. Los niveles de resolución y la sensibilidad de la técnica permite, en la actualidad, la localización no solo de secuencias de ADN repetidas en el genoma sino

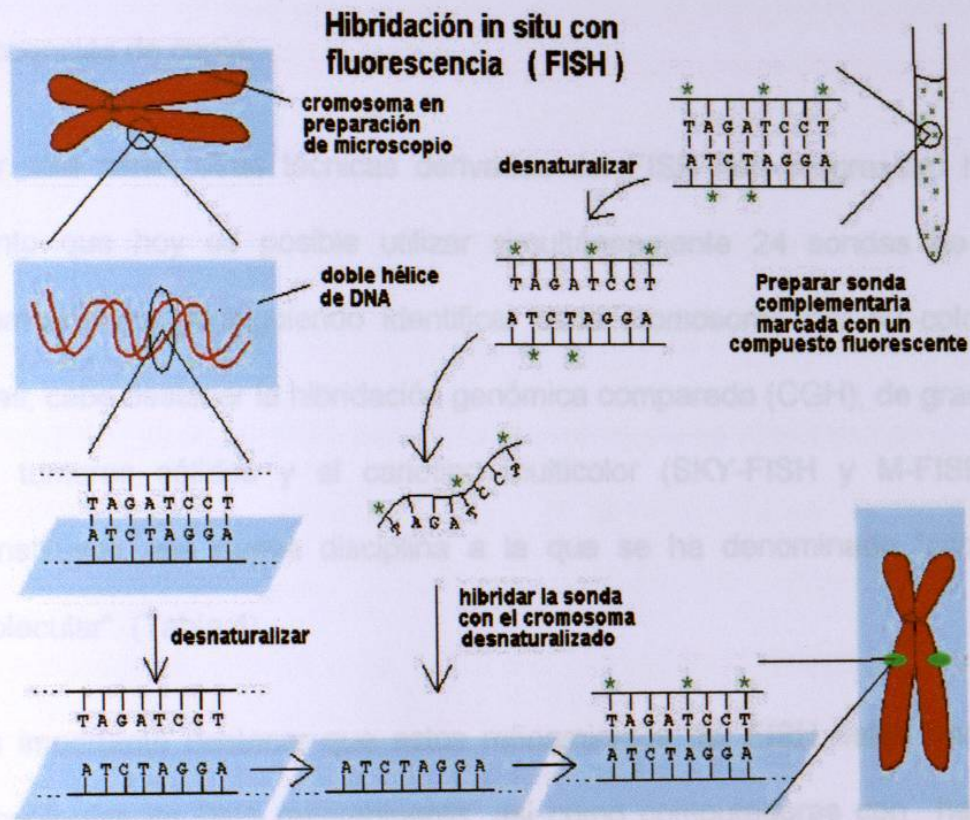


Fig. 3 Representación esquemática de la Hibridación in situ con Fluorescencia. (18).

La técnica de FISH ha sido aplicada extensivamente con el fin de localizar secuencias específicas sobre preparaciones citológicas. Los niveles de resolución y la sensibilidad de la técnica permite, en la actualidad, la localización no solo de secuencias de ADN repetidas en el genoma sino secuencias de copia.

Por otra parte, otras técnicas derivadas del FISH han progresado hasta tal punto que hoy es posible utilizar simultáneamente 24 sondas de pintado cromosómico, consiguiendo identificar cada cromosoma por su color. Entre ellas, cabe destacar la hibridación genómica comparada (CGH), de gran utilidad en tumores sólidos y el cariotipo multicolor (SKY-FISH y M-FISH). Todas constituyen una nueva disciplina a la que se ha denominado "citogenética molecular". (Tabla 4).

Es importante destacar que estos refinamientos del FISH están basados en tecnologías de DNA recombinante, así como computadoras con hardware y software especiales para el análisis y almacenamiento de datos.

Con el desarrollo inicial de las técnicas de FISH, se ha dado la posibilidad de identificar anomalías cromosómicas numéricas y estructurales usando sondas centroméricas específicas o sondas que pintan todo el cromosoma. Los llamados síndromes de microdelección son un importante grupo de desordenes genéticos específicos que se caracterizan por una discreta pero consistente

delección cromosomal, inicialmente fue identificada por métodos de bandeo de alta resolución (técnicas de profase). La técnica de FISH utilizando cósmidos o clones YAC son ideales para la demostración de estos síndromes de microdelección, la primera microdelección diagnosticada por FISH fue la del síndrome de Miller-Dieker (Kuwano et al. 1991).

El desarrollo de sondas específicas de brazos para cromosomas incrementa la posibilidad de identificar anomalías estructurales dentro del cromosoma que con los métodos de bandeo convencional son difíciles de observar.

El diagnóstico citogenético en células en interfase es comúnmente usado para observar muestras prenatales (Kuo et al.1991, Zahed et al.1992) con aberraciones numéricas de los cromosomas 13, 18,21, X y Y. Las microdelecciones (Novelli et al. 1999) son exitosamente diagnosticadas usando citogenética interfásica así como las microduplicaciones (Schaffer et al. 1997). El mosaicismo (Kalousek et al. 1996) es otro desorden en el que la técnica de FISH es útil. En el diagnóstico de implementación genética el FISH interfásico permite la rápida visualización del más común de las aneuploidias (van Hummelen et al. 1996). En oncología la posibilidad de usar FISH interfásico con sondas de translocaciones específicas es de particular interés cuando la calidad de las metafases es pobre. Los tipos de aberraciones cromosómicas que pueden ser diagnosticadas por FISH interfásico son las delecciones de

genes de tumores supresores (retinoblastoma) (Chang et al. 1999), amplificación de oncogenes (N-myc en neuroblastoma) (Hachitanda et al. 1999) y tipos específicos de translocaciones (cromosoma Ph) (Yanagi et al 1999) así como aberraciones numéricas (Worsham et al. 1999). (15).

Cuando se analizan células simples el FISH interfásico ofrece mas ventajas que los métodos de bandeado convencionales, esto es porque se tiene que cultivar las células para obtener metafases.

El FISH interfásico también presenta problemas en términos de visualización detallada del genoma completo, pero si la detección es de regiones específicas este método ofrece muchas ventajas incluyendo la posibilidad de analizar tumores sólidos los cuales tienen bajo índice mitótico. (13).

Translocaciones en genética clínica y oncología que envuelven dos cromosomas y reordenamiento complejos que envuelven tres o más cromosomas, es otra área en la cual 24-color cariotipo es efectiva (Rao et al.1998, Veldman et al. 1997).

En oncología el principal problema de los métodos convencionales de bandeado es la obtención de metafases. Las anomalías cromosómicas especialmente translocaciones, característico en ciertos tumores sólidos y leucemias han sido establecidas por métodos de bandeado y más recientemente en combinación con el FISH.

Estas alteraciones son en muchos casos correlacionadas con translocaciones de genes (Iida et al. 1997) y en otros casos se forman genes nuevos por fusión (Rubin et al. 1988) como es el caso en el cromosoma Ph en la Leucemia Granulocítica Crónica (Nowell y Hungerford 1960).

Otro uso de la técnica de FISH es en la homología cromosómica entre diferentes especies la cual es llamada ZOO-FISH (Solinas-Toldo et al. 1995).

También es importante en el área de oncogenes, factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, moléculas de adhesión, genes resistentes a la quimioterapia y citocinas en enfermedades inflamatorias (Del artículo de McNicol y Farquharson 1997).

Otra área en la que se aplica es en la microbiología ya que la hibridación in situ es una de los más recientes e importantes desarrollos para detectar cuantitativa y localmente microorganismos en diferentes tipos de células (Del artículo de McNicol y Farquharson 1997). (13).

La más poderosa e importante ventaja del FISH es que nos permite la detección de un gene particular o secuencias génicas a nivel subcelular en un modo multi-color.

Diagnosticamente permite la detección de anomalías las cuales no han sido identificadas o por dificultad incluyendo la identificación de anomalías

patológicas de cromosomas en oncología, malformaciones congénitas y desordenes genéticos simples. Esta técnica es usada para complementar a los métodos convencionales de bandeo o para identificar cromosomas en metafase o interfase, también tiene la ventaja de detectar DNA microbial o secuencias de RNA sin la necesidad de la propagación de células o microorganismos. (Tabla 5).

El desarrollo del 24 color cariotipo y la Hibridación genómica comparada (CGH) representa la siguiente generación de técnicas citogenéticas las cuales como en el bandeo cromosómico se puede observar el genoma completo pero con una mayor sensibilidad.

Es importante destacar que esta no es una técnica de búsqueda de nuevas alteraciones cromosómicas, sino que detecta únicamente aquello que buscamos. El resto del genoma permanece oculto, 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 haberlas obtenido, o bien en los casos en los que las alteraciones cromosómicas asociadas a un diagnóstico son crípticas no visibles en el cariotipo. (16). (Tabla 6).

TABLA 4
Comparación de diferentes técnicas de citogenética

	Ventajas	Desventajas	Solución
Bandeo convencional (alta ó baja resolución)	Rastrea todo el genoma	Dificultades en la identificación de pequeños fragmentos de cromosomas (ejem. Marcadores) y reordenamientos complejos especialmente en preparaciones de baja calidad de cromosomas	FISH-color (Todo el cromosoma es pintado, brazos específico pintado y pintado multicolor)
		La obtención de metafases y profases en general requiere del cultivo celular.	FISH de núcleos en interfase CGH
		Resolución limitada ejem. en microdelecciones y otros rearrreglos	Prueba de FISH en Locus específico Prueba de FISH Telomérica
		Las células en metafase ni siempre representan el total de la población celular	FISH de núcleos en interfase
Paintig FISH	Identificación específica de una parte del genoma	Son requeridos algunos conocimientos de la anomalía en cuestion. No es posible para marcaje alrededor del cromosoma.	Multicolor FISH
FISH en interfase	Rápida identificación de aberraciones numéricas en células sin división	Puede no ser usado para rastreo de aberraciones estructurales desconocidas	CGH
CGH	Rastreo del todo el genoma para amplificaciones o deleciones en células no viables	La resolución es 5-10 Mb, el balance estructural de reordenamientos no son identificados	Arrays de ácidos nucleicos ?
Cariotipo 24-color	Rastreo de todo el genoma en células viables	Reordenamientos intersticiales pequeños pueden no ser identificados (amplificaciones etc..)	Arrays de ácidos nucleicos ?

TABLA 5
Múltiples ventajas de la aplicación del FISH

Sensibilidad	En citogenética clínica y oncología la técnica de FISH tiene potencial para detectar deleciones cromosomales crípticas y reordenamientos, los cuales no pueden ser detectados por los métodos de bandeo convencionales. En microbiología es posible detectar la presencia de microorganismos en estado temprano. Pueden detectarse la expresión de RNA en genes endógenos y exógenos.
Especificidad	Escogiendo una prueba o pruebas particulares o métodos relevantes, puede ser identificado material cromosomal de origen desconocido o incierto y para la investigación de la localización cromosomal de fragmentos ó secuencias de DNA específico.
Eficiencia	La técnica de FISH nos permite el rápido rastreo de números grandes de metafases para una o más secuencias blanco. La información específica genética es obtenida para células individuales y puede ser correlacionada con otros tipos de información ya que el FISH puede combinarse con inmunofenotificación de células individuales.
Aplicabilidad	Muchos tejidos y tipos de células no son directamente accesibles por métodos convencionales de citogenética, pero pueden ser examinados por técnicas de FISH en núcleos en interfase. La examinación del resto de las células en interfase puede ser mucho más grande y potencialmente más informativa en la población celular. Sin embargo cuando un nuevo gen o secuencia es clonada está es relativamente más fácil de utilizar como herramienta diagnóstica.
Economía	Debido al concepto básico de simplicidad de la técnica de FISH puede ser ahora relativamente fácilmente establecido en cada laboratorio. Después del establecimiento del equipo el cual es relativamente caro cada análisis es más barato. El desarrollo del análisis de CGH y el cariotipo 24-color ha reducido el tiempo y laboriosidad en situaciones cuando el FISH es usado sin ningún conocimiento de la aberración cromosomal.

TABLA 6
Comparación de la técnica citogenética
convencional con la citogenética interfásica

Citogenética convencional	Citogenética interfásica (FISH)
<ul style="list-style-type: none"> • Requiere células en división • Análisis global de todos los cromosomas • Admite el análisis de pocas células (15-100) • La interpretación precisa experiencia • Bajo costo económico • No permite establecer a qué célula pertenece el cariotipo analizado 	<ul style="list-style-type: none"> • No requiere células en división • Permite analizar gran número de células • Análisis rápido y sencillo • Permite conocer el tipo de célula analizada • Permite conocer la frecuencia real de células con la alteración cromosómica frente a la población celular total • Análisis puntual de la alteración que detecta la sonda • Elevado costo económico • La detección de pérdidas cromosómicas es conflictiva, ya que siempre se observan células sin señal de hibridación * • Detección de falsas señales de hibridación (background)

* Pueden observarse falsas monosomias

IV. JUSTIFICACIÓN

La Leucemia Granulocítica Crónica es un desorden clonal caracterizado por la mieloproliferación neoplásica de las células madres pluripotenciales. Alrededor del 90 % de los pacientes presentan el cromosoma Philadelphia (Ph) que es una translocación entre los cromosomas 9 y 22. Cerca del 5 % de los pacientes con la típica LGC pueden presentar variaciones del cromosoma Philadelphia original, esto es, translocaciones involucrando a otros cromosomas.

El análisis citogenético de las células tumorales ha revelado la presencia de más de 30.000 alteraciones cromosómicas clónales en neoplasias humanas. Hoy sabemos que la presencia de determinadas alteraciones cromosómicas aporta información importante con valor diagnóstico y pronóstico en neoplasias hematológicas y tumores sólidos. (16).

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 neoplásicas.

Por lo tanto, la implementación de la técnica de FISH en este Laboratorio es de suma importancia ya que su uso será de carácter clínico, además permitirá al médico hacer un seguimiento de la evolución de la enfermedad (LGC) y valorar la respuesta al tratamiento, así como la reducción de los costos y la rapidez de los resultados.

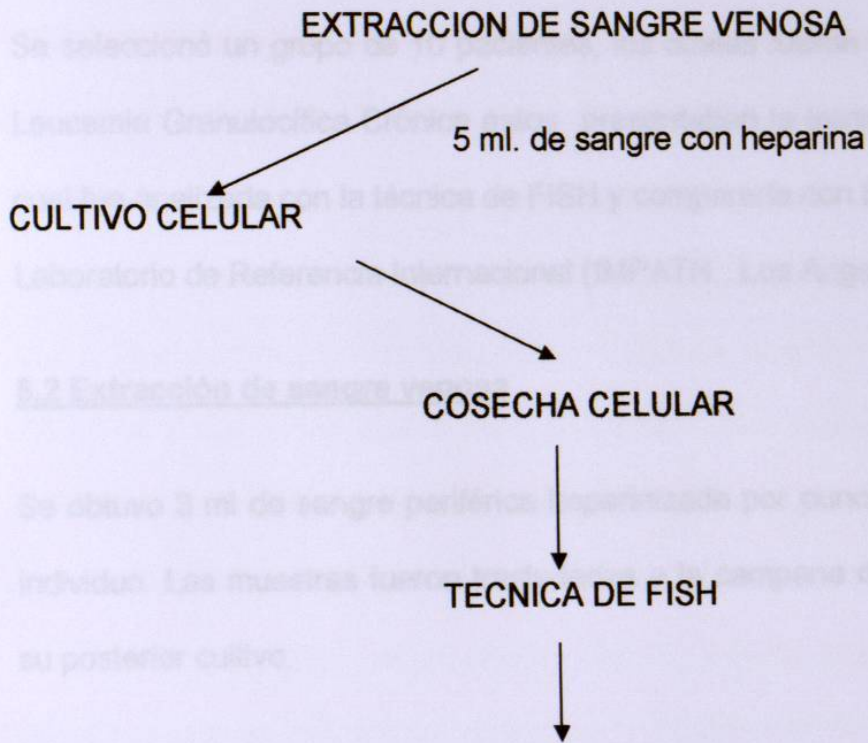
V. HIPOTESIS

Es posible la implementación de la técnica de Hibridación In Situ con Fluorescencia en un Laboratorio Clínico de Hematología de Referencia.

VI. OBJETIVO

El presente trabajo esta enfocado en la implementación de la técnica de Hibridación "in situ" con Fluorescencia (FISH) en el Laboratorio Clínico en pacientes con Leucemia Granulocítica Crónica, los cuales presentan el cromosoma Philadelphia (Ph) y su comparación con un Laboratorio de Referencia Internacional.

VII. ESTRATEGIA GENERAL



OBSERVACION AL MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA

VIII. MATERIAL Y METODOS

8.1 Criterios de Selección de Individuos

Se seleccionó un grupo de 10 pacientes, los cuales fueron diagnosticados con Leucemia Granulocítica Crónica estos presentaban la translocación bcr/abl, la cual fue analizada con la técnica de FISH y comparada con los resultados de un Laboratorio de Referencia Internacional (IMPATH., Los Angeles C.A., USA).

8.2 Extracción de sangre venosa

Se obtuvo 3 ml de sangre periférica heparinizada por punción venosa de cada individuo. Las muestras fueron trasladadas a la campana de flujo laminar para su posterior cultivo.

8.3 Cultivo Celular

Se transfirieron 10 gotas de sangre periférica en frascos de cultivo con 5 ml de medio RPMI 1640 (GIBCO, 27016-021 Life Technologies, Long Island, New York, USA) por duplicado, en campana de flujo laminar agregando 100 µl de Fitoheماغlutinina (GIBCO cat. 10576-015 Life Technologies, Long Island, New York, USA), se mezcló cuidadosamente y se colocó en una incubadora con 5 % de CO₂ a 37 °C (VWR mod. 2310 serie 0601403, Sheldon manufacturing INC, Cornelius OR, USA) durante 24 Hrs.

8.4 Cosecha Celular

Después de la incubación, se transfirió la muestra de los cultivos a tubos cónicos de 15 ml y se añadieron 100 µl de bromuro de etidio (Invitrogen, 15585-011, Carlsbad CA, USA) diluido a 50 µg/ml incubándose 1 hora a 37 °C y 5 % CO₂, transcurrido este tiempo se añadieron 100 µl de colchicina (10 µg/ml,) (Gibco, 15210-040 Life Technologies, Long Island) a cada cultivo, mezclándolos cuidadosamente posteriormente se incubaron 25 minutos a 37 °C y 5 % CO₂, transcurrido este tiempo se centrifugaron las muestras por 10 minutos a 1000 rpm a T° ambiente y se descartó el sobrenadante, posteriormente se añadieron 10 ml de solución hipotónica (KCL 0.075 M) (Esta solución se preparó con 0.280g de KCL aforando a 50 ml. con agua desionizada) precalentada a 37 °C, se mezclaron se incubaron 25 minutos a 37 °C y 5 % de CO₂ , al terminar la incubación se añadió 1ml de mezcla metanol / ácido acético glacial (3:1) fría (Está solución se preparó mezclando 37.5 ml de metanol y 12.5 ml de ácido acético) se mezcló y se centrifugó 10 minutos a 1000 rpm a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y se añadió por goteo 10 ml de metanol / ácido acético (3:1) frío y se incubó 20 minutos a Temp. ambiente, al terminar el tiempo se centrifugó 10 minutos a 1000 rpm a Temp. ambiente, se descartó el sobrenadante y se les añadió nuevamente 5 ml de metanol / ácido acético (3:1) frío, se mezclaron, centrifugaron y se repitió este paso dos veces más, al final se resuspendieron las células con 3 ml mezcla de metanol / ácido acético (3:1)

8.5 Preparación de Extensiones

Se tomó una pequeña muestra de la suspensión celular con pipeta pasteur. De una altura aproximada de 10 a 15 cm. se colocaron de 3 a 4 gotas en la laminilla, dejando secar por completo aproximadamente 20 minutos y realizándose por duplicado.

8.6 Técnica de FISH

Se marcó las áreas de hibridación de las laminillas con lápiz punta de diamante, posteriormente se colocaron en un vaso de coplin con solución 2 x SSC (esta solución fue preparada con 13.2 g de 20 X SSC (Vysis Inc, 32-804850, Downers Grove IL, USA) y aforando a 500 ml de agua desionizada) precalentada a 37 ° C por espacio de 5 minutos, pasado el tiempo se deshidrataron las laminillas colocándolas en vasos de coplin que contenían solución de alcohol etílico al 70, 85 y 100 % respectivamente por espacio de 2 minutos en cada una de ellas, después de está deshidratación, se dejaron secar por completo por espacio de 20 minutos.

8.6.1 Preparación de la Sonda

Se colocó en tubo eppendorf 14 µl de LSI/WCP buffer de hibridación (Vysis 31-0191009 Downers, Grove IL, USA), 2 µl de la sonda LSI BCR/ABL (ES) (Vysis 31-0191009 Downers, Grove IL, USA) y 4 µl de H₂O destilada cada uno de

ellos previamente agitados en vortex y centrifugados (Tanto la sonda como toda la preparación se mantuvieron siempre en un bloque de hielo y en la oscuridad), la mezcla se agitó en vortex y se centrifugó de 15 a 30 segundos para evitar dejar resto de las soluciones en las paredes del tubo, posteriormente se aplicaron 10 μ l de la mezcla de la sonda en cada laminilla en la oscuridad y se colocó un cubreobjetos evitando la formación de burbujas, para después sellarse con pegamento (cemento iris).

8.6.2 Hibridación

Se colocaron las laminillas en el Hibridizador automático (HYBRITE, Source Scientific, Graden, Grove IL, USA) al cual se le estableció un programa que lleva a cabo la desnaturalización de la muestra y la sonda LSI BCR/ABL (ES) (Vysis 31-0191009 Downers, Grove IL, USA) a 73° C por espacio de 2 minutos y la hibridación de las mismas a 37°C durante 22 hrs.

8.6.3 Lavado de las Laminillas

Después de la hibridación se colocaron las laminillas en solución de lavado (2 X SSC) despegando con cuidado el cubreobjetos, posteriormente se sumergieron en solución de 0.4 X SSC/0.3 NP 40 (Se preparó mezclando 120 μ l de NP 40 (Vysis 31-0191009 Downers, Grove IL, USA), 8 ml de solución 2 X SSC y 32 ml de H₂O destilada) colocándolas en un baño de agua a 73 ° C durante 2 minutos, posteriormente se colocaron en solución 2 X SSC/0.1 % NP

40 a temperatura ambiente (Está solución fue preparada mezclando 15 μ l de NP40 (Vysis 31-0191009 Downers, Grove IL, USA) y 10 ml de solución 2 X SSC) sumergiéndolas 10 veces y dejándolas 1 minuto en la misma solución, con el fin de eliminar los restos celulares y se dejaron secar completamente en la oscuridad.

8.7 Aplicación de la Solución de Contraste

Se colocaron 10 μ l de DAPI (Vysis 32-804831 Downers, Grove IL, USA) a las laminillas en la oscuridad, colocándoles un cubreobjetos evitando la formación de burbujas sellándolas con pegamento (cemento iris) y dejándolas secar, posteriormente se observaron al microscopio de fluorescencia.

8.8 Observación al Microscopio de Fluorescencia

Se observaron las laminillas al microscopio de fluorescencia (LEICA Corp. Mod. DMLS2/LB2) con objetivo 100 X, con filtros DAPI, VERDE y ORANGE (Cy3) contando 200 núcleos en interfase, y cuantificando los que presentaban la fusión de los genes *bcr/abl* (*bcr* señal verde, *abl* señal roja la cual se observa de color amarilla por la mezcla de ambos colores) o bien la unión de ambas señales y los que no presentaban dicha fusión ó unión.

8.9 Obtención de los resultados

Para la obtención de resultados se utilizó un regla de 3 simple para obtener el % de núcleos positivos para la translocación bcr/abl el cual fue comparado con los resultados del Laboratorio de Referencia Internacional (IMPATH, Los Angeles CA, USA).

IX. RESULTADOS

El grupo de pacientes estudiados estuvo conformado en un 70 % por hombres y un 30 % por mujeres. La mediana de edad fue de 36 años con un rango de edad entre los 19-53 años. Todos los pacientes se encontraban en la fase crónica de la L.G.C. y todos estaban en tratamiento con Imatinib (Glivec).

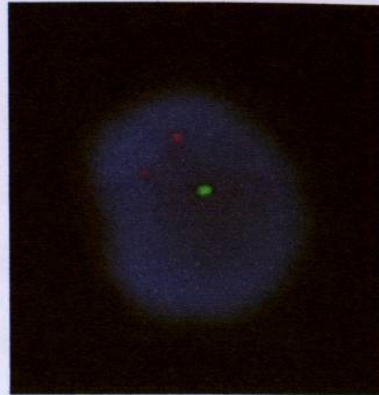
Se realizó la técnica de Hibridación In Situ con Fluorescencia en las muestras de sangre periférica de cada uno de ellos y se observó que en los resultados del primer paciente hubo una diferencia significativa de porcentaje de núcleos positivos. (Fig. 4).

Sin embargo, en los demás pacientes hubo una moderada diferencia en los resultados, excepto en los pacientes 8 y 10 en los cuales se obtuvo una considerable similitud a lo reportado por el Laboratorio de Referencia Internacional IMPATH. (Datos mostrados en la tabla 7).

Se aplicó la función estadística de mediana a los resultados obtenidos tanto del Laboratorio de Referencia como en los nuestros, obteniéndose una concordancia del 62%.

Tabla 7. Comparación de resultados obtenidos en el Laboratorio de Hematología y el Laboratorio de Referencia Internacional IMPATH.

	Laboratorio de Hematología % núcleos positivos	Laboratorio de Referencia Internacional IMPATH % núcleos	Concordancia con IMPATH %
Paciente 1	37	84	44
Paciente 2	35	54	64
Paciente 3	58	73	79
Paciente 4	60	82	73
Paciente 5	58	83	69
Paciente 6	47	63	74
Paciente 7	25	37	67
Paciente 8	1.5	1.6	93
Paciente 9	55	87	64
Paciente 10	0.0	0.0	100
Mediana	42	68	71
Rango	(0-60)	(0-87)	(44-100)



bcr/abl Negativo



bcr/abl Positivo

Fig. 4 Núcleos en interfase en la imagen superior se observan las señales verde (gen bcr) y roja (gen abl) negativa para la translocación y en la imagen inferior se observa la fusión de ambos genes en color amarillo producto de la combinación de ambos colores, positivo para la translocación bcr/abl.

X. DISCUSION

Actualmente muchas investigaciones han sido dirigidas al estudio de la translocación bcr/abl en pacientes con Leucemia Granulocítica Crónica utilizando la técnica de Hibridación In Situ con Fluorescencia donde parece ser una gran herramienta para complementar los estudios citogenéticos convencionales de bandeó G, especialmente en el reconocimiento de esta translocación usando sondas centroméricas.

La Hibridación in situ era anteriormente usada solo en el área de investigación, sin embargo, ahora esta siendo aplicada con mayor frecuencia en los laboratorios de referencia en hematología, en donde aporta datos de gran valor en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con neoplasias hematológicas.

Pocos estudios se han realizado para llevar a cabo la estandarización de la técnica de FISH. En agosto del 2001 la Sociedad Británica de Genética Clínica llevo a cabo una encuesta entre 27 laboratorios de Gran Bretaña, los cuales realizaban la técnica de FISH, notando grandes diferencias en cuanto a su aplicación, los tipos de pruebas usadas (sondas de fusión simple, de doble fusión y de señal extra), el número de núcleos interfásicos contados (50-200), controles (desde el que era realizado simultáneamente con la prueba hasta el que lo procesaba independientemente) con lo cual, se concluyó que había una

considerable variación entre los laboratorios estudiados para realizar la técnica y su aplicación en el diagnóstico y monitoreo de pacientes con LGC (19). Por otra parte en Alemania se realizó en el año 2002 una reunión en la cual se discutieron los problemas en las aplicaciones de rutina de esta técnica, tratando temas como la estandarización para la cual se requerirá la obtención de una imagen digital apropiada del análisis, adaptando procedimientos automatizados para incrementar el contraste y eficiencia del FISH. (20). Ya que la técnica aún no ha sido estandarizada, es necesario obtener nuestros propios criterios de estandarización y los valores de referencia, llevando a cabo un estudio de un mínimo de 30 pacientes adicionales, entre los cuales se incluyan donadores sanos y pacientes diagnosticados con LGC y que estén en tratamiento para evaluar no solo la realización del procedimiento, sino obtener el rango de resultados falsos positivos y negativos, comparando lecturas de diferentes analistas y estableciendo el número mínimo de núcleos interfásicos requeridos para establecer resultados clínicamente confiables. (21,22).

El uso de la técnica de FISH ha permitido en nuestro caso, discernir que su implementación en un Laboratorio de Hematología Clínica de rutina es posible. Este trabajo se diseñó específicamente para la comparación de nuestros resultados con los reportados por el Laboratorio de Referencia para la obtención del porcentaje de concordancia, ya que los pacientes estudiados habían sido previamente diagnosticados con LGC y habían recibido tratamiento con Glivec. (Tabla 8).

Estos pacientes presentaban la translocación bcr/abl según los resultados reportados por el Laboratorio de Referencia unos meses antes de la realización de este trabajo, lo que se aprovechó para posteriormente iniciar la estandarización de esta técnica y establecer los valores de referencia en nuestro Laboratorio.

Al tener lugar la translocación bcr/abl y formarse las proteínas 120 y 190, las cuales aumentan la actividad de la enzima tirosina cinasa, encargada de la regulación de la proliferación y apoptosis celular, los pacientes sometidos a tratamiento con Glivec, se espera disminuyan la expresión de esta aberración cromosómica y con esto también disminuyan los resultados positivos para la translocación, ya que el Glivec es un derivado de la 2-fenilaminopirimidina, antagonista con actividad contra tirosina cinasas, que actúa bloqueando el sitio de unión de ATP en la cinasa Abl, evitando la transducción de las señales de energía, necesarias para la proliferación y apoptosis celular inducidas por Abl.

La limitación principal de esta técnica es la interpretación, ya que en el análisis de estas alteraciones cromosómicas se puede correr el riesgo de no reconocerlas, especialmente cuando se genera una sobre posición de las señales fluorescentes.

La técnica de FISH tiene numerosas aplicaciones en la observación de alteraciones cromosómicas en oncología, hematología, microbiología, veterinaria etc.

La más poderosa ventaja es que esta técnica nos permite detectar estas alteraciones y se puede realizar en núcleos en interfase y también permite el análisis puntual de la alteración bcr-abl, lo cual en la citogenética convencional con bandeo G no es posible ya que en esta se necesitan células en metafase, difíciles de obtener, sin permitir establecer a que célula pertenece el cariotipo analizado. La técnica de PCR por su parte amplifica la secuencia génica de interés lo que la hace ser más sensible que la técnica de FISH, pero su proceso requiere más tiempo y es considerablemente más costosa.

Tabla 8

Biometría Hemática de los pacientes al momento del estudio					
PACIENTE	LEUCOCITOS	NEUTROFILOS	BASOFILOS	HEMOGLOBINA	PLAQUETAS
	(K/uL)	%	%	g/dl	K/uL
1	5.69	69.8	1.98	14.8	221
2	3.07	53.3	1.49	14.3	105
3	5.13	61.0	1.12	15.2	149
4	6.39	70.5	1.36	15.2	164
5	4.60	57.1	1.23	13.5	110
6	4.71	74.6	1.13	11.6	158
7	2.41	43.8	1.26	11.9	129
8	5.29	72.7	1.00	15.6	161
9	11.9	81.8	2.61	13.2	41.7
10	8.80	52.3	1.30	18.1	252
MEDIA	5.27	62.6	1.38	14.20	135.9

XI. CONCLUSIONES

1.- La técnica de Hibridación In Situ con Fluorescencia fué realizada satisfactoriamente, ya que en las muestras de todos los pacientes se pudieron observar las señales fluorescentes de las sondas marcadas dirigidas a los genes BCR/ABL y su fusión lo cual indicó la presencia de la translocación, y por lo tanto su correcta realización.

2.- El porcentaje de concordancia obtenido fue satisfactorio cuando se compararon los resultados de este laboratorio con los reportados por el Laboratorio de Referencia Internacional.

3.- Se requiere más experiencia para poder lograr obtener cromosomas metafísicos lo cual no es fácil inclusive cuando se realizan los cariotipos convencionales en el laboratorio de genética, su obtención facilitaría enormemente la interpretación de las muestras.

4.- Es necesaria más experiencia en la interpretación de las muestras, en este caso con núcleos interfásicos ya que las señales fluorescentes pueden sobreponerse y con ello correr el riesgo de dar un resultado falsamente negativo.

5. Es indispensable estandarizar la metodología y obtener los valores de referencia para este Laboratorio.

6.- La implementación de la técnica de FISH en el Laboratorio de Hematología Clínica permitirá a nuestros pacientes obtener beneficios ya que el costo del estudio disminuiría considerablemente y los resultados se obtendrían más rápidamente.

7.- La realización de la técnica de FISH en este laboratorio permitirá obtener un diagnóstico correcto y un seguimiento adecuado y oportuno de la evolución de la enfermedad, así como la evaluación de la eficacia del tratamiento.

XII. BIBLIOGRAFIA

1. **Sabrafen**, S.J. Hematología Clínica. Síndromes mieloproliferativos (II). Ed. Harcout, 4ª. Edición, 2001: 319-329
2. **Beutler**, E., Lichtman, M.A. Williams Hematology. Mc. Graw-Hill, USA, 2001
3. **Beiguelman**, Bernardo. Citogenética humana, 1982.
4. **Wiley**, John, Cáncer Genetics. Current Protocols in Human Genetics, 2003. 10.2.1-10.2.12
5. **Whang-Peng**, J. & Knutsen T. Chromosome abnormalities. In: Chronic Granulocytic Leukemia, Praeger, New, York, 1982.
6. **Genomik**, lab. Detección del gen bcr/abl, 2003
7. **Bennett**, J.H. 1845. Case of hypertrophy of spleen and liver in which death took place from suppuration of the blood. Edinburgh Medical and Surgical Journal, **64**, 413-423.
8. **Geary**, C.G. 2000. The Story of Chronic Myeloid Leukemia, British Journal of Hematology, **110**, 2-11.

9. **Nowell, P. & Hungerford, D.A.** 1960. A minute chromosome in human granulocytic Leukemia. *Science*, **132**, 1497.
10. **Padua, R.A.** 1992. *Molecular Genetics of Leukemia*. Leukemia, p.123-139, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
11. **Mills, K.I., Mackenzie, E.D., Birnie, G.D.** 1988. The site of the breakpoint within the bcr is a prognostic factor in Philadelphia-positive CML patients. *Blood*. **72**, 1237-1241.
12. **Mc Donald, Dave**, Hibridación in situ Fluorescente, 2002.
13. **Rautenstrauss, W. Bernd, Liehr, Thomas.** *Fish Technology*, Springer-Verlag, Germany, 2002.
14. **Barch, Margaret, Knusten, Turid, Spurbeck, Jack.** *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*, Lippincott-Raven, 1997.
15. **Poddighe, P.J. et al.** 1991 Interphase Cytogenetics of Hematological Cancer. Comparison of classical karyotyping and in situ hybridization using a panel of eleven chromosome specific DNA probes. *Cáncer Res*, **51**, 1959-1967.
16. **Calasanz, M.J.** Revisión de técnicas de citogenética convencional y molecular y su implicación en el diagnóstico y pronóstico del cáncer, España.
17. **Whang-Peng, J. & Knutsen T.** Chromosome abnormalities. In: *Chronic Granulocytic Leukemia*, Praeger, New, York, 1982.

18. **Dinulos**, Mary Beth. Citogenética Clínica, 1997.
19. **Drummond**, Mark W, 2002. BCR-ABL FISH monitoring of CML: A survey of current UK practice, British Journal of Haematology **119**:268-288.
20. **Hausmann**, Michael. 2003. Standarization of FISH-procedures: Summary of the first discussion workshop, Analytical Cellular Pathology, **25**, 201-205.
21. **Chase**, A. 1997 Factors influencing the false positive and negative rates of BCR-ABL fluorescence in situ hybridization, Genes Chromosomes Cancer. **18** (4):246-253.
22. **Kowalczyk**, JR. 2003. Fluorescence in situ hybridization BCR-ABL fusion signal rate interphase nuclei of healthy volunteer donors: a test study for establishing false positive rate. Cancer Genet Cytogenet. **1:142(1)**:51-55



