LA HIBRIDIZACION CROMOGENICA IN SITU (CISH) EN EL DIAGNOSTICO ONCOLÓGICO

Lerda D,* Biagi Bistoni M*, Pelliccioni P*, Braxs C*, Bella S*, Guidi, A**, Armando L**, Theaux R**, Gomez S**, Sambuelli R**.

* Laboratorio de Genética – Facultad de Medicina – Universidad Católica de Córdoba
** Anatomía Patológica – Facultad de Medicina – Universidad Católica de Córdoba
Jacinto ríos 571 – Bº General Paz – 5000 Córdoba - Argentina

Palabras Claves: Cromosomas, hibridización Cromogénica in situ, biología molecular, cáncer, diagnostico oncológico,

Resumen

Desde los hallazgos de la correlación en la patogénesis de enfermedades y las alteraciones genómicas, las técnicas citogenéticas moleculares ocupan un lugar en la medicina molecular. Estas técnicas son utilizadas en la detección de anormalidades genéticas que son las desencadenantes del desarrollo de daños genéticos y cáncer.

La importancia de esta técnica de biología molecular - CISH - radica en que puede ser una herramienta útil para el diagnostico tumoral de varias patologías.

Proponemos el uso de CISH para la detección de aberraciones cromosómicas como método consistente, barato y de confianza en la detección de distintos tumores. Los resultados del CISH se pueden visualizar claramente con un microscopio estándar, las señales son permanentes y los resultados se pueden almacenar por un período largo, creando un expediente permanente de la prueba. La ventaja importante del CISH es que la detección de aberraciones genéticas así como la verificación de la histopatología se puede hacer simultáneamente.

Palabras Claves: Cromosomas, biología molecular, hibridización cromogénica in situ, cáncer, diagnostico oncológico,

1. Introducción

Los componentes moleculares que manejan el comportamiento normal y patológico de las células se fueron conociendo cada vez mas con el tiempo, y esto hizo que se modificara la comprensión de la patogenia de las enfermedades. En distintos ámbitos de estudio, la genética molecular ha provocado un nuevo desplazamiento, y la expresión génica modificada, como consecuencia de factores hereditarios o ambientales, se la observa ahora como el punto de partida de muchas enfermedades. El salto fue grande, para explicar el origen de las patologías del ser humano, desde las células y los tejidos hacia las moléculas que regulan su comportamiento.

Los conocimientos de la medicina molecular se pueden aplicar tanto como para la génesis de las enfermedades neoplásicas, como también para el diseño de estrategias diagnósticas, preventivas e, incluso terapéuticas. La proyección de la biología molecular apunta fundamentalmente al diagnóstico y la prevención de las enfermedades, como herramienta de la medicina. No obstante, es un arma muy útil en el momento de entender como una célula tumoral reescribe completamente su programa de crecimiento.

El diagnostico definitivo de cáncer depende de la observación de una masa de células con morfología característica. No obstante, los signos morfológicos empleados para su identificación y diagnóstico son la consecuencia de cambios genéticos específicos y estables, acumulados en una población de células.

En general, las neoplasias tienen un origen clonal y los cambios genéticos pueden depender de factores ambientales o de alteraciones intrínsecas heredadas y estos cambios ayudan a una inestabilidad de todo el genoma.

Desde los hallazgos de la correlación en la patogénesis de enfermedades y las alteraciones genómicas, las técnicas citogenéticas moleculares ocupan un lugar en la medicina molecular. Estas técnicas son utilizadas en la detección de anormalidades

genéticas que son las desencadenantes del desarrollo de daños genéticos y cáncer.
En 1969, Gall y Pardue introdujeron una técnica conocida como “hibridización *in situ*” (ISH), para localizar ácidos nucleicos en células individuales (1). En esa época, las capacidades de ISH fueron limitadas a secuencias altamente repetitivas utilizando pruebas marcadas radioactivamente, que fueron visualizadas por la autoradiografía.
El uso de radioisótopos tuvo muchas desventajas y fue sustituido en la ADN ISH por métodos de detección no radioactivos. Las moléculas mas comúnmente utilizadas son los haptenos, tales como la biotina y la digoxigenina, que se pueden incorporar fácilmente en la prueba de ADN. Las pruebas luego son detectadas con anticuerpos marcados específicamente o, como en el caso de biotina, con una molécula marcada de avidina. Desde el primer reporte de la hibridización in situ fluorescente (FISH), el principio de FISH es esencialmente igual, con la excepción de que la biotina y la digoxigenina han sido remplazadas por fluorocromo nucleótidos-conjugados.
Desde los años1990 se vienen realizando ISH con métodos de detección cromogénica (3) y la primera publicación aparece en el año 2000 (oncogene HER-2) (4).
En los 3 últimos años, al método CISH se le prestó más atención, debido a que puede evaluar simultáneamente la amplificación génica/deleción, la aneuploidía y translocación cromosómica, con la morfología del tejido en el mismo porta, utilizando un microscopio común (31 – 36). Por lo tanto, una amplia sección del tejido puede ser explorada rápidamente debido al contrateñido con hematoxilina y el detalle morfológico es fácilmente visible utilizando objetivos 10 x, 20 x o 40 x. Distintos estudios han demostrado que el CISH es un método seguro, económico y práctico para evaluar el status del gene HER-2 en muestras archivadas de tumor de mama (32,33, 36-38).
El principal objetivo de los autores de este documento es mostrar los resultados de una técnica de biología molecular, el CISH, que es de utilidad para el diagnóstico oncológico y sobre todo en el pronóstico y tratamiento del paciente.

2.Materiales y métodos

2.1. muestras

En el año 2006 se comenzó analizando tumores de mama y tejido blando. A fines del año 2007 se comenzó con cerebro y colon en el Laboratorio de Anatomía Patológica y Genética de la Facultad de Medicina de la Universidad Católica de Córdoba. Los mismos fijados en formol, embebidos en parafina (FFPE) y utilizando trozos de 4 – 5 mm para realizar la hibridización cromogénica *in situ* (CISH)

2.2. hibridización cromogénica in situ

La hibridización cromogénica in situ se realiza de acuerdo a la técnica provista por el fabricante, sobre cortes titulares (4 – 5 um de espesor) fijados en formalina e infiltrados en parafina (FFPE). Estos cortes tisulares se desparafinan en xileno, alcohol, agua destilada y luego se calientan a 98º C durante 15´ con solución de pretratamiento para calor. A continuación se realiza la digestión enzimática a temperatura ambiente, se deshidratan en una serie graduada de alcoholes, se secan al aire y se le agrega la zonda específica al tejido en estudio, se cubre con cubreobjeto y se desnaturaliza a 94º C . La hibridización se realiza durante toda la noche a 37º C. Se retira el cubreobjetos y se trata el preparado con solución tampón SSC. Luego se realiza la inmunodetección con CAS-block, HRP-estreptovidina, diaminobencidina (DAB) y contrateñido con hematoxilina.

Se examinan los resultados de la hibridización utilizando un microscopio de campo luminoso con objetivo 40 x.

3. Resultados

En los tumores de mama lo que se analizó es la amplificación o sobreexpresión del gen HER2-neu y en la Fig.1 se observa el resultado positivo del gen en células tumorales. La ausencia de amplificación se observa en la Fig.2.

En los tumores de cerebro (oligodendrogliomas) y colon se analizaron la deleción de determinados cromosomas. Para cerebro los cromosomas 1 p36 y 19 q, en colon la deleción del cromosoma 18 q. Las fig.3, 4 y 5 muestran tales señales en las células

tumorales estudiadas. En tumor de tejido blando se estudió la translocación del cromosoma 11 q24. En la Fig.6 se observa la translocación y en la Fig.7 la ausencia de translocación.

4. Discusión

La amplificación génica del HER2-neu es un marcador predictivo de pronóstico adverso y de buena respuesta al tratamiento con Herceptin (Pathol. Int. 51:579-584, 2001). La determinación del estado HER-2 es necesaria en la selección de los pacientes con cáncer de mama para la terapia del trastuzumab (Herceptin®). Trastuzmab es eficaz solamente en los pacientes con tumores que demuestran el gene amplificado HER-2 y/o sobreexpreasada la proteína HER-2. La sobreexpresión de la proteína HER-2 en la membrana de la célula, se estudia por inmunohistoquímica (IHC). Sin embargo, la IHC está sujeta a un número de artefactos y de diferencias técnicas en la sensibilidad de diversos anticuerpos y los tratamientos previos del tejido fino. Para identificar exactamente el estado HER-2, se ha desarrollado CISH que utiliza la prueba de la DNA HER-2 producida con Tecnología Sonda de Sustracción (SPT®). Con la tecnología SPT, las secuencias repetitivas (Alu y elementos Line), encontrados en ácidos nucleicos humanos y que causan hibridación no específica, se eliminan cuantitativamente. Por lo tanto, la prueba final es muy específica y la hibridación no específico es bloqueada con la DNA Cot-1 y en la prueba tradicional de FISH se elimina. La prueba HER-2 con tecnología SPT da suficientemente señales con microscopia común después del tratamiento enzimático.

La pérdida combinada de la región 1 p36 y 19 q es un marcador diagnóstico de oligodendroglioma. Además, es marcador predictivo de pronóstico favorable y de buena respuesta a la quimioterapia (Oncogene 18:4144 – 4152, 1999). La pérdida alélica del cromosoma 1p se ha observado en el 70 – 80 % de los oligodendrogliomas y en el 20 – 30 % de los astrocitomas(Barbashina V et al. Clin Cancer Res 11:1119-1128, 2005). El 96,6 % de pacientes con oligodendrogliomas quienes muestran

pérdida del cromosoma 1 p también a menudo tienen una pérdida del cromosoma 19 q (Gelpi E et al. Mod Pathol 16:708-715, 2003). La mayoría de los pacientes demostrando la pérdida de ambos 1p y 19 q tienen mucho mejor pronóstico después de recibir quimioterapia con procarbazina, lomustina, vincristina (PCV) y radioterapia, con un porcentaje en tiempo de sobrevida de más de 12 años (Ino Y et al, Clin Cancer Res 7:839-845, 2001). En cambio aquellos pacientes sin la deleción de los cromosomas 1 p y 19 q tienen un pronóstico desfavorable, raramente responden a la quimioterapia y tienen un porcentaje de sobrevida aproximadamente de 1 año y medio (Ino Y et al, Clin Cancer Res 7:839-845, 2001). La pérdida de 1p /19 q se reporta como un significante estadísticamente predictor de ambas quimiosensibilidad y larga recurrencia de sobrevida. (Hashimoto N et al, Cancer 97(9):2254-2261, 2003). La distinción histológica entre oligodendroglioma y astrocitoma está limitada por la subjetiva diferencia en la morfología celular (Conos S et al Cancer 79(7):1381-1393,1997) y no hay un marcador inmunohistoquímico específico para esta diferenciación y los análisis moleculares se pueden utilizar como una ayuda en la clasificación. La combinación del grado histológico y el análisis molecular puede proveer mas información sobre el pronóstico que con el uso de uno solo (van den Bent M et al, Neuro-oncology 5:128-138,2003). La deleción del cromosoma 19 q ocurre en el 75 % de los oligodendrogliomas, 45 % mezcla de oligoastrocitomas y en el 40 % de los astrocitomas (Smith J et al. Oncogene 18:4144-52, 1999). En estas glial neoplasias, se han encontrado un tramo de comun deleción 19q13.3-13.4, una mínima región de 150 kb (Smith J et al Genomics 64:44-50, 2000). La pérdida de una copia entera del 19 q es mas comúnmente encontrarlo en tumores oligodendroglioma y la deleción parcial de 19 q es más común en astrocitomas (Smith J et al Genes Chromosomes Cancer 29:16-25, 2000). En oligodendrogliomas , la deleción del 19 q está asociado con prolongada sobrevida (Caimcross J et al Natl Cancer Inst. 90:1473-9, 1998), en cambio los astrocitomas con deleción 19 q no es estadísticamente significativo predictor de sobrevida (Smith J et al J.Clin Oncol 18:636-45, 2000).

La pérdida de la región del cromosoma 18 q es un marcador predictivo de pronóstico adverso para el paciente con carcinoma de colon clasificado como T3N0, sugiriendo la inclusión en el tratamiento con quimioterapia (Int. J. Cancer. 79:390 – 395, 1998). La pérdida del cromosoma 18 q es frecuentemente observada en carcinomas colorectal y está asociado con pobre resultado en pacientes con estados II del daño (Vogelstein B et al. N Engl J Med 319:525 – 32, 1988; Shibata D et al. N Engl J Med 335:1727 – 32, 1996.). La pérdida del cromosoma 18 q también está vinculado a pobre sobrevida en cáncer de cabeza y cuello (Takebayashi S et al Cancer Res 60:3397 – 403, 2000; Perlstein R et al Genes Chromosomes Cancer 21:333 – 9, 1998), así como también es una de las mas frecuientes alteraciones citogenéticas observadas en canceres de ovario, cervical, pulmón y esófago (Vogelstein B et al. N Engl J Med 319:525 – 32, 1988; Shibata D et al. N Engl J Med 335:1727 – 32, 1996).

La translocación del cromosoma 22 es característica del sarcoma de Ewing en los tumores de tejidos blandos (New Engl J. Med. 309:496 -497, 1983), sugiriendo el tratamiento con quimioterapia. La translocación del sarcoma de Ewing (EWS) se encuentra en tumores de tejido blando que son tumores Ewing (ET), incluyendo el sarcoma de Ewing de hueso y tejido blando (ES), tumor periferal primitivo neuroectodermal (PNET), así como sarcoma de células claras (CCS), tumor desmoplastico de células redondas grandes, liposarcoma mixoide (MLS) y condrosarcoma mixoide (MCS). El punto de ruptura de la translocación en el gene EWS del cromosoma 22 ocurre en un punto dentro de una región de 2kb y localizado en el intron 7,8 o 10. La pareja de genes participando en la translocación se encuentran en diferentes cromosomas y el punto de ruptura de las parejas de genes se hallan en una región de al menos 40 kb (Zucman J et al. Genes Chromosomes & Cancer 5:271-277, 1992). Se han reportado nueve diferentes pares de genes (2-10).

5. Conclusiones

Esta técnica la comenzamos a utilizar en el año 2006, somos los primeros en Córdoba y uno de los primeros en el país.

El CISH permite detectar la amplificación génica, deleción, translocaciones cromosómicas y el número de cromosomas utilizando la reacción peroxidasa convencional con microscopio común sobre tejidos fijados en formalina e infiltrados en parafina (FFPE). Este método utiliza la tecnología de sondas de sustracción (SPT) (sondas específicas), eliminando así las secuencias repetitivas (por.ej. elementos Alu y LINE) que se encuentran en los ácidos nucleicos humanos y que causan hibridación no específica. En consecuencia, las sondas SPT son inherentemente específicas y no precisan el bloqueo de la secuencia repetitiva, como se requiere para las sondas de ADN citogenéticas tradicionales. La tecnología SPT permite evaluar aberraciones genéticas bajo un microscopio común mediante detección cromogénica.

La esencia del CISH es la capacidad del ácido nucleico marcado, para hibridizar (unir) *in situ* en la muestra, a una sección específica del ácido nucleico complementario. Los resultados de la prueba de hibridización pueden luego ser visualizados dentro del contexto de la morfología del tejido circundante. Por lo tanto, los patólogos pueden ver simultáneamente la morfología del tejido y las aberraciones genéticas.

Los resultados de la coloración de CISH se pueden visualizar claramente con un microscopio común y con lente 40 x o con lente de inmersión 100 x. Como la señal DAB es permanente, los resultados pueden ser guardados por un largo período, creando un registro permanente del test. Con la metodología de inmunodetección del CISH, los resultados de los análisis son seguros y fáciles. La ventaja más importante del CISH es que la detección de las aberraciones genéticas así como la verificación

histopatológica se pueden realizar simultáneamente.

En resumen, la evolución de la biología molecular permitirá un mayor dominio del acto diagnóstico y terapéutico. La intención de este documento es servir de ayuda para allanar el camino que media entre el laboratorio y el médico. La profundización del conocimiento nos permitirá definir estrategias para derrotar esta enfermedad, tan fascinante como atroz.

6. Bibliografía

1. Gall J. and Pardue M. 1969 Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological specimens. PNAS 63:378 – 383.

3. Hopman A., Claessen S. and Speel A. 1997 Multi-colour brighfield in situ hybridization on tissue sections. Histochem. Cell Biol. 108:291 – 298.

4. Tanner M. Gancberg D. Di Leo A. y col. 2000 Chromogenic in situ hybridization (CISH) : a practical new alternative for FISH in detection of HER-2/neu oncogene amplification. Am J. Pathol 157: 1467 - 1472

31. Chu W. Wu R. Fisher S. y col. Detection of the C-Myc oncogene translocation and protein expression in Burkitt and other Non-Burkitt lymphomas. 2003. United States and Canadian Academy of Pathology Annual Meeting, abstr. 1043.

32. Dandachi N. Dietze O. Hauser-Knonberger C. Chromogenic in situ hybridization: A novel Approach to a Practical and Sensitive Method for the Detection of HER 2 Oncogene in Archival Human Breast Carcinoma. Lab Invest 2002, 82:1007 – 1014.

33. Gupta D. Middleton L. Whitaker M. y col. Comparison of fluorescence and chromogenic in situ hybridization for detection of HER-2 neu oncogene in breast cancer. Am. J. Clin Pathol. 2003. 119:381 – 387.

34. Tanner (igual que 4)

35. Wu R. Zhao J. Marquez A. y col. Determination of topoisomerase IIa (Topolla) gene amplification and deletion by chromogenic in situ hybridization (CISH) in archival breast carcinoma. J. Mol Diagn. 2001. 3(S11): 207.

36. Zhao J. Wu R. Au A y col. Determination of HER2 gene amplification by chromogenic in situ hybridization (CISH) in archival breast carcinoma. Mod Pathol. 2002. 15: 657 – 665.

37. Kumamoto H. Sadano H. Takahino T. y col. Chromogenic in situ hybridization analysis of HER2/neu status in breast carcinoma: Application in sceening of patients for trastuzumab (Herceptin) therapy. Pathol International 2001. 51:579 – 584.

38 Stein S. Francis G. Comparison of methodologies for HER-2 testing in patients with breast carcinoma. 2003. American Society of Clinical Oncology (ASCO). Annual Meeting. Abstr. 3586