

BASES TÉCNICAS DEL FISH

Francesc Solé
Servei de Patologia
Laboratori de Citogenètica i Biologia Molecular
Hospital del Mar. Barcelona



C S B Consorci Sanitari de Barcelona



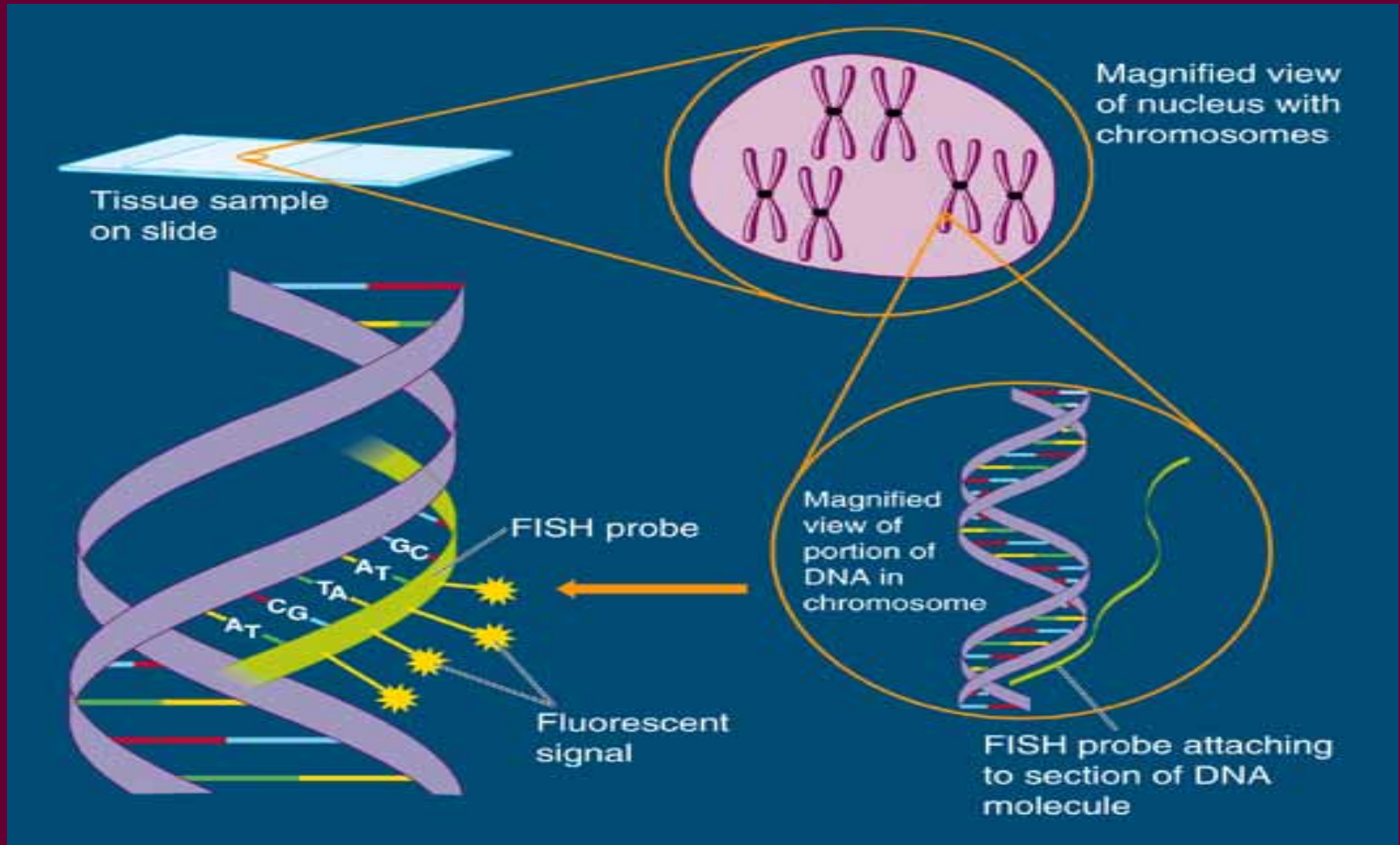
IMAS
Hospital del Mar

www.imasbcn.org

¿Qué es la FISH?



La técnica de FISH permite la detección y localización de secuencias específicas de ADN sobre cromosomas, células o tejidos



MARCAJE Y DETECCIÓN

DNA muestra

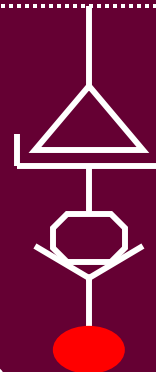
DNA sonda



Biotina

Anti Bio

Anti anti
Bio-FITC



Digoxigenina

Anti Dig

Anti anti Dig- TRITC

Detección por
fluorescencia

FISH

DNA muestra

DNA sonda

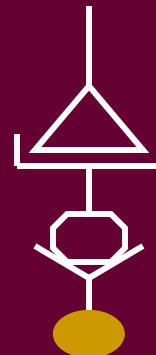


Biotina

Anti Bio

Anti anti

Bio-FAAFA



Digoxigenina

Anti Dig

Anti anti Dig-PAP

Detección
enzimática

CISH

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE LOS LINFOMAS

- Citogenética convencional (cariotipo)
- Hibridación in situ (FISH o CISH)
- Biología molecular: Southern blot y PCR

TÉCNICAS: CG, SB, PCR vs FISH

PARÁMETROS	CG	SB	PCR	FISH
Tejido	fresco	todos	todos	todos
Cantidad	mucho	mucho	poco	poco
Sensibilidad	baja	baja	alta	alta
Falsos +	No	No	Sí	No
Falsos -	Sí	No	Sí	No

CITOGENÉTICA CONVENCIONAL vs FISH

CITOGENÉTICA

- Requiere células en división
- Requiere tejido fresco
- Permite detectar alteraciones de todo el genoma
- Bajo coste económico

FISH

- No requiere células en división
- Permite estudiar material parafinado o congelado
- Solo aporta información de la sonda que se utiliza
- Moderado coste económico

COMPARATIVA: FISH vs PCR

FISH

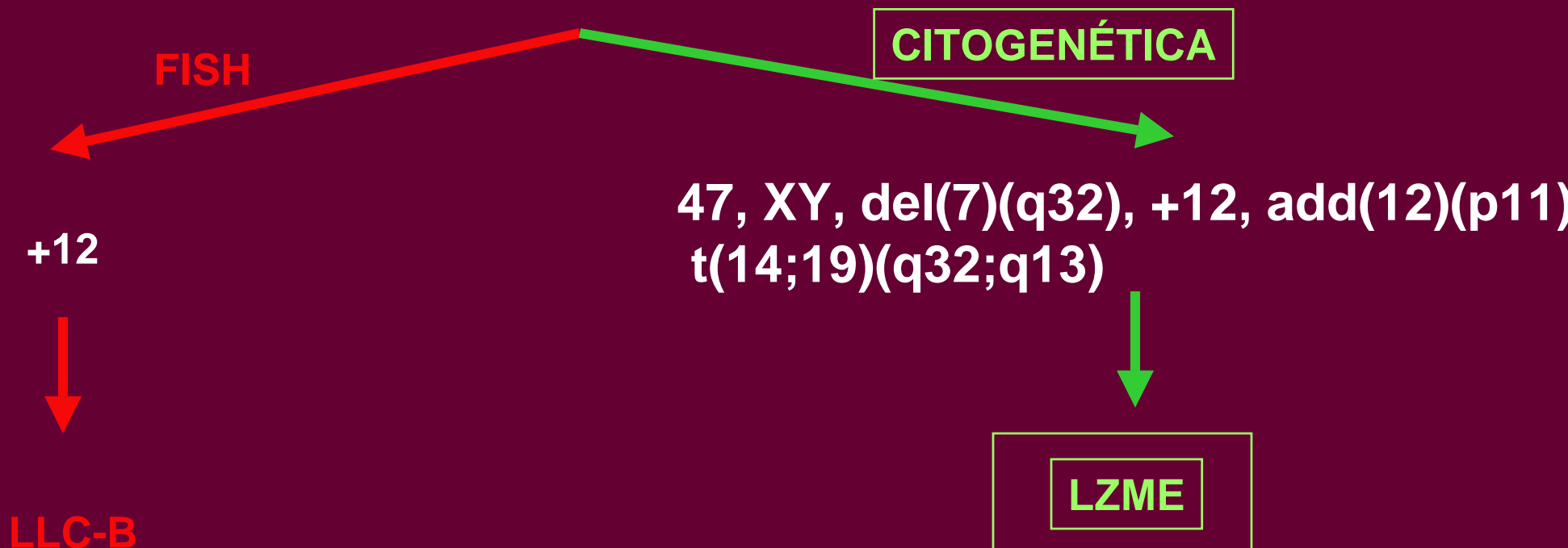
- **Mayor especificidad: menos falsos negativos y menos falsos positivos**
- Requiere un número mínimo de células
- Requiere un microscopio de fluorescencia

PCR

- **Elevada incidencia de falsos negativos: puntos de rotura variables**
- **Elevada sensibilidad: falsos positivos**

CASO PRÁCTICO

- Muestra referida para estudio de FISH
- Orientación diagnóstica: LLC-B
- Petición FISH: ATM, CEN12, RB, P53

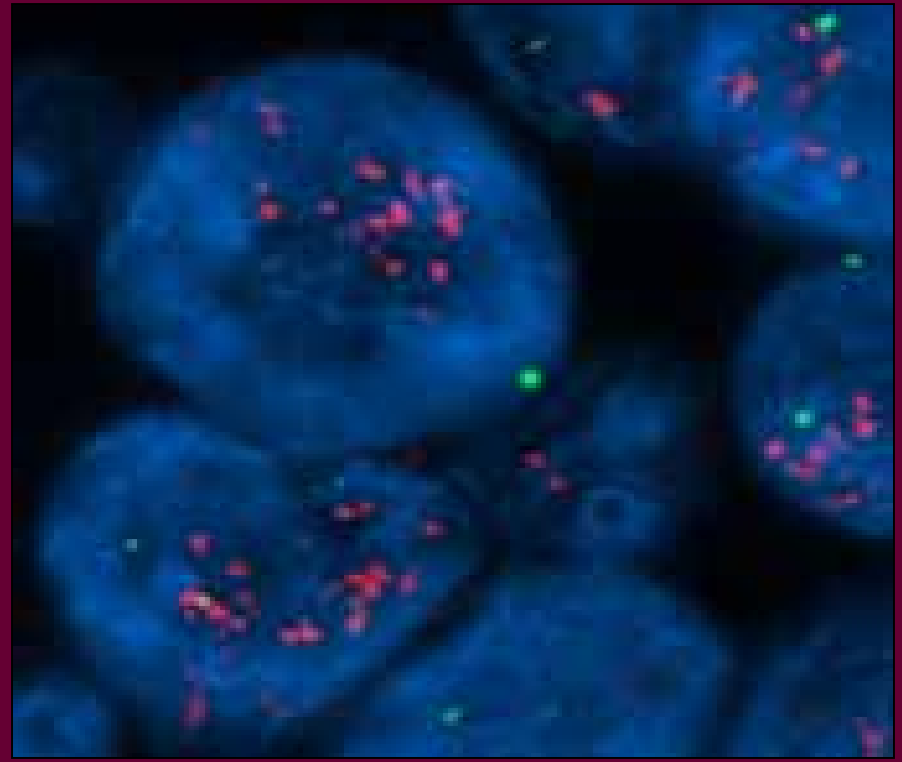


¿CISH o FISH?

CISH



FISH



COMPARATIVA: CISH vs FISH

CISH

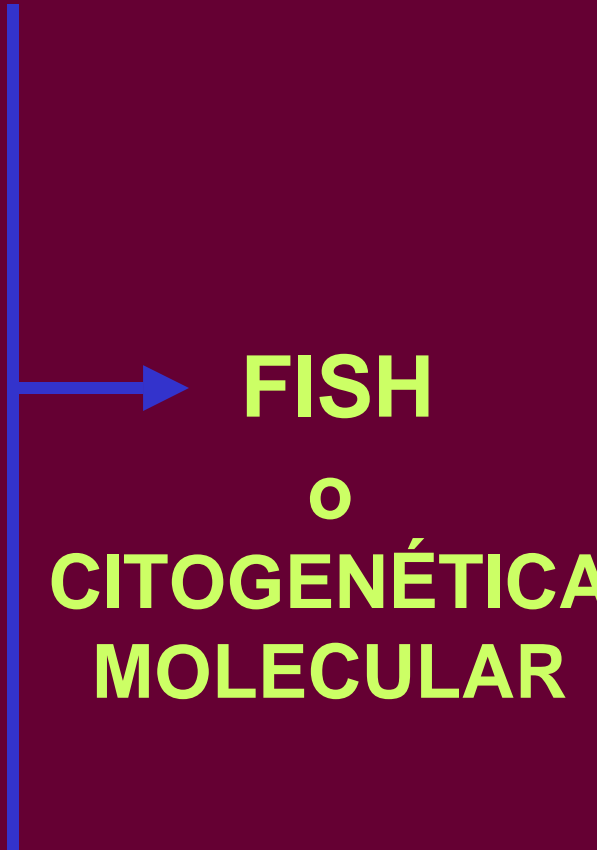
- **No requiere microscopio de fluorescencia**
- **Mayor estabilidad de la sonda**
- **El patólogo está más habituado**
- **Mayor tiempo de procesado**
- **Visualiza 1-2 colores**

FISH

- **Requiere microscopio de fluorescencia**
- **Hasta el momento, poca experiencia del patólogo**
- **Permite trabajar con 2-4 sondas de distinto color**
- **Menor tiempo de procesado**
- **Mayor sensibilidad**

¿CUANDO APLICAR LA FISH?

- Ausencia de tejido fresco
- Si se ha aplicado citogenética:
- “Cariotipos normales” (linfocito T)
- Metafases con cromosomas de mala calidad
- Cariotipos muy complejos difíciles de definir



FISH
o
CITOGENÉTICA
MOLECULAR

TÉCNICAS COMPLEMENTARIAS

SONDAS DISPONIBLES (COMERCIALES)

BCR/ABL	IgH/BCL1	IgK	UROVYSION
AML/ETO	IgH/BCL2	IgL	HER2
PML/RARA	BCL6	BCL3	HER2/topo
CBFB/MYH11	MYC/IgH	BCL10	HER1
MLL	ALK	IgH/PAX5	P53
TEL/AML1	IgH/MLT	CEN	N-MYC
C-MYC	API2/MLT		c-MYC
5q/7q/Cen	Rb (13q14)		Ciclina D1
			BACs

PUESTA A PUNTO DE LA FISH

- Microscopio de fluorescencia con filtros apropiados
- Protocolo técnico: paso crítico, digestión del tejido parafinado
- Experiencia en valoración e interpretación
- Controles para establecer niveles de corte
- Sentido común para la elección de la sonda a utilizar y para la interpretación de los resultados

CRITERIOS DE VALORACIÓN

- Valorar la FISH en la zona tumoral
- Analizar 500 núcleos para sondas centroméricas y 200 núcleos para sondas específicas de locus
- Nunca valorar células solapadas
- Establecer en una primera etapa los niveles de corte de cada sonda a partir de muestras control (utilizar el mismo tejido que el tumoral)

NIVELES DE CORTE (*CUT-OFF*)

- 10 muestras control con el mismo tejido que el tumoral
- Hibridar con la sonda y contar 500 núcleos:
 - núcleos con 1,2,3... señales de hibridación
 - núcleos con o sin reordenamiento
- Fórmula matemática: $\text{media} \pm 3 \times \text{DS}$
 - translocaciones (fusión): 5%
 - reordenamientos (*split*): 2%
 - deleciones/monosomias: 10%
 - trisomias/ganancias: 5%
 - amplificación: $\text{locus/cen} > 2$

TIPOS DE FISH

- METAFÁSICA:
 - requiere metafases y la experiencia de un citogenetista
- INTERFÁSICA:
 - requiere núcleos, y no es imprescindible la experiencia del citogenetista, aunque si es importante un mínimo de conocimientos de genética para su interpretación

LSI c-myc
LSI IgH
CEP 8

der(12)

t(14;19)

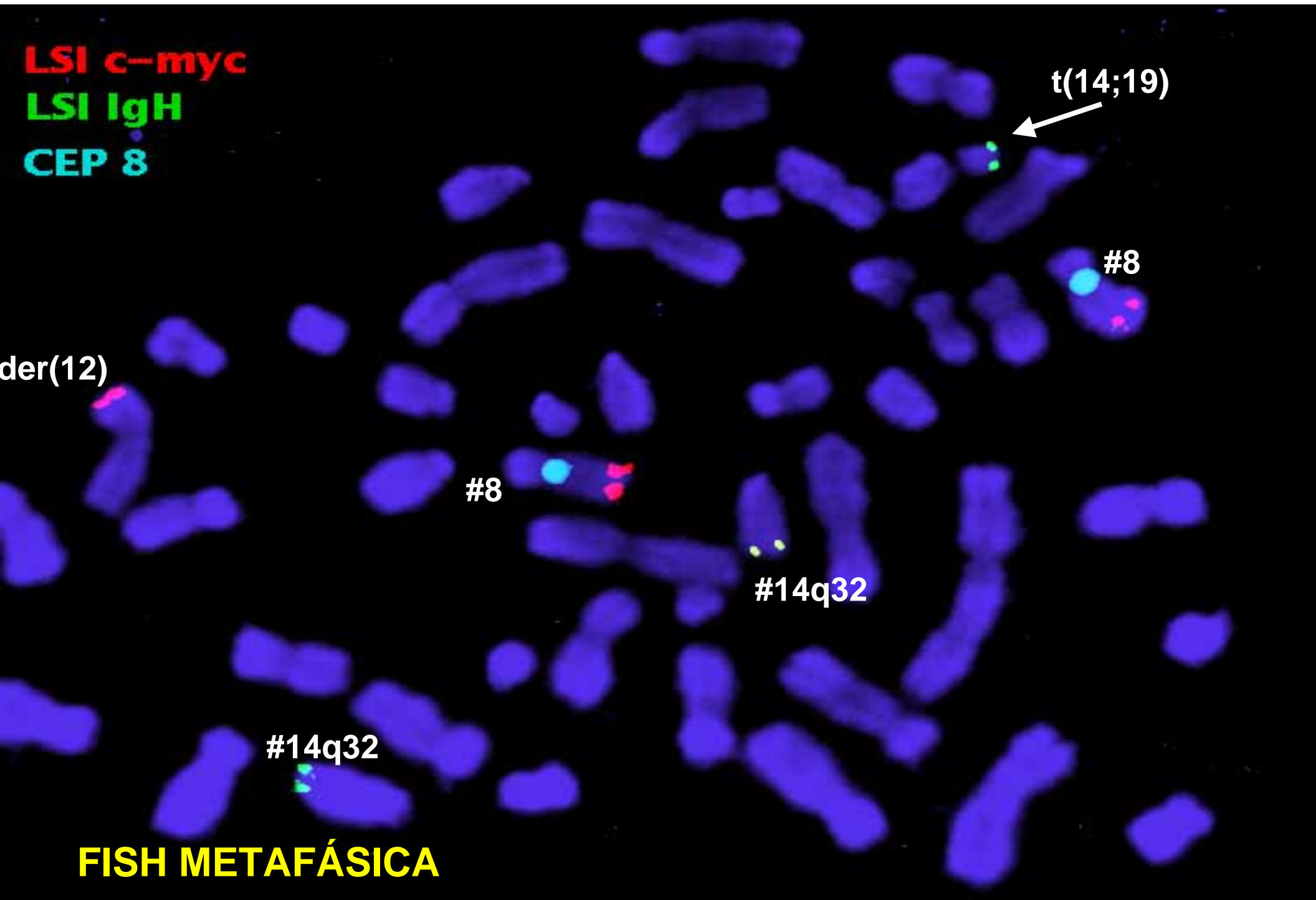
#8

#8

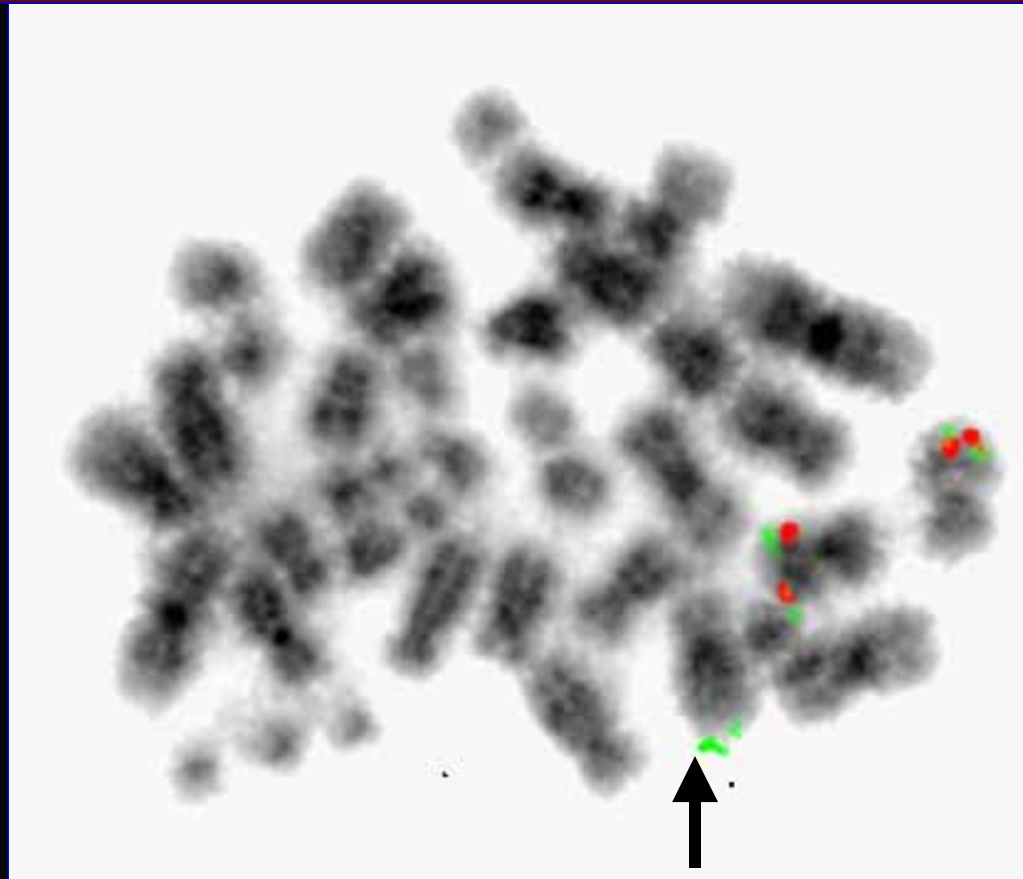
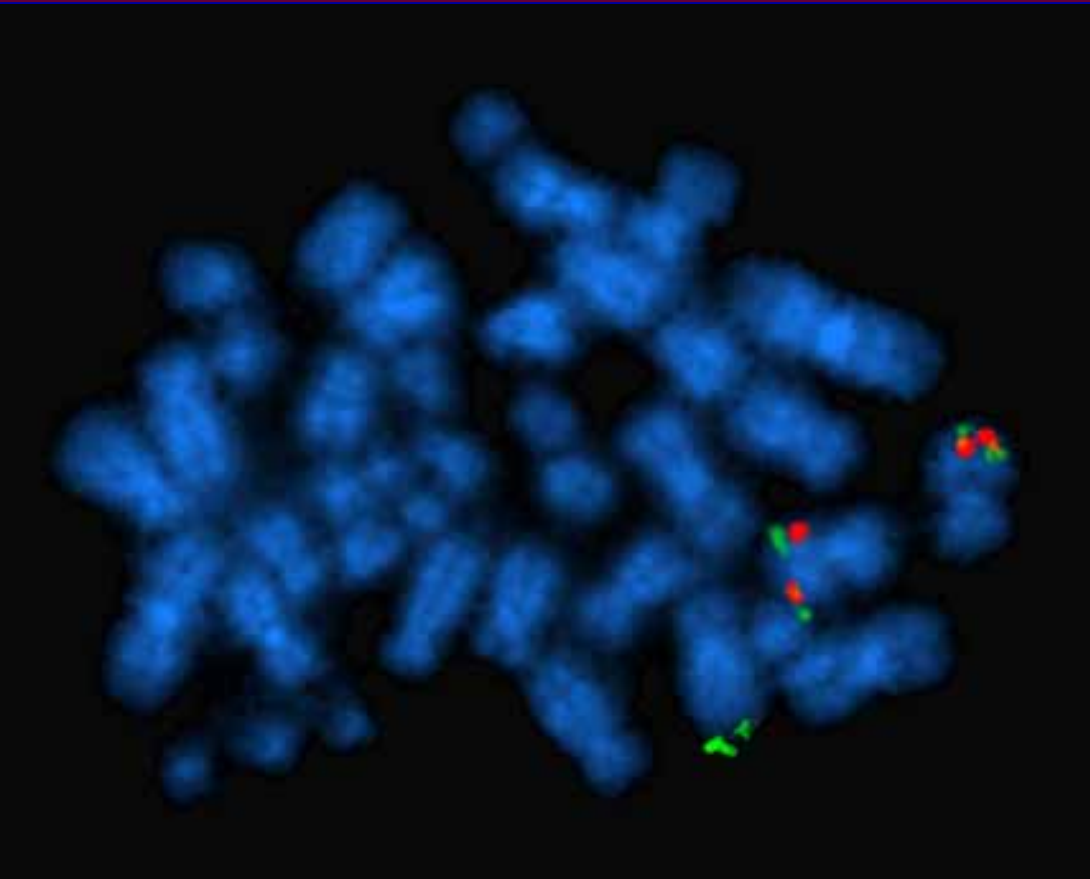
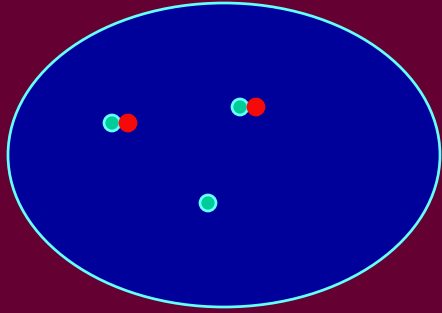
#14q32

#14q32

FISH METAFÁSICA

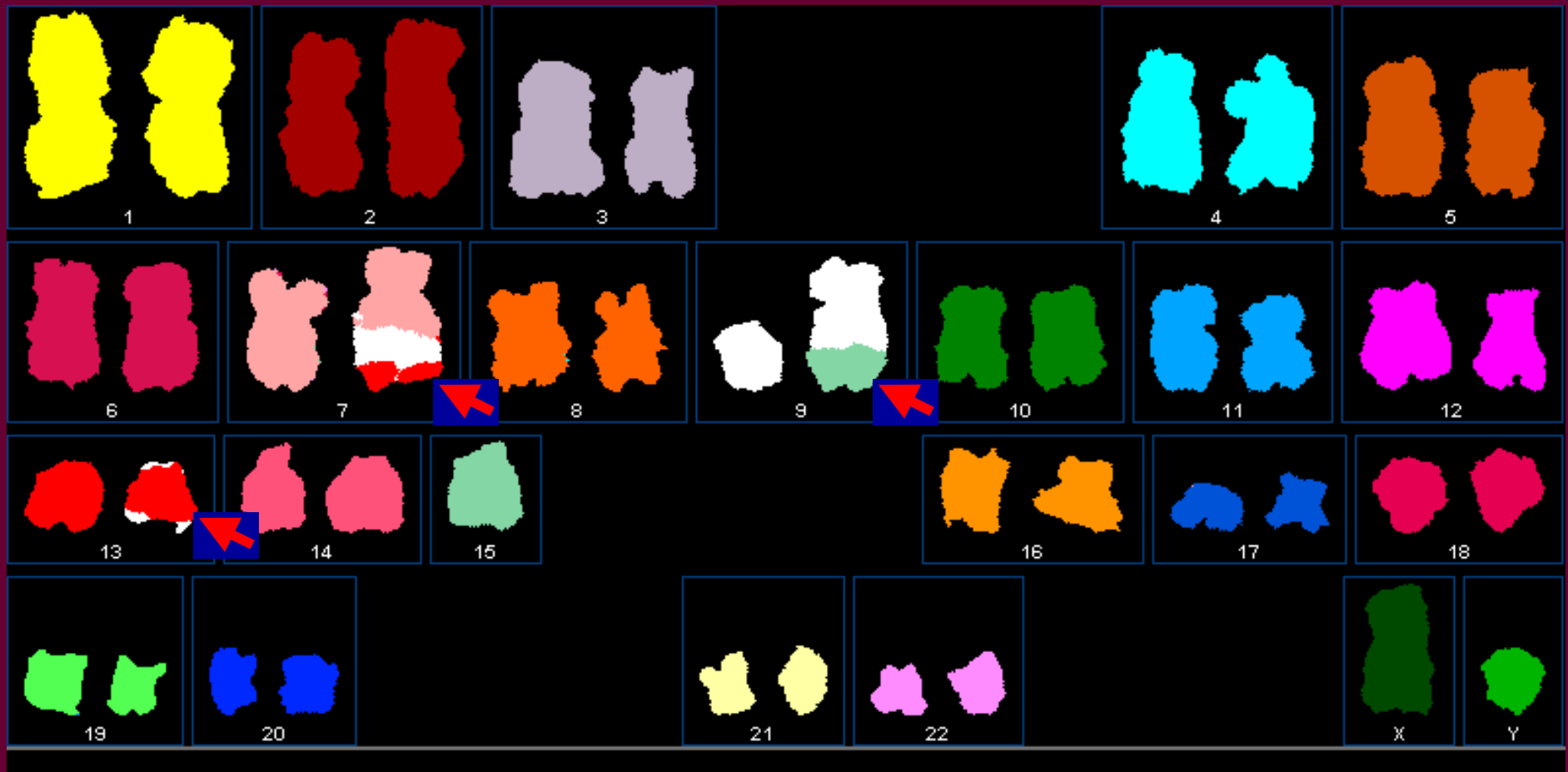


FISH METAFÁSICA (SONDA MLL, 11q23)



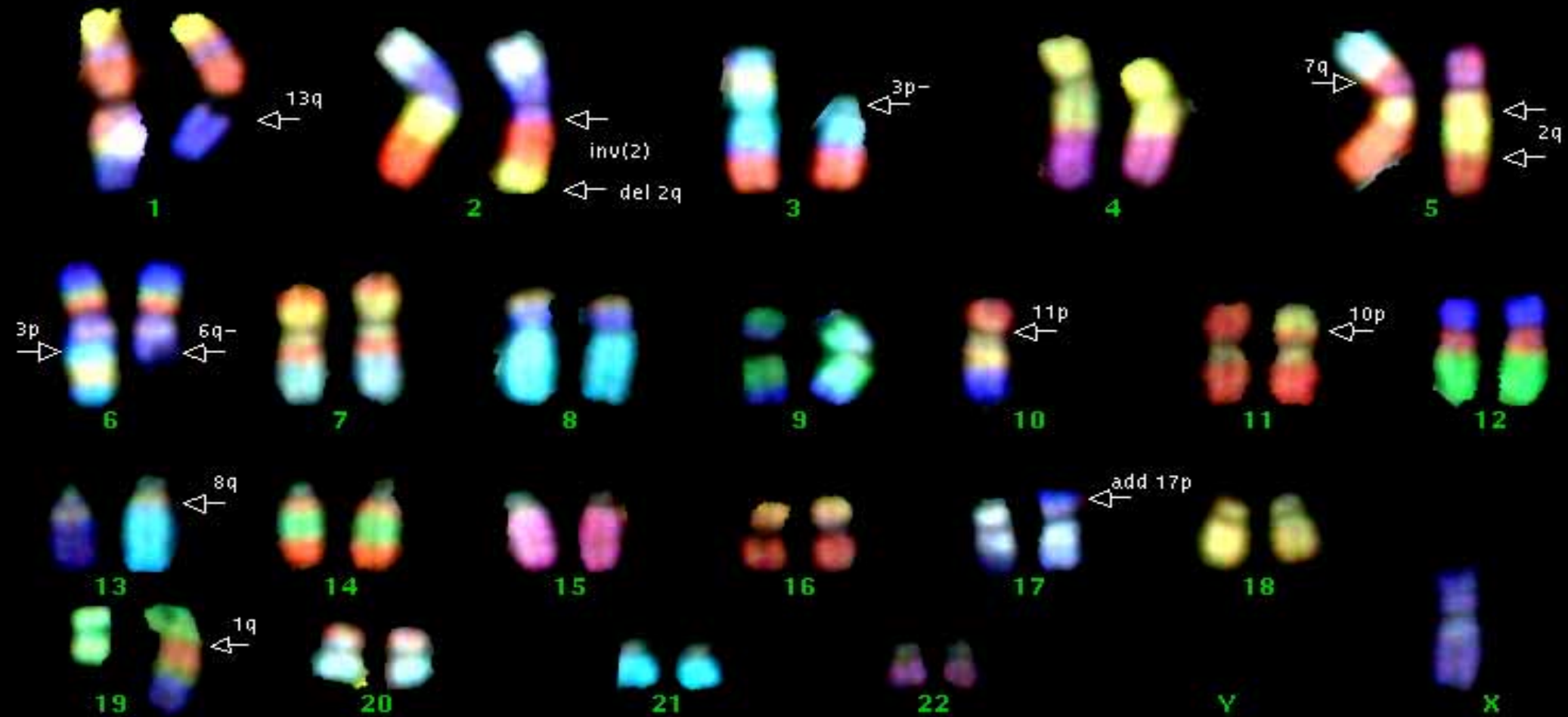
SKY o M-FISH

(cariotipo espectral o multicolor FISH)



ÚTIL PARA DETECTAR TRANSLOCACIONES

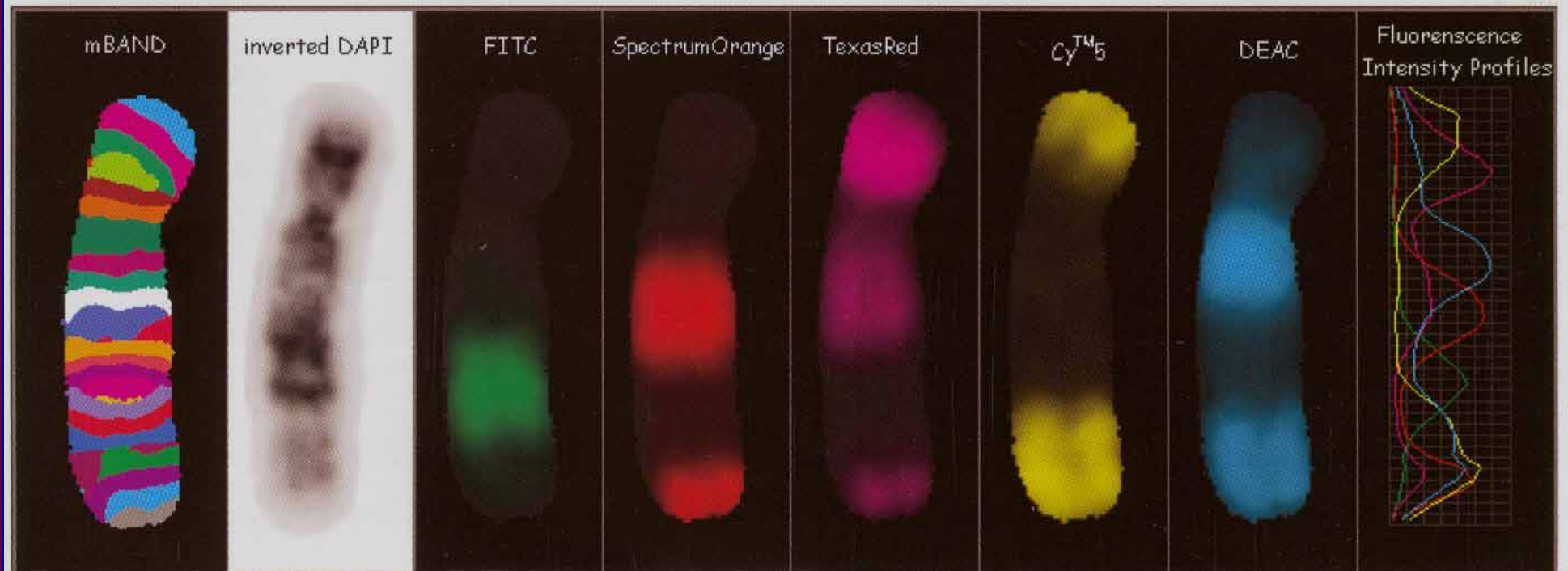
CROSS SPECIES COLOR BANDING: RxFISH



ÚTIL PARA DETECTAR INVERSIONES Y TRANSLOCACIONES
ENTRE CROMOSOMAS HOMÓLOGOS

MULTICOLOR BANDING FISH

XCyte a chromosome - mBAND



ÚTIL PARA DETECTAR DELECCIONES Y PRECISAR PUNTOS DE ROTURA

FISH INTERFÁSICA

- Para detectar o descartar alteraciones concretas sin la necesidad de tener un tejido con capacidad de entrar en división (tejido parafinado...)

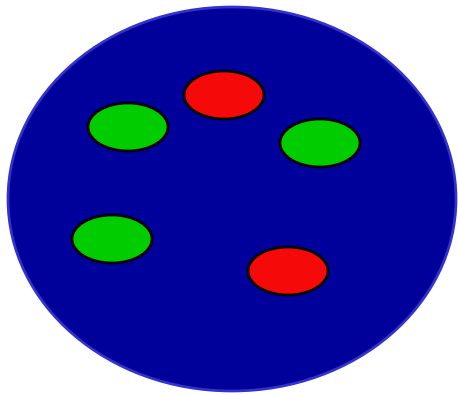
SONDAS DE UTILIDAD DIAGNÓSTICA (PATÓLOGOS)

- Sondas centroméricas:
 - para la detección de alteraciones numéricas
 - se usan como control de referencia de la hibridación de sondas de locus específico
- Sondas específicas de locus: para la detección de translocaciones, deleciones o amplificaciones
 - sondas de fusión
 - sondas *split*

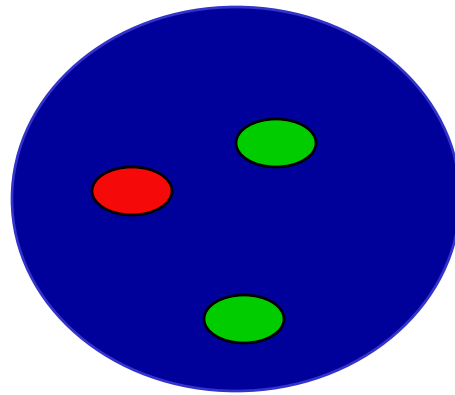
TEJIDO A UTILIZAR

- Muestras de citogenética: núcleos desnudos
- Improntas:
 - impacto de células normales (ausencia de células tumorales)
- Tejido parafinado:
 - siempre se dispone de tejido parafinado
 - localización del área tumoral
 - técnica y valoración más compleja
- Tejido fresco:
 - se puede realizar la citogenética convencional
 - célula tumoral muy “diluida”
 - técnica y valoración más sencilla

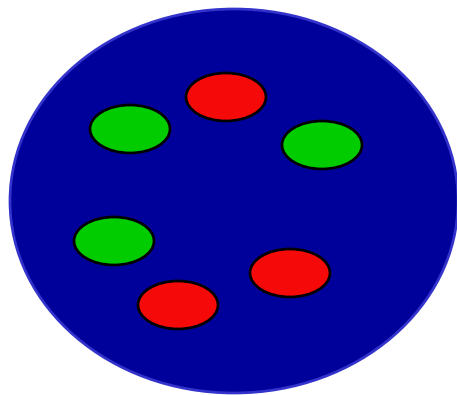
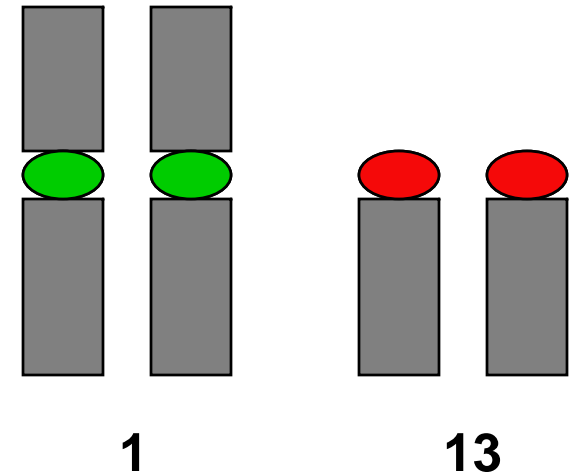
SONDAS CENTROMÉRICAS



TRISOMÍA 1

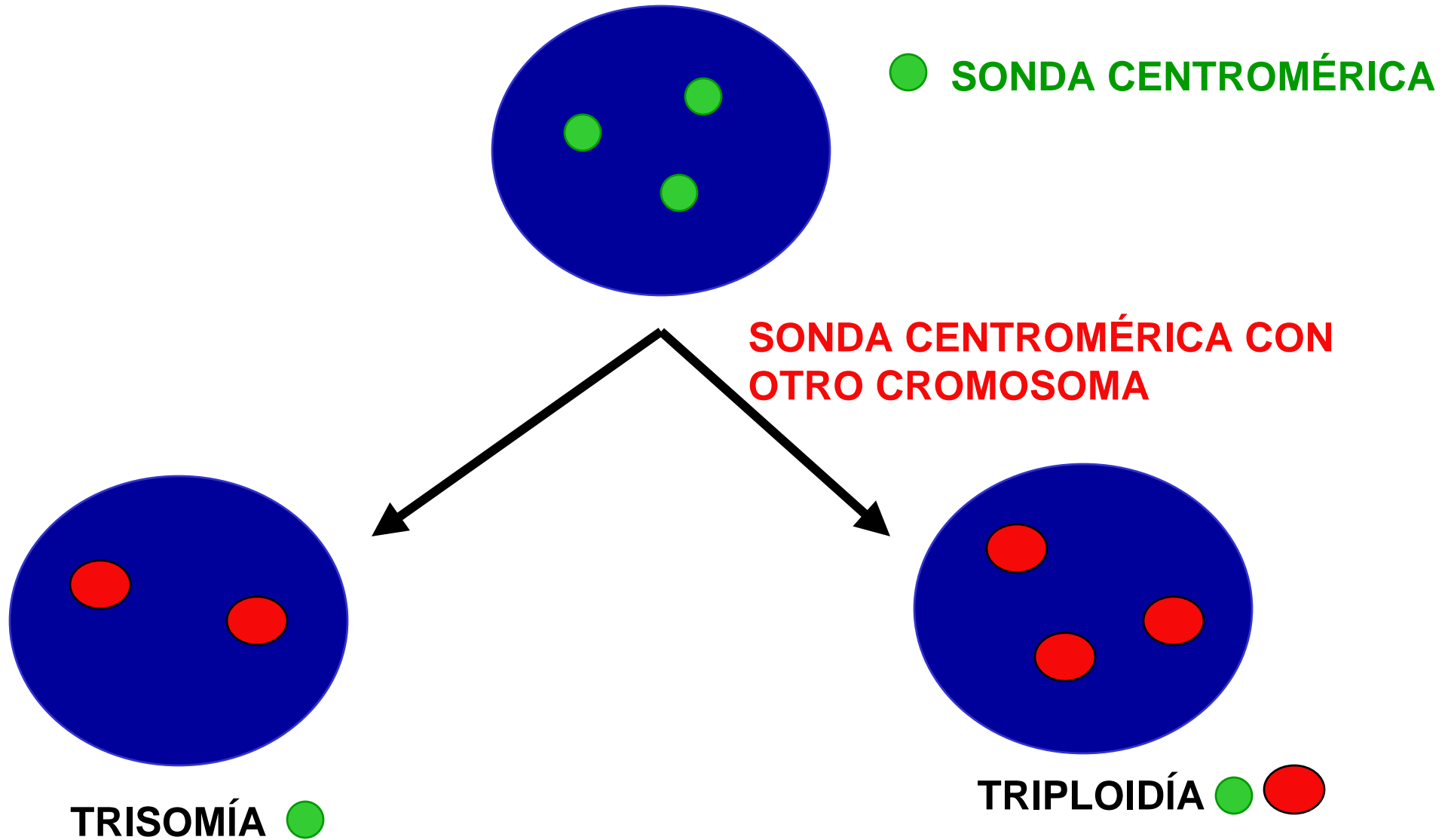


MONOSOMÍA 13



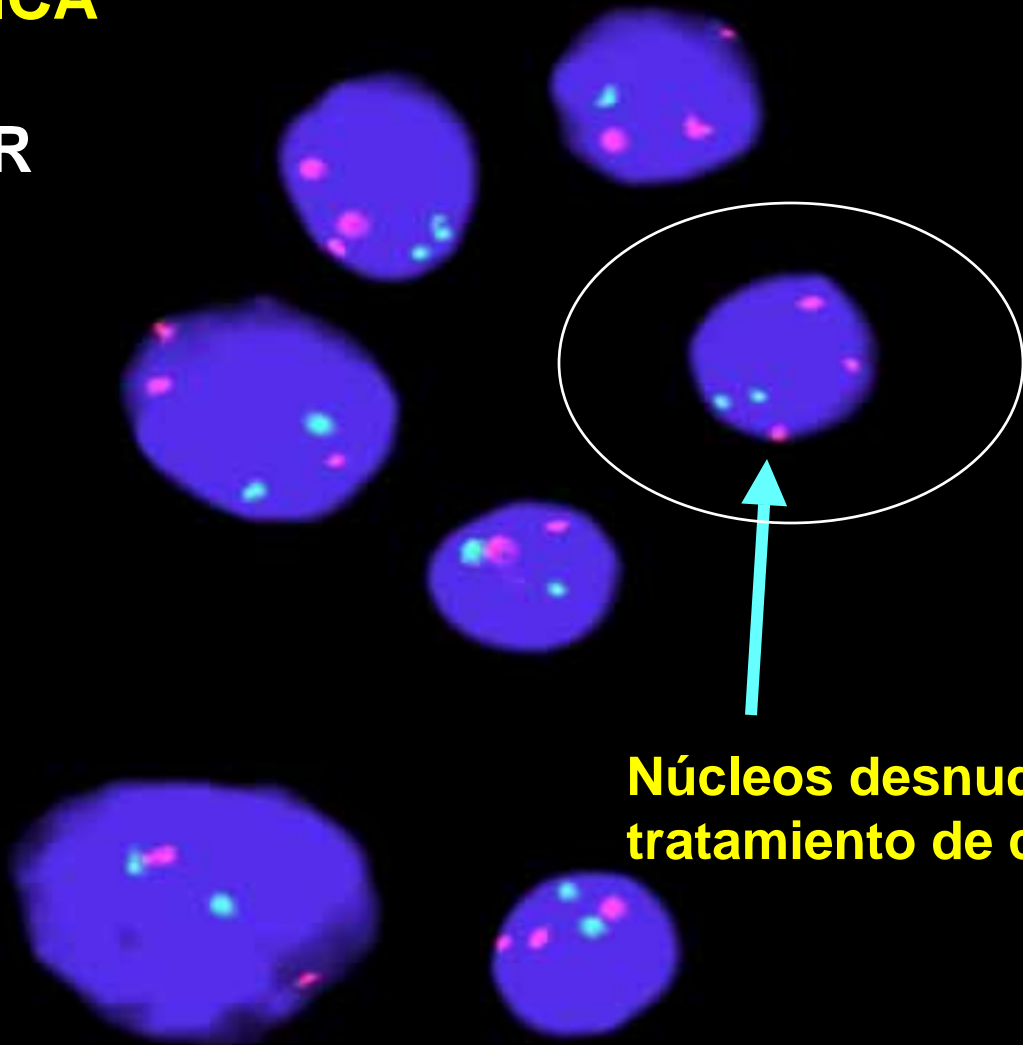
TRIPLOIDÍA O TRISOMÍA DE LOS 2 CROMOSOMAS

TRISOMÍA vs TRIPLÓIDÍA



SONDA CENTROMÉRICA

ÚTIL PARA DETECTAR
ALTERACIONES
NUMÉRICAS

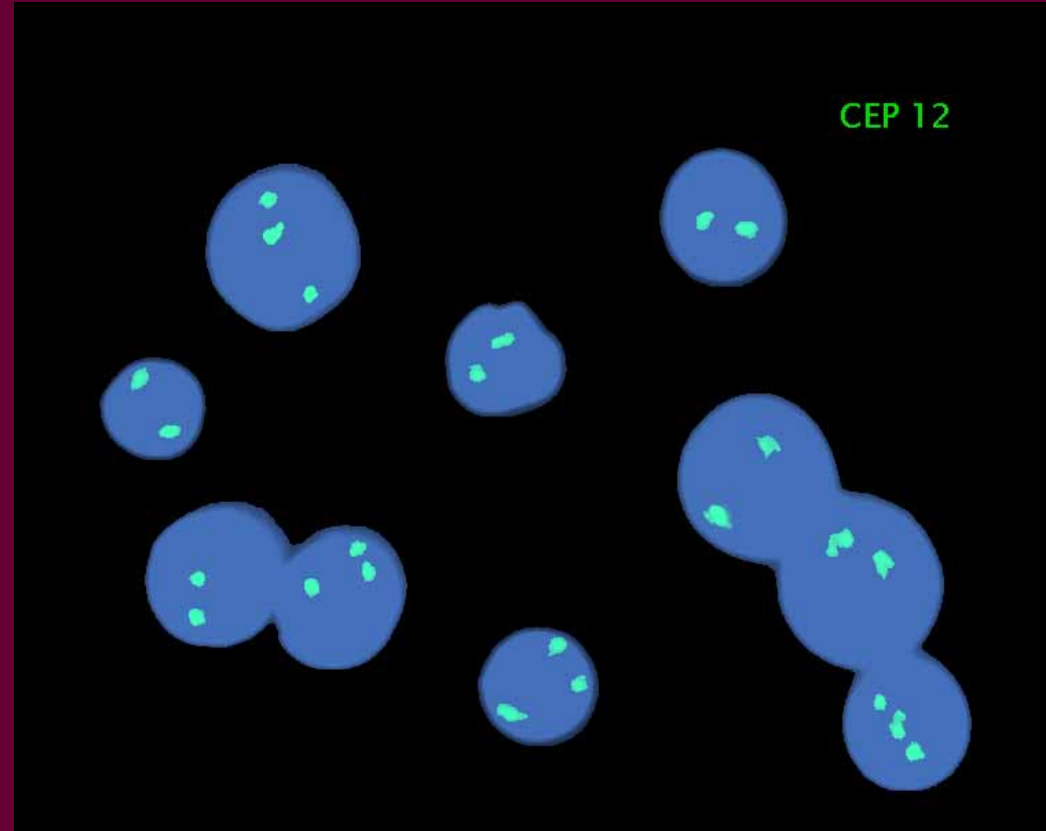
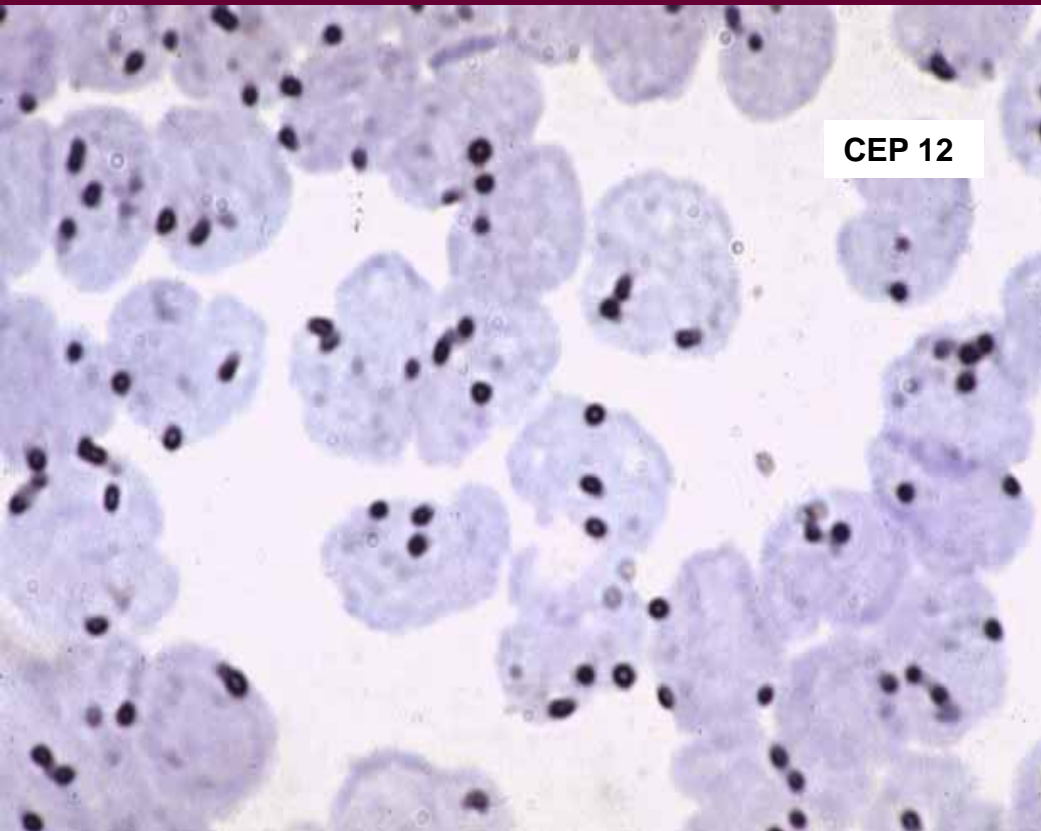


Núcleos desnudos:
tratamiento de citogenético

CEN 3

CEN 12

ALTERACIONES NUMÉRICAS: DETECCIÓN DE TRISOMÍA 12

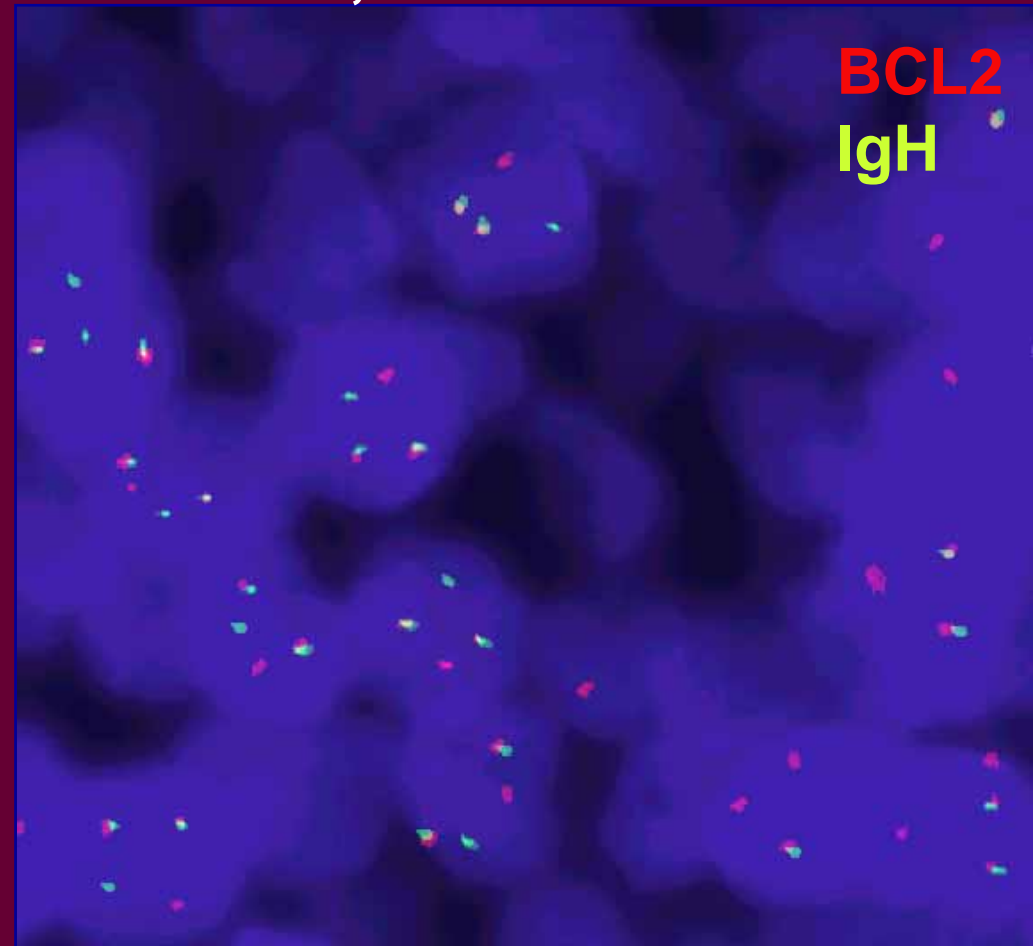
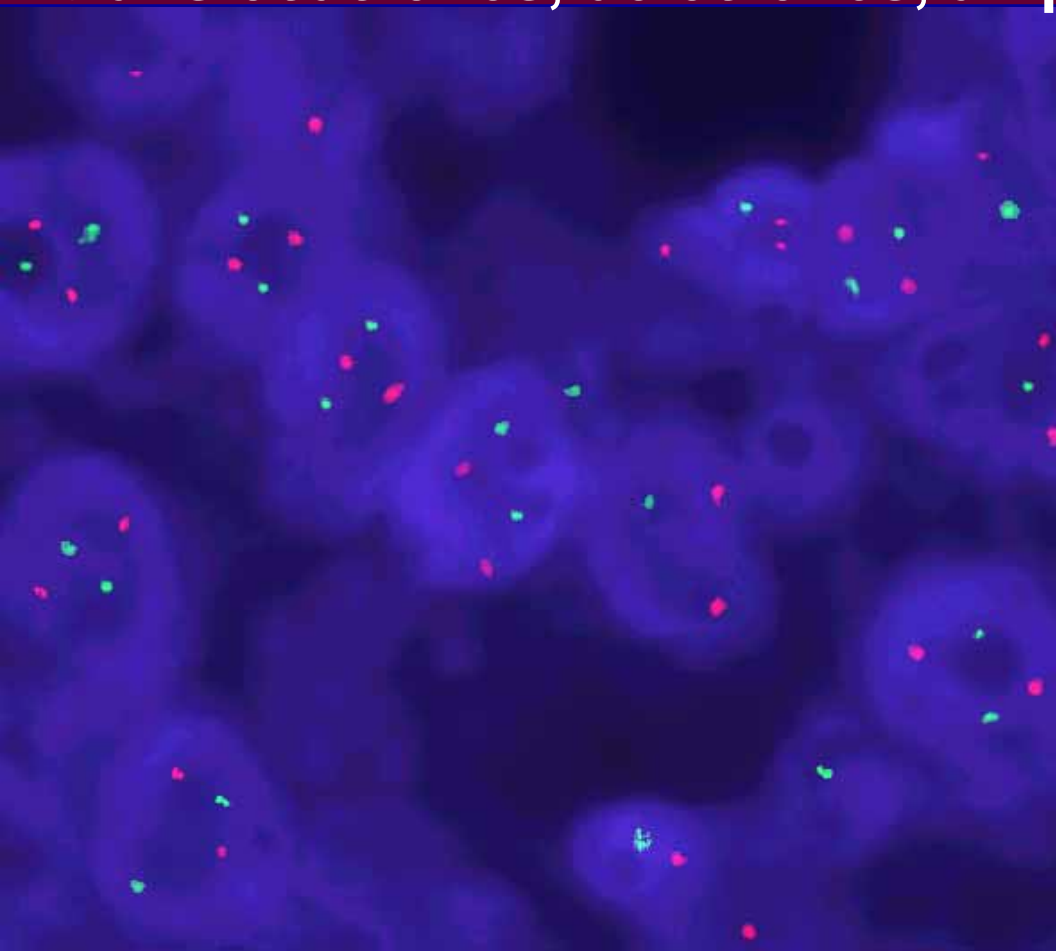


CISH

FISH

TEJIDO PARAFINADO: SONDA DE LOCUS ESPECÍFICO

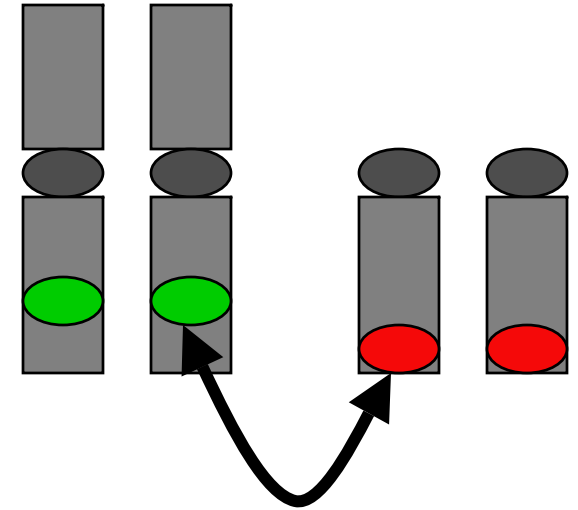
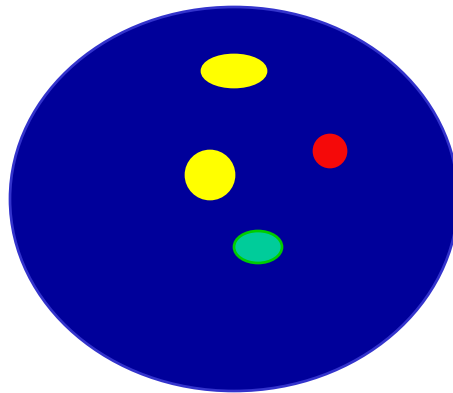
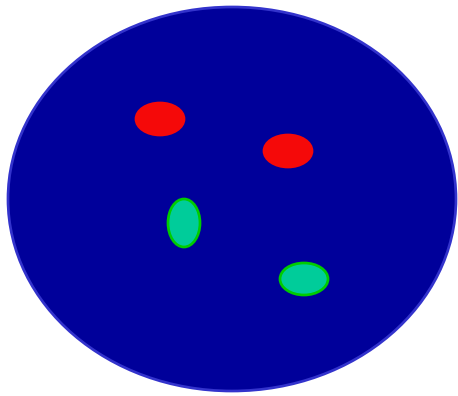
ÚTIL PARA DETECTAR ALTERACIONES ESTRUCTURALES:
translocaciones, deleciones, amplificaciones,...



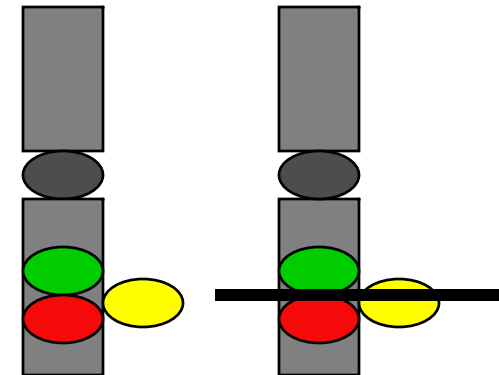
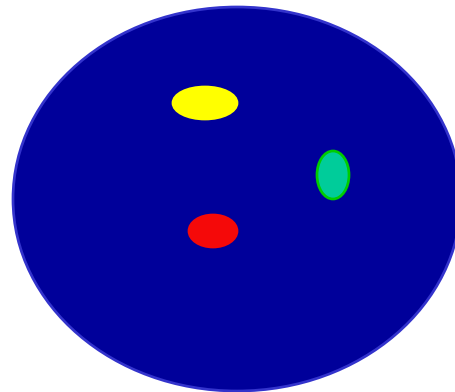
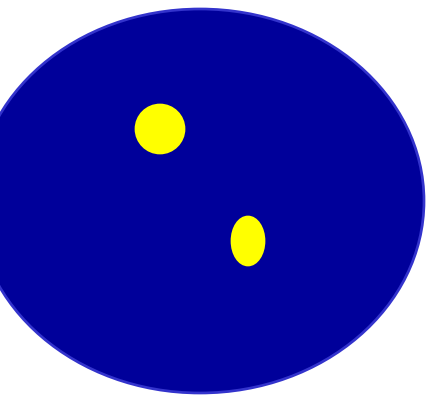
TEJIDO PARAFINADO

SONDAS DE LOCUS ESPECÍFICO

SONDAS DE FUSIÓN



SONDAS *SPLIT* o *BREAK APART*



NORMAL

TRANSLOCADO

COMPARATIVA SONDAS DE FUSIÓN VS *SPLIT*

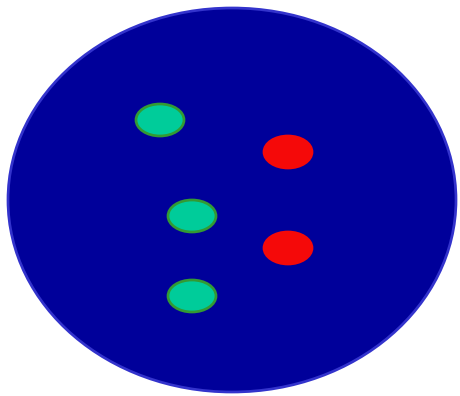
FUSIÓN:

- Más compleja de valorar
- Baja incidencia de falsos positivos con sondas duales
- Filtros más apropiados

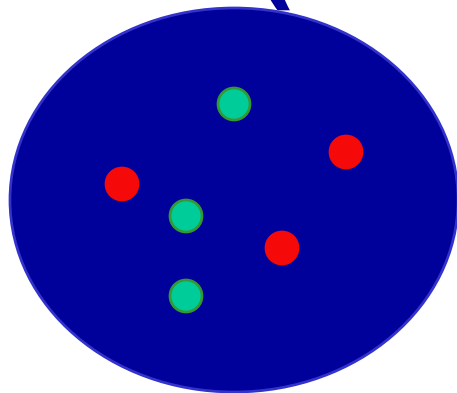
SPLIT:

- Fácil de valorar
- Baja incidencia de falsos positivos
- Filtros poco apropiados

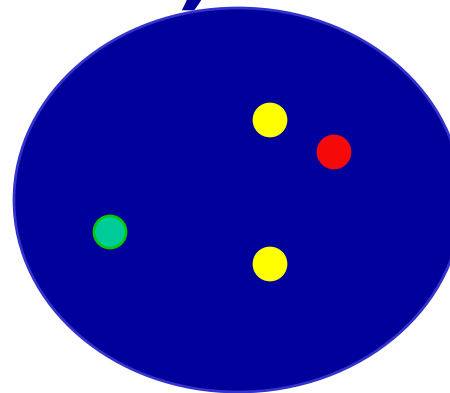
EJEMPLOS DE VALORACIÓN (FUSIÓN)



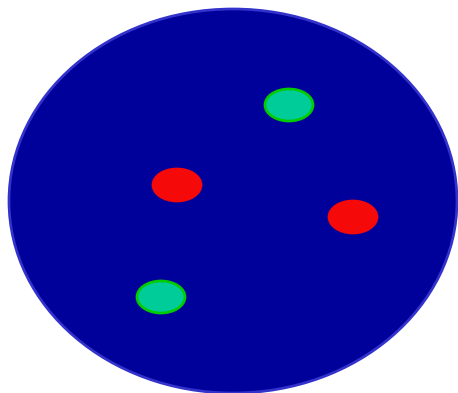
TRISOMÍA



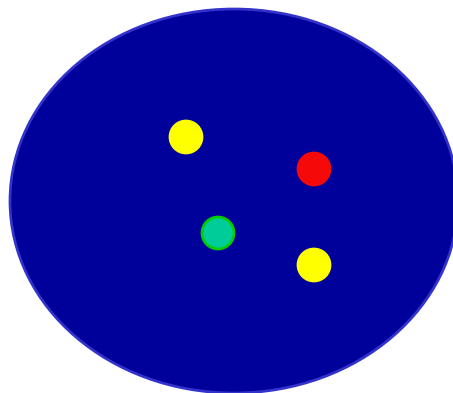
TRIPLOIDÍA



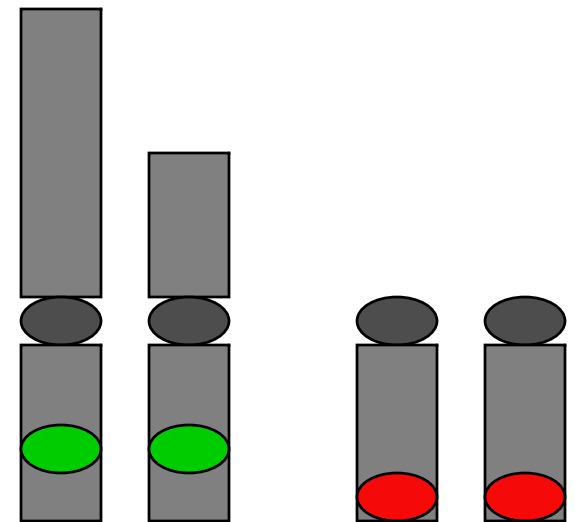
TRANSLOCADO



NORMAL

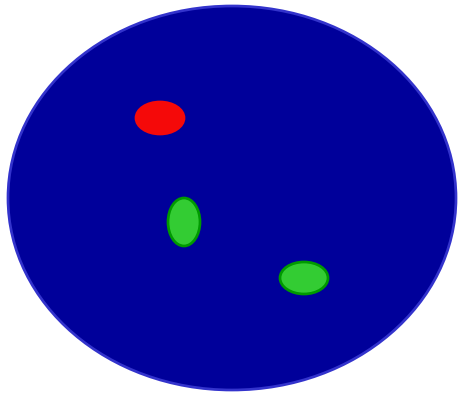


FUSIÓN

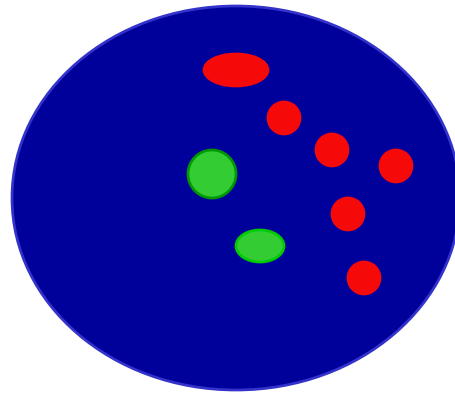


DETECCIÓN DE ALTERACIONES NUMÉRICAS CON SONDAS DE LOCUS ESPECÍFICO

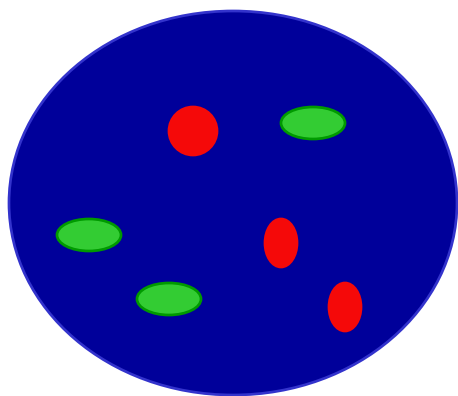
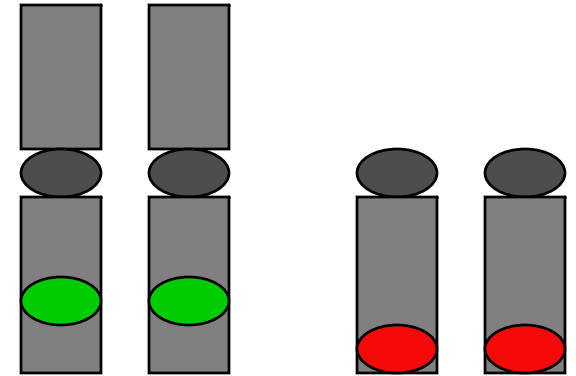
(FUSIÓN)



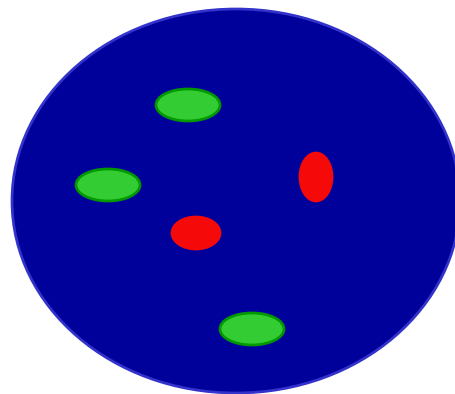
DELECIÓN



AMPLIFICACIÓN



TRIPLODÍA  

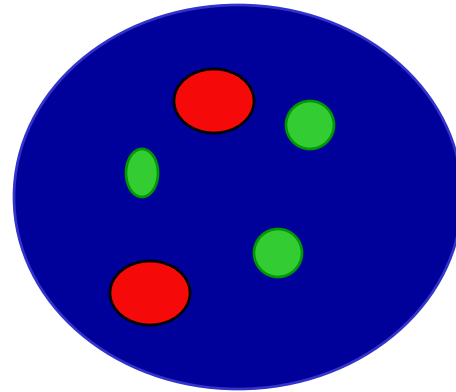


TRISOMÍA

PERMITEN DETECTAR
ALTERACIONES NUMÉRICAS
Y ESTRUCTURALES

DETECCIÓN DE TRANSLOCACIONES (SONDA DE FUSIÓN)

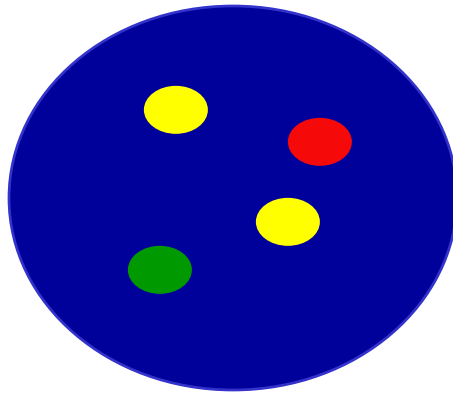
● SONDA DE LOCUS
ESPECÍFICO: POR EJ.
IgH/BCL1



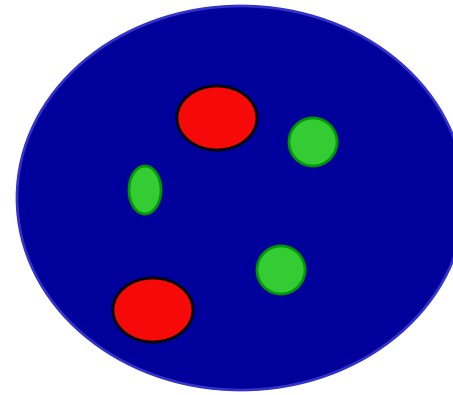
POSIBLES INTERPRETACIONES:
-TRISOMÍA DE IgH
- TRANSLOCACIÓN DE IgH



SONDA **IgH/BCL2**

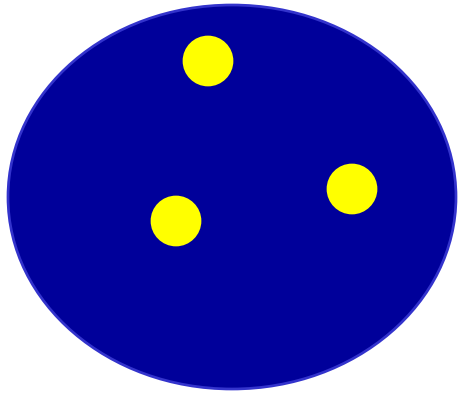


REORDENAMIENTO **IgH/BCL2**



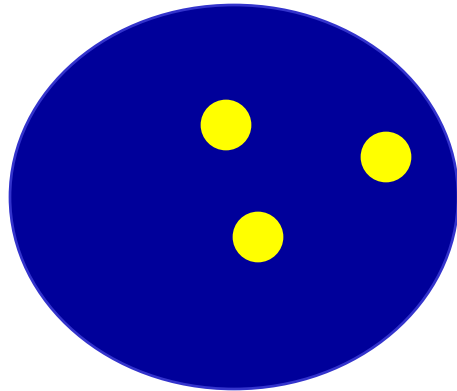
TRISOMÍA DE **IgH** O CROMOSOMA 14

EJEMPLOS DE VALORACIÓN (*SPLIT*)

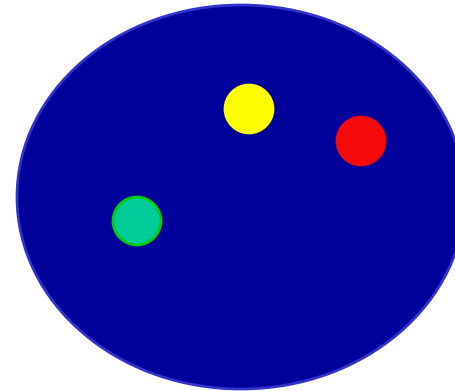


TRISOMÍA

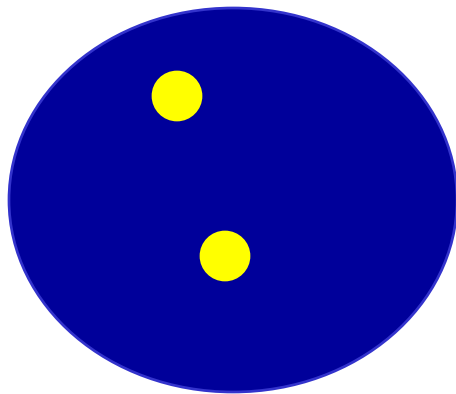
O



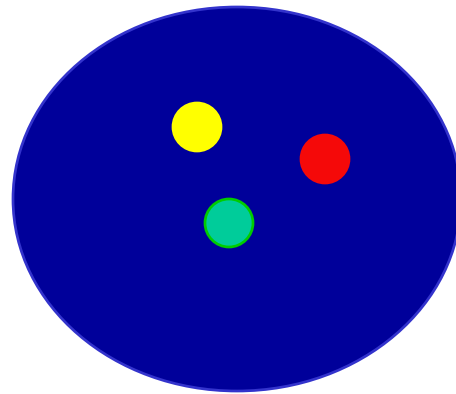
TRIPLOIDÍA



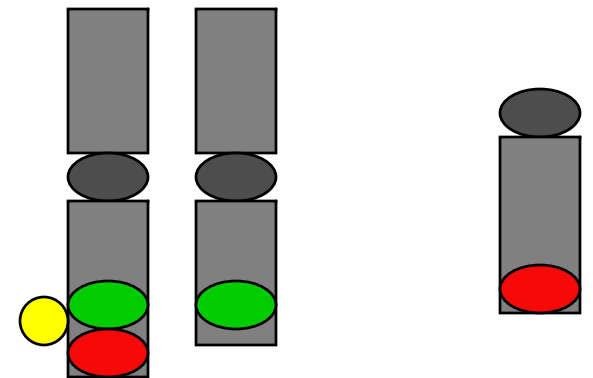
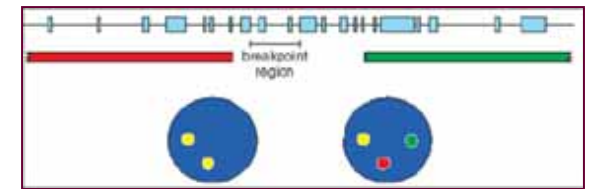
TRANSLOCADO



NORMAL



REORDENADO



EDICIÓN DE INFORMES

- ISCN (1995/2006): *International System for Human Cytogenetic Nomenclature*: formulación compleja
- Indicar la sonda utilizada
- Resultado de la fusión: por ejemplo, 2R 2V (normal), 1R 1V 2A (translocado)...
- Informe con conclusión final: normal o translocado o delecionado....
- **Recomendación:** nomenclatura + conclusión final

PROTOCOLO A SEGUIR EN LOS LINFOMAS DIAGNÓSTICO

- Con el resultado citogenético el clínico está en una posición más favorable para establecer el diagnóstico, aplicar la terapia más efectiva y programar el seguimiento del paciente
- Si citogenética **normal o no informativa**:
 - FISH o PCR según diagnóstico
 - Mayor especificidad de la FISH que la PCR
- Si citogenética **alterada**:
 - si cariotipo complejo: M-FISH, SKY o RxFISH
 - si cariotipo no informativo: FISH según diagnóstico

ESTUDIO DE CLONALIDAD EN CASOS DUDOSOS

ESTRATEGIA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LOS LINFOMAS (DIAGNÓSTICO INTEGRADO)

- Citología/histología
- Citometría de flujo/inmunohistoquímica
- Citogenética
- FISH: según orientación diagnóstica y resultado citogenético
- Biología molecular: clonalidad (10-20% de los casos) y estudio de reordenamiento molecular para seguimiento de la EMR
- Banco de Tumores

ES FUNDAMENTAL UNA BUENA COMUNICACIÓN ENTRE EL PATÓLOGO Y EL GENETISTA

AGRADECIMIENTOS

SERVEI DE PATOLOGIA

Sergi Serrano



Citogenètica i Bio. Molec.

- Blanca Espinet
- Marta Salido
- Beatriz Bellosillo
- Gemma Navarro

Francesc Alameda

Teresa Baró

Carlos Barranco

Josep M^a Corominas

Josep Lloreta

Mar Iglesias

Lluisa Mariñoso

Assumpta Munné

Lara Pijoan

Lourdes Florensa

Encarna Pérez

Anna Ferrer

Técnicos: RM. Vila, R. Navarro, M. Bragulat, C. Melero,

M.C. Vela, R. Longaron, M. Musset, E. Torres, E. Moragón

Becarios: O. Villa, L. Astier, E. Puigdecenet, C. Baró, R. Salgado, A. Carracedo

Secretarias: A. Balaguer, J. Cruz