

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

“IDENTIFICACIÓN DE REARREGLOS CROMOSÓMICOS ASOCIADOS CON TUMORES SÓLIDOS A PARTIR DE MUESTRAS DE TEJIDOS EMBEBIDOS EN PARAFINA (FFPE) Y DE TEJIDOS EN CONGELACIÓN (TOC), MEDIANTE LA APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE HIBRIDACIÓN *IN SITU* CON FLUORESCENCIA (FISH)”.

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

SULLY ESTEFANÍA MÁRQUEZ AGUILAR

SANGOLQUI, MAYO 2012

HOJA DE LEGALIZACION DE FIRMAS

ELABORADO POR

Sully Estefanía Márquez Aguilar

COORDINADORA DE LA CARRERA

Ing. Grace Tatiana Páez Barrera

DELEGADO UNIDAD DE ADMISION Y REGISTRO

Abg. Carlos Orozco Bravo MSc.

Lugar y Fecha: Sangolquí, 15 de mayo de 2012

CERTIFICACION

Dr. Marcelo Grijalva

Ing. Paola Párraga

Certifican:

Que el trabajo titulado, “IDENTIFICACIÓN DE REARREGLOS CROMOSÓMICOS ASOCIADOS CON TUMORES SÓLIDOS A PARTIR DE MUESTRAS DE TEJIDOS EMBEBIDOS EN PARAFINA (FFPE) Y DE TEJIDOS EN CONGELACIÓN (TOC), MEDIANTE LA APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE HIBRIDACIÓN *IN SITU* CON FLUORESCENCIA (FISH)”, realizado por SULLY ESTEFANÍA MÁRQUEZ AGUILAR, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido a que el presente trabajo es parte de las investigaciones realizadas por el Hospital Solón Espinosa Ayala (SOLCA), se deja en libertad de la autora y del Hospital Solón Espinosa Ayala (SOLCA) para su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a SULLY ESTEFANÍA MÁRQUEZ AGUILAR que lo entregue a ING. GRACE TATIANA PÁEZ BARRERA, en su calidad de Coordinadora de la Carrera.

Sangolquí, 15 de mayo de 2012

Dr. Marcelo Grijalva

DIRECTOR

Ing. Paola Párraga

CODIRECTORA

DECLARACION DE RESPONSABILIDAD

Yo, Sully Estefanía Márquez Aguilar

Declaro que:

El proyecto de grado denominado “IDENTIFICACIÓN DE REARREGLOS CROMOSÓMICOS ASOCIADOS CON TUMORES SÓLIDOS A PARTIR DE MUESTRAS DE TEJIDOS EMBEBIDOS EN PARAFINA (FFPE) Y DE TEJIDOS EN CONGELACIÓN (TOC), MEDIANTE LA APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE HIBRIDACIÓN *IN SITU* CON FLUORESCENCIA (FISH)”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 15 de mayo de 2012

Sully Estefanía Márquez Aguilar

AUTORIZACIÓN

Yo, Sully Estefanía Márquez Aguilar

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo “IDENTIFICACIÓN DE REARREGLOS CROMOSÓMICOS ASOCIADOS CON TUMORES SÓLIDOS A PARTIR DE MUESTRAS DE TEJIDOS EMBEBIDOS EN PARAFINA (FFPE) Y DE TEJIDOS EN CONGELACIÓN (TOC), MEDIANTE LA APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE HIBRIDACIÓN *IN SITU* CON FLUORESCENCIA (FISH)”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 15 de mayo de 2012

Sully Estefanía Márquez Aguilar

DEDICATORIA

A mis padres Eddy y Marcia, a mi hermano Ismael, quienes son pilares fundamentales en mi vida. Sin ellos, jamás hubiese podido conseguir lo que hasta ahora. Su tenacidad y lucha insaciable han hecho de ellos el gran ejemplo a seguir y destacar. A mi enamorado, Alexander, compañero inseparable, quien ha sido mi soporte para no darme por vencida, y ha sido un apoyo incondicional para alcanzar la meta que hoy estoy logrando.

Mi triunfo se lo dedico a ustedes. GRACIAS POR TODO.

Sully Márquez

AGRADECIMIENTOS

Durante este tiempo ha habido personas que han participado de alguna u otra forma en este proyecto y a quienes quiero expresar mi gratitud por el apoyo y la confianza que me han prestado de forma desinteresada, pues sin ellos hubiese sido imposible seguir adelante.

A Dios por haberme dado la sabiduría y la fortaleza para que fuera posible alcanzar uno de mis más grandes sueños.

A mis padres Marcia y Eddy, por darme la vida y por estar junto a mí en cada momento. Gracias mami y papi por regalarme una carrera para mi futuro, por ser un ejemplo de que hay que vencer los obstáculos, por creer en mí, por su lucha diaria para que no me falta nada, aunque hemos pasado momentos difíciles, pero siempre han estado aquí, brindándome todo su apoyo incondicional y lo más importante todo su amor. Gracias por enseñarme que los tres elementos principales para conseguir una meta son, perseverancia, creer en uno mismo y tener fe en Dios. Por todo esto les agradezco que estén a mi lado.

A mi hermano, Ismael, gracias por estar conmigo, apoyarme y estar presente en cada logro de mi vida, recuerda nunca dejes de luchar.

A mi gran amor Alexander, MIL GRACIAS!!!! Desde que te conocí has sido y eres MI TODO: mi motor de vida, mi enamorado, mi compañero de lucha y mi mejor amigo, y ahora estás conmigo en este día tan importante para mí, que parecía tan lejano. Gracias por estar a mi lado siempre, gracias por tu paciencia, lealtad, comprensión, fuerza y apoyo incondicional. Pues en tu compañía las cosas malas se convierten en buenas, la tristeza se transforma en alegría y la soledad no existe. Por ti ha valido la pena esta gran aventura, TE AMO.

Al Hospital Solón Espinosa Ayala (SOLCA), por su apoyo financiero y por su colaboración en la recolección de muestras clínicas para el desarrollo de esta investigación.

Al laboratorio de Genética Humana del Hospital Solón Espinosa Ayala, en especial al Dr. Paz y Miño y a la Dra. Ligia Ocampo, por haberme permitido participar en esta experiencia de trabajo e investigación, a la Lcda. Catherine Carrera por su paciencia, su dedicación, su amistad, sus consejos y por sus conocimientos que fortalecieron el proyecto. A la Lcda. Miriam Espín y a Verito por su amistad, lealtad y apoyo incondicional en los momentos difíciles.

Al Dr. Manuel Naranjo del laboratorio de Patología del Hospital Solón Espinosa Ayala, por haberme ayudado y guiado con sus conocimientos durante la investigación.

A mis directores de tesis, el Dr. Marcelo Grijalva y a la Ing. Paola Párraga, por todo el tiempo que me han dado, por su paciencia, por sus sugerencias e ideas para la realización de este trabajo.

Al Ing. Marco Taípe, por guiarme con sus enseñanzas estadísticas para poder culminar mi tesis.

A la Ing. Lucía Jiménez, por ayudarme en mi formación académica y por brindarme su amistad incondicional.

A mis amigos, en especial a Mary Cuichán, Esteban Sánchez, Milton Quinga y Mariu Hidalgo, por su amistad, por sus consejos, por su apoyo y por ser un ejemplo de lucha y perseverancia.

A todos mi mayor reconocimiento, gratitud y que Dios los bendiga.

Sully Márquez

ÍNDICE DE CONTENIDOS

HOJA DE LEGALIZACION DE FIRMAS	II
CERTIFICACION.....	III
DECLARACION DE RESPONSABILIDAD	IV
AUTORIZACIÓN	V
DEDICATORIA.....	VI
AGRADECIMIENTOS.....	VII
LISTADO DE TABLAS	XIII
LISTADO DE FIGURAS	XIV
RESUMEN.....	XVIII
ABSTRACT	XIX
CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Formulación del problema.....	1
1.2. Justificación del problema	2
1.3. Objetivos de la investigación	6
1.3.1. Objetivo general	6
1.3.2. Objetivos específicos	6
1.4. Marco Teórico	7
1.4.1. Clasificación de los genes.....	7
1.4.1.1. Proto-oncogenes.....	8
1.4.1.1.1. Activación oncogénica.....	9
1.4.1.2. Genes supresores de tumores	9
1.4.1.2.1. Tipos de genes supresores de tumores.....	10
1.4.1.2.1.1. <i>Gatekeepers</i>	10
1.4.1.2.1.2. <i>Caretakers</i>	10
1.4.1.2.1.3. <i>Landscapers</i>	10
1.4.1.2.1.1.1 Mecanismos de inactivación de los genes supresores de tumores.....	11
1.4.1.3 El Cáncer	13
1.4.1.3.1. Fases del proceso neoplásico	14
1.4.1.3.1.1. Iniciación	15

1.4.1.3.1.2 Promoción	15
1.4.1.3.1.3. Progresión	15
1.4.1.3.1.4. Invasión y metástasis	16
1.4.2. Sarcoma de Ewing	16
1.4.3. Cáncer de mama- <i>HER 2/neu</i>	20
1.4.4. Linfoma de Burkitt	26
1.4.5. Neuroblastoma	30
1.4.6. Linfoma anaplásico de células grandes	33
1.4.7. Técnica de FISH	36
1.4.7.1. Principales etapas de la técnica de FISH	39
1.4.7.1.1. Pretratamiento de las placas	39
1.4.7.1.2. Denaturación e hibridación	39
1.4.7.1.3. Lavados post-hibridación	40
1.4.7.1.4. Contratinción y visualización del ADN	40
1.4.7.2. Sondas	41
1.4.7.2.1. Sondas centroméricas	42
1.4.7.2.2. Sondas de pintado cromosómico	43
1.4.7.2.3. Sondas Teloméricas	44
1.4.7.2.4. Sondas de locus específico	45
1.4.7.2.5. Sondas de fusión	47
1.4.7.2.6. Sondas <i>dual color dual</i> fusión	48
1.4.7.2.7. Sondas de separación o split	49
1.5. Sistema de hipótesis o pregunta de investigación	50
CAPITULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	51
2.1. Participantes	51
2.2. Zona de estudio	51
2.3. Período de tiempo de investigación	51
2.4. Diseño	52
2.5. Procedimientos	52
2.5.1. Tejidos embebidos en parafina	53
2.5.1.1. Obtención de los cortes de tejidos parafinados	53

2.5.1.2. Desparafinización de las placas	53
2.5.1.3. Pretratamiento de placas utilizando el kit Vysis® de pretratamiento de parafinas	54
2.5.1.4. Fijación de la muestra	55
2.5.1.5. Denaturación e Hibridación	55
2.5.1.6. Lavado posthibridación	56
2.5.1.7. Contratación y visualización	56
2.5.2. Tejidos en congelación.....	57
2.5.2.1. Obtención de los cortes de tejidos congelados.....	57
2.5.2.2. Fijación de la placa.....	57
2.5.2.3. Digestión con proteasa.....	58
2.5.2.4. Fijación de la muestra	58
2.5.2.5. Denaturación e hibridación.....	58
2.5.2.6. Lavado posthibridación	59
2.5.2.7. Contratación y visualización	60
2.6. Análisis de datos	60
2.6.1. Valoración de núcleos	60
2.6.2. Análisis descriptivo de datos	63
CAPÍTULO 3: RESULTADOS	64
3.1. Detección de los rearrreglos cromosómicos en los diferentes tipos de tumores sólidos.....	64
3.1.1. Visualización y valoración de los núcleos.....	64
3.1.1.1 Sarcoma de Ewing	64
3.1.1.2 Linfoma de Burkitt	65
3.1.1.3 Cáncer de Mama.....	67
3.1.1.4 Neuroblastoma.....	68
3.1.1.5 Otros tumores sólidos	69
3.1.2. Análisis descriptivo de los datos.....	71
3.2. Características operativas de FISH vs HISTOPATOLOGÍA	73
3.3 Comparación de resultados	75
3.3.1.1 Prueba de McNemar para histopatología vs. FISH.....	76

3.3.1.2 Prueba <i>Chi</i> Cuadrado de independencia para Histopatología vs FISH.....	78
3.3.1.3 Índice de Kappa para determinar la concordancia entre Histopatología vs. FISH.....	79
CAPITULO 4: DISCUSIÓN.....	80
CAPITULO 5: CONCLUSIONES.....	95
CAPITULO 6: RECOMENDACIONES.....	97
CAPITULO 7: BIBLIOGRAFÍA.....	99

LISTADO DE TABLAS

Tabla 3.1 Información y resultados del análisis de las diferentes muestras de tumores sólidos empleados en el estudio (N° de muestra, edad y sexo del paciente, diagnóstico médico, técnica histopatológica, técnica de FISH, tipo de tejido, tiempo de almacenamiento, localización topográfica y los resultados) obtenidos desde Marzo 2011 hasta Enero 2012.	71
Tabla 3.2 Características operativas de la técnica de FISH comparada con la de Histopatología (<i>gold standard</i>) para los tumores sólidos mediante el software estadístico EPIDAT v3.1 (2012).	74
Tabla 3.3 Resultados obtenidos mediante la Histopatología y la técnica de FISH. ..	75
Tabla 3.4. Tabla de contingencia para la prueba de McNemar, mediante el programa Infostat v2.0.	77
Tabla 3.5. Tabla de contingencia para la prueba de <i>Chi</i> Cuadrado de independencia, mediante el programa Infostat v2.0.	78
Tabla 3.6. Tabla de contingencia para calcular el índice de Kappa, mediante el programa Epidat v3.1.....	79

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Translocación (11;22) que da lugar a la formación de la proteína de fusión (EWS-FLI1) a partir de los genes <i>EWS</i> y <i>FLI1</i> en el Sarcoma de Ewing. Tomado de: Mateo, 2007.	19
Figura 1.2. Estructura de la familia de receptores ErbB (factor de crecimiento epidermal).Tomado de: González <i>et al</i> , 2007.....	23
Figura 1.4. Translocaciones de <i>C-MYC</i> en el Linfoma de Burkitt. A. Translocación clásica t(8;14). B. Translocación t(8;22) y C. Translocación t(2;8). Tomado de: Hecht & Aster, 2000.	29
Figura 1.5. El gen <i>N-MYC</i> representado por cuerpos de cromatina llamados <i>double minutes</i> (derecha).Gen <i>N-MYC</i> representado como regiones homogéneamente teñidas (HSR) (izquierda). Modificado de: Halperin <i>et al.</i> , 2010.	32
Figura 1.6. A. Se observa la translocación t(2;5) a nivel cromosómico (Mathew <i>et al</i> ,1997) B. Formación de la proteína de fusión NPM-ALK a partir de los genes <i>NPM</i> y <i>ALK</i> en el linfoma anaplásico de células grandes. Tomado de: Stein <i>et al</i> , 2000. .	35
Figura 1.7. Sonda centromérica en una metafase. Señales centromericas rojas marcan el cromosoma 3, señales verdes son del cromosoma 7 y las señales azules son del cromosoma 17. Tomado de: Nishio <i>et al</i> , 2010.	43
Figura 1.8. Sonda de pintado cromosómico en una metafase para el cromosoma X de color verde. Tomado de: Mohamed <i>et al</i> , 2009.	44
Figura 1.9. Sonda subtelomérica para el cromosoma 3, donde el brazo largo 3 está marcado con color rojo y el brazo corto 3 está de color verde. Tomado de: Cockwell <i>et al</i> , 2000.	45
Figura 1.10. Sonda de locus específico en interfase para el locus 11q23 marcado por la señal color verde y el color naranja. Tomado de: SOLCA, 2011.	47
Figura 1.11. Sonda de fusión en una metafase para la t(8;21), donde se observa una señal roja que marca el cromosoma 8, una señal verde que marca el cromosoma 21 y una señal de fusión que indica que dicha translocación es positiva. Tomado de: SOLCA, 2011.....	47
Figura 1.12. Sonda <i>dual color dual</i> fusión para t(8;14) en núcleos. La señal roja marca el cromosoma 8 y la señal verde el cromosoma 14, la señal celeste marca el centrómero del cromosoma 8. Las dos señales de color amarillo muestran que es positivo para la t(8;14)Tomado de: SOLCA, 2011.	48
Figura 1.13. Sondas de separación o split, para la región 22q12 en núcleos. Se observa una señal roja y una verde separadas y una señal amarilla se fusión, lo que indica que es positivo para translocación t(11;22). Tomado de:SOLCA, 2011.	49
Figura 3.1. Fotografía de núcleos en interfase de una muestra de fémur con translocación 22q12 positiva en sarcoma de Ewing (TOC). La fotografía fue obtenida	

mediante el programa Cytovision v 7.2 mediante el microscopio de fluorescencia en 100X (SOLCA, 2011).	65
Figura 3.2. Fotografía de núcleos en interfase de una muestra de origen retroperitoneal con translocación 22q12 positiva en sarcoma de Ewing (FFPE). La fotografía fue obtenida mediante el programa Cytovision v 7.2 mediante el microscopio de fluorescencia en 100X (SOLCA, 2011).	65
Figura 3.3. Fotografía de núcleos en interfase de una muestra de ganglio inguinal con translocación 8q14 negativa en linfoma de Burkitt (FFPE). La fotografía fue obtenida mediante el programa Cytovision v 7.2 mediante el microscopio de fluorescencia en 100X (SOLCA, 2011).	66
Figura 3.4. Fotografía de núcleos en interfase de una muestra de ganglio con translocación 8q14 positiva en linfoma de Burkitt (TOC). La fotografía fue obtenida mediante el programa Cytovision v 7.2 mediante el microscopio de fluorescencia en 100X (SOLCA, 2011).	67
Figura 3.5. Fotografía de núcleos en interfase de una muestra de mama con amplificación positiva para el gen <i>HER2/neu</i> en cáncer de Mama (FFPE). La fotografía fue obtenida mediante el programa Cytovision v 7.2 mediante el microscopio de fluorescencia en 100X (SOLCA, 2011).	67
Figura 3.6. Fotografía de núcleos en interfase de una muestra de mama con amplificación negativa para el gen <i>HER2/neu</i> en cáncer de Mama (FFPE). La fotografía fue obtenida mediante el programa Cytovision v 7.2 mediante el microscopio de fluorescencia en 100X (SOLCA, 2011).	68
Figura 3.7. Fotografía de núcleos en interfase de una muestra de origen retroperitoneal con amplificación negativa del gen <i>N-MYC</i> en neuroblastoma (FFPE). La fotografía fue obtenida mediante el programa Cytovision v 7.2 mediante el microscopio de fluorescencia en 100X (SOLCA, 2011).	69
Figura 3.8. Fotografía de núcleos en interfase de una muestra de origen retroperitoneal con amplificación negativa del gen <i>N-MYC</i> en neuroblastoma (TOC). La fotografía fue obtenida mediante el programa Cytovision v 7.2 mediante el microscopio de fluorescencia en 100X (SOLCA, 2011).	69
Figura 3.9. Fotografía de núcleos en interfase de una muestra de ganglio retroperitoneal con translocación 2p23 ALK negativa en linfoma No Hodgking de células pequeñas (TOC). La fotografía fue obtenida mediante el programa Cytovision v 7.2 mediante el microscopio de fluorescencia en 100X (SOLCA, 2011).	70
Figura 3.10. Fotografía de núcleos en interfase de una muestra retroocular con translocación 2p23 ALK negativa, correspondiente a un caso de retinoblastoma (TOC). La fotografía fue obtenida mediante el programa Cytovision v 7.2 mediante el microscopio de fluorescencia en 100X (SOLCA, 2011).	71
Figura 3.11. Curva de ROC de FISH vs. Histopatología (<i>gold standard</i>), obtenido mediante el software estadístico EPIDAT v3.1 (2012).	75

NOMENCLATURA

SOLCA: Hospital Solón Espinosa Ayala

TOC: Tejidos en congelación

FFPE: Tejidos embebidos en parafina

FISH: Hibridación in situ con Fluorescencia

RNT: Registro Nacional de Tumores

CIN: Inestabilidad cromosómica

ESFT: Familia de tumores del Sarcoma de Ewing

ETS: Familia de los reguladores de transcripción

TK: Actividad tirosina quinasa

EGFR: Familia de los receptores del factor de crecimiento epidermal

LB: Linfoma de Burkitt

EBV: Virus de Epstein Barr

HLH: Hélica-asa-Hélice

HSR: Regiones Homogéneamente teñidas

dmins: *Doble minute*

ALK: Quinasa de linfoma anaplásico

CGH: Hibridación Genómica Comparada

ROC: *Relative Operating Characteristic curve*

μl: 10⁻⁶ L

SSC: *Standar Saline Citrate Buffer*

DAPI: 4'-6-diamino-2-fenilindol

PBS: Buffer Fosfato Salino

LOH: Pérdida de Heterocigocidad

IgH: Cadena pesada de las inmunoglobulinas

Ig κ: Cadena ligera de las inmunoglobulinas

Ig λ: Cadena ligera de las inmunoglobulinas

IgM: Inmunoglobulina M

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

PI3K: Fosfatidilinositol 3 quinasa

PIP3: Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

MYC:*Myelocytomatosis viral oncogene homolog*

ATP: Trifosfato de Adenosina

VIH: *Virus de la inmunodeficiencia humana*

BCL2: *B-cell leukemia/lymphoma 2*

NPM: Nucleofosmina

CDKN2A:*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*

MDM2: *Murine doble minute 2*

Akt: *Protein kinase B*

PTEN: *Phosphatase and tensin homolog*

mTOR:*Mammalian Target of Rapamycin*

MAPK:*Mitogen-activated protein kinases*

PDGFC:*Platelet derived growth factor C*

IGFI:*Insulin-like growth factor 1*

IGF2: *Insulin-like growth factor 2*

CCND-1: *Cyclin*

RESUMEN

La citogenética convencional en tumores sólidos está limitada por diferentes factores que influyen directamente en la obtención de metafases analizables, tales como la baja viabilidad celular, la necesidad de una disgregación enzimática de la muestra, contaminación microbiana y la dificultad para determinar el rearrreglo cromosómico asociado con los diferentes tipos de tumores. En los últimos años, la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) ha sido utilizada para la identificación de rearrreglos cromosómicos en tumores sólidos, en interfases de tejidos congelados y parafinados. Este proyecto tuvo como objetivo analizar 20 muestras de tumores sólidos con la técnica de FISH. El resultado final para cada caso fue determinado por la presencia o ausencia del rearrreglo cromosómico. Con los resultados obtenidos se aplicó un análisis exploratorio de datos y una comparación con los resultados de la técnica histopatológica vs. FISH calculando su sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, índice de Youden y capacidad de discriminación. Adicionalmente, se aplicaron las pruebas estadísticas de *Chi* cuadrado de independencia y McNemar. De las 20 muestras analizadas, 3 se asociaron con sarcoma de Ewing, 2 con linfoma de Burkitt, 4 con neuroblastoma, 7 con cáncer de mama y 4 fueron asociadas con otros tumores sólidos como linfoma no Hodgkin. Se determinó una sensibilidad para este ensayo del 100%, especificidad del 33,33%, índice de Youden de 0,33, VPP del 50%, VPN del 100% y una capacidad de discriminación del 0,667. En la prueba de McNemar se obtuvo un valor de $P=0,0075$ y con la prueba de *Chi* cuadrado un valor de 0,0068 y un $k=0,286$. En base a estos resultados, esta técnica tiene una gran capacidad para detectar rearrreglos cromosómicos en tumores sólidos, pero depende de la histopatología, también muestra que entre las dos técnicas existe una baja concordancia y una baja especificidad.

ABSTRACT

Conventional cytogenetics in solid tumors is limited by different factors that influence directly in obtaining suitable metaphases, such as low cellular viability, need of sample enzymatic disaggregation, bacteria and fungi contamination and the difficulty to determine the primary chromosome rearrangement associated with a specific tumor type. Currently, Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) has been used to identify chromosome rearrangements in the interphases of frozen and paraffin-embedded solid tumors. This project aimed to analyze 20 solid tumor samples with the FISH technique. The final result for each case was determined by the presence or absence of the chromosome rearrangement. An exploratory data analysis was made with the obtained results. It was established a comparison between the histopathologic technique and FISH to determine its sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, Youden index and discrimination capacity. Additionally, it was carried out some statistics, such as *Chi* square and McNemar test. Out of the 20 samples, 3 were associated with Ewing sarcoma, 2 with Burkitt lymphoma, 4 with neuroblastoma, 7 with breast cancer and 4 were associated with other solid tumors like non-Hodgkin lymphoma. Its determined sensitivity was 100%, its specificity 33,33%, Youden index 0,33, VPP 50%, VPN 100%, and its discrimination capacity 0,667. In the McNemar test a value of $P=0,0075$ was obtained and with chi square a value of 0,0068 and $k=0,286$. Based on these results, this technique has a great capability to detect chromosome rearrangements in solid tumors but it depends on histopathology; this also shows that there is a low concordance and a low specificity between these two techniques.

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del problema

La citogenética convencional en tumores sólidos ha tenido un lento desarrollo debido a ciertas limitaciones técnicas, entre las que se encuentran la calidad de los cromosomas, la disponibilidad de muestras frescas y su tratamiento. La calidad de los cromosomas por lo general no es óptima debido a que las muestras de tejido tumoral son necróticas y se destruyen antes de ser cultivadas. Adicionalmente, las células tumorales deben ser disgregadas de manera enzimática o mecánica y cultivadas por varios periodos de tiempo (Fletcher, 2002). Por último, la disponibilidad de muestras frescas es un prerrequisito para este tipo de estudio y limita el análisis únicamente a células en división, excluyendo así a las células que no han entrado en mitosis (Blancato&Haddad, 2000).

Las células de los tumores malignos tienen un crecimiento impredecible. Se ha reportado que aproximadamente un 40% de muestras de tumores sólidos no proporcionan un análisis citogenético exitoso debido al bajo índice mitótico y a la mala calidad del tejido (Blancato&Haddad, 2000). La mayoría de tumores sólidos tienen múltiples y complejos cambios cromosómicos durante la progresión del tumor, dificultando la identificación primaria de dichos cambios asociados al tipo específico de tumor. Adicionalmente, la infección bacteriana o fúngica durante el cultivo de

células tumorales causa su destrucción (Sudoyo & Hardi, 2011). Algunos tumores sólidos están compuestos por regiones no viables, o regiones con pocas células neoplásicas, dando lugar a que la obtención del cariotipo demande una labor intensa (Keagle & Gersen, 2005). Este hecho provoca que algunos cromosomas anormales puedan ser identificados mientras que otros permanecen sin caracterización complicando la determinación de rearrreglos cromosómicos de relevancia clínica (Fletcher, 2002).

Es por ello que, en los últimos años, se han desarrollado técnicas de citogenética molecular, como la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) que permiten la descripción de anomalías cromosómicas específicas en tejidos frescos y parafinados (Keagle & Gersen, 2005). Este método no necesita de cultivo de células tumorales e involucra la evaluación de regiones cromosómicas relevantes y específicas utilizando sondas de ADN (Sudoyo & Hardi, 2011).

1.2. Justificación del problema

Los cambios genómicos como aneuploidias, deleciones y rearrreglos cromosómicos marcan el inicio de la transición de células normales a anormales, asociándose con el crecimiento anormal y no controlado de las mismas. Este cambio en la información genética provoca que una célula no funcione de manera adecuada, pudiendo llevar al desarrollo de cáncer (Almeida & Barry, 2011), una de las principales causas de muerte a nivel mundial. El incremento de la expectativa de vida y los cambios en los estilos de vida de la población, provocan que el riesgo de

contraer cáncer se incrementa y que otras enfermedades empiecen a pasar a un segundo plano. Existe información que relaciona factores como el hábito de fumar, consumo de alcohol, costumbres de alimentación, adquisición de infecciones virales y otros, como riesgos relacionados con la aparición de tumores. Para ciertas formas de cáncer se ha detectado agregación en la familia por factores genéticos, como se observa en el cáncer de mama. Se ha determinado también que algunos tipos de cáncer pueden vincularse con infecciones, ejemplo, la hepatitis B, hepatocarcinoma, linfoma de células T, cáncer de estómago, entre otros (Echevarría, 2008).

En el 2008, se reportaron alrededor de 12.7 millones de casos de cáncer a nivel mundial de los cuales 7.6 millones han resultado en muertes. Según la Sociedad Americana del Cáncer, la estimación de nuevos casos fue de 1.5 millones para el 2010. En mujeres, el cáncer de mama es el más frecuente siendo responsable de una tasa de mortalidad del 14%, mientras que en varones, el cáncer de pulmón ha causado el 23% del total de decesos. En Estados Unidos, el cáncer continúa siendo la segunda causa principal de muerte (Jemal *et al.*, 2010) y en nuestro país es la tercera causa. En el 2005 en la ciudad de Quito, se registraron 3188 pacientes con cáncer, de los cuales 1406 fueron hombres y 1782 fueron mujeres (Cueva & Yépez, 2009).

Los tipos de cáncer contemplados en el presente proyecto son sarcoma de Ewing, neuroblastoma, cáncer de Mama, linfoma de Burkitt y linfoma anáplásico de células grandes.

Para los años 2003 y 2005, los datos del Registro Nacional de Tumores (RNT) sobre los diferentes tipos de cáncer de nuestro estudio según el sitio y el diagnóstico histológico son los siguientes: El 8,11% de casos totales donde había la presencia de sarcoma de Ewing se presentó en huesos, articulaciones y cartílagos, de los cuales un 13.04% se diagnosticó en mujeres. El 5,00% de casos totales se diagnosticaron como linfoma de Burkitt en retroperitoneo y peritoneo, de los cuales el 7,89% se presentaron en mujeres. En cáncer de mama, se presentó un 8,20% de casos totales, de los que el 0,10% de casos se registraron en varones y el 14,00% en mujeres (Cueva & Yépez, 2009).

En el periodo 2008 a 2009, el registro hospitalario de SOLCA reportó 39 casos diagnosticados como linfoma de Hodking y 235 casos como linfoma no Hodking, siendo las mujeres el grupo más afectado (Cueva & Yépez, 2009).

Adicionalmente, el análisis citogenético convencional en tumores sólidos se ha visto limitado por diferentes factores que han influido directamente en la obtención de metafases analizables. Dentro de los principales factores se pueden mencionar a la baja viabilidad celular, la necesidad de disgregación enzimática de la muestra, la contaminación microbiana y, por último, a la dificultad de determinar el cambio cromosómico primario asociado con el tipo de tumor (Calasanz *et al.*, 2000).

Estos mismos factores han sido el punto de partida para que en los últimos años se desarrollen métodos diagnósticos alternativos basados en citogenética para la identificación de alteraciones cromosómicas pues su detección es importante en el

diagnóstico y en la selección del tipo de tratamiento. La tasa de sobrevivencia para todas las formas de cáncer se ha incrementado del 50% al 68%; esta mejora en la sobrevivencia de los pacientes con cáncer puede también ser un reflejo de mejores y más tempranas técnicas diagnósticas citogenéticas-moleculares destacando como una de las principales a la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)(Calasanz *et al.*, 2000).

El presente proyecto pretende aplicar la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) para la identificación de rearrreglos cromosómicos en tumores sólidos, tanto en tejidos en congelación y parafinados, ya que ha probado ser una herramienta útil para detectar las anomalías genéticas responsables del apareamiento de tumores. Una de las mayores ventajas del método FISH es la posibilidad de estudiar interfases de tejidos en congelación y en parafina para permitir el análisis de muestras en fresco (Murthy *et al.*, 2005). La FISH es muy útil para la detección de rearrreglos asociados a tumores que pueden ser muy difíciles de diagnosticar únicamente por su morfología. Adicionalmente, esta técnica provee una manera directa de determinar la localización relativa de secuencias específicas de ADN en núcleos o cromosomas característicos de cada tipo de tumor sólido, debido a una amplia disponibilidad de sondas que facilitan la identificación de rearrreglos cromosómicos (King *et al.*, 2000).

Actualmente aproximadamente el 30% de las neoplasias corresponden a tumores sólidos. Asimismo, se conocen alrededor de 100000 alteraciones

cromosómicas en más de 30000 neoplasmas, de las que 21000 ocasionan leucemias, 3000 linfomas y 8100 tumores sólidos (Calasanz *et al.*, 2000).

Se considera que el *goldstandard* para la determinación de ciertos tipos de cáncer es FISH. Un ejemplo importante de su aplicación es la identificación de la sobreexpresión del gen HER-2 en el cáncer de mama (Cuadros & Villegas, 2008).

La identificación de los rearrreglos cromosómicos es muy importante para entender el funcionamiento de algunos oncogenes. Por esto, el análisis citogenético tiene una influencia directa en el tratamiento de las neoplasias.

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo general

Identificar rearrreglos cromosómicos asociadas con tumores sólidos en tejidos embebidos en parafina y en tejidos en congelación mediante la aplicación de la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH).

1.3.2. Objetivos específicos

- Analizar muestras de tumores sólidos, recolectadas desde marzo del 2011 hasta marzo del 2012, aplicando la técnica de hibridación *in situ* con

fluorescencia (FISH) en tejidos en congelación y en tejidos embebidos en parafina.

- Identificar los rearrreglos cromosómicos asociados a tumores específicos en cada neoplasia en estudio mediante la valoración de sus núcleos.
- Cuantificar la correlación entre los tumores en estudio con las variables sexo, edad, localización del tumor.
- Comparar el diagnóstico por FISH con el histológico.

1.4. Marco Teórico

1.4.1. Clasificación de los genes

Se han codificado aproximadamente entre 20 000 a 25 000 genes en el genoma humano (Dagnino & Rocco, 2009). Estos genes se han clasificado en dos categorías: genes estructurales y genes reguladores. Los genes estructurales son secuencias que codifican para varios productos proteicos producidos por la célula. Los genes reguladores controlan la actividad de los genes estructurales e inician, mantienen o bloquean la transcripción de los genes estructurales (Haschek *et al.*, 2009).

Dentro de los genes reguladores se encuentran los proto-oncogenes y los supresores de tumores. Ambos tipos de genes con sus receptores y moléculas de señalización, interactúan para ejercer un control fisiológico en la proliferación celular.

La activación e inactivación de estos genes está controlada de manera rigurosa tanto para iniciar como para detener la proliferación celular en los momentos adecuados (Coppola, 2010).

1.4.1.1. Proto-oncogenes

Aquellos que se derivan de genes celulares normales se llaman proto-oncogenes. Los proto-oncogenes codifican para una variedad de proteínas celulares involucradas en el crecimiento celular normal, proliferación y diferenciación. Esto incluye factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento y factores de transcripción nucleares. Perturbaciones en la expresión de proteínas causadas por una inactivación proto-oncogenica inapropiada, pueden dar lugar a alteraciones en el crecimiento y diferenciación contribuyendo a una neoplasia(Coppola, 2010).

La ocurrencia de mutaciones en los proto-oncogenes pueden resultar en variantes alteradas denominadas oncogenes que traen como resultado la pérdida de importantes mecanismos de control celular aumentando el proceso de proliferación, influyendo en la carcinogénesis. Los oncogenes son genes estructurales que codifican productos proteicos capaces de transformar el fenotipo de una célula. Solo una copia del gen necesita ser mutada para afectar el crecimiento celular. La activación de un solo oncogen no es suficiente para producir cáncer, aunque tienen un rol importante en la tumorigénesis. Los oncogenes se estudiaron inicialmente en virus tumorales (Scheneider, 2011).

1.4.1.1.1. Activación oncogénica

La transformación de un proto-oncogen a un oncogen se llama activación; esta ocurre con mayor frecuencia en la fase de progresión a nivel somático (Coppola, 2010). Existen diferentes mecanismos que pueden dar lugar a una activación oncogénica, algunos parecen ser específicos de los tumores. Estos incluyen mutaciones, translocaciones, inversiones, inserciones, deleciones, amplificación génica, aneuploidias, poliploidias e inserción viral. De entre estos mecanismos se destacan las translocaciones y la amplificación génica. Las translocaciones pueden resultar de la activación del oncogen mediante la destrucción o inactivación de genes en el sitio de roturas cromosómicas. En la amplificación génica, los errores en la replicación pueden resultar en copias múltiples de un oncogen. La presencia de múltiples oncogenes en una célula le confiere una ventaja clonal. La sobreexpresión es muy común en varios tipos de cáncer, por ejemplo, el neuroblastoma tiene copias múltiples del oncogen *N-MYC* (Scheneider, 2011).

1.4.1.2. Genes supresores de tumores

Los genes supresores de tumores, o antioncogenes, son reguladores que funcionan normalmente para limitar el crecimiento normal mediante la inhibición de la actividad de los genes estructurales responsables (Haschek *et al.*, 2009). Estos codifican proteínas a lo largo de las rutas de señalización que modulan el crecimiento celular, diferenciación y muerte celular. Se han caracterizado hasta la actualidad más de 30 genes supresores de tumores (Haschek *et al.*, 2009). Al contrario de lo que

ocurre en los oncogenes, la inactivación de los genes supresores de tumores permite el desarrollo del cáncer. Existen tres principales categorías de genes supresores de tumores, entre las que están los *gatekeepers*, *caretakers* y *landscapers*.

1.4.1.2.1. Tipos de genes supresores de tumores

1.4.1.2.1.1. *Gatekeepers*

Están involucrados directamente en el crecimiento celular, diferenciación y apoptosis. La inactivación de estos genes permite a las células tumorales obviar los balances y *checkpoints* celulares que da lugar a un crecimiento no restringido y a la inmortalidad (Largo.C, 2007).

1.4.1.2.1.2. *Caretakers*

Los *caretakers* mantienen la estabilidad genómica de la célula; una mutación en estos genes puede incrementar la tasa de células mutadas lo cual permite la activación de oncogenes y la inactivación de *gatekeepers*. Los *caretakers* afectan a la biología de la célula de manera indirecta controlando la tasa a la que las células acumulan genes mutados (Scheneider, 2011).

1.4.1.2.1.3. *Landscapers*

Las mutaciones en este tipo de genes conducen a un crecimiento celular irregular. Al parecer defectos en estos genes contribuyen al desarrollo del cáncer hereditario (Scheneider, 2011).

1.4.1.2.1.1.1 Mecanismos de inactivación de los genes supresores de tumores

La inactivación de un gen supresor puede ocurrir a nivel somático o a nivel germinal. La inactivación del segundo alelo del gen siempre ocurre a nivel somático. Esto puede darse por mecanismos epigenéticos, que se refieren al silenciamiento de los genes, es decir que dejan de funcionar sin intervenir en el ADN del gen. Los dos principales son metilación del ADN y sellado genómico (*genomic imprinting*) (Haschek *et al.*, 2009).

La metilación del ADN contribuye a la diferenciación celular e inhibe a un gran número de genes incluyendo algunos oncogenes. En el cáncer, existe un decremento en la expresión de la ADN metil transferasa, que da lugar a una demetilación no específica de la 5-metilcitosina. Esta demetilación puede reactivar la expresión de oncogenes. Los tipos de cáncer que han demostrado una metilación anormal incluyen al cáncer colorectal, neuroblastoma, rabdomiosarcoma, y osteosarcoma (Haschek *et al.*, 2009).

En el sellado genómico (*genetic imprinting*) entre 30 a 40 genes se heredan sellados (*imprinted*). Uno de los dos alelos, el materno o el paterno, no se expresa o lo hace de manera deficiente. Estos genes no cumplen los postulados de Mendel

debido a que no contribuyen por igual al fenotipo de la descendencia al funcionar de forma diferente según provengan de la progenitora o del progenitor (Saladrigas, 2001).

Cierto número de neoplasias y enfermedades hereditarias se asocian con mutaciones, reordenamientos cromosómicos, disomías uniparentales y errores de impresión del sello en las regiones reguladas por el mecanismo de sellado genómico. Prácticamente todos los genes que poseen sellado anormal en el cáncer están localizados en la región 11p15.5 del cromosoma 11. Se han evidenciado varios trastornos en la regulación del crecimiento en esta región que contiene alrededor de nueve genes sellados, entre ellos a *IGF2* y *H19*. Se conocen alteraciones del sellado de *IGF2* que causan la sobreexpresión o la desregulación de la expresión de la proteína IGF2, dando lugar a una docena de neoplasias diferentes incluyendo el tumor de Wilms. (Saladrigas, 2001).

Existe otro tipo de inestabilidad genómica, que se encuentra en la mayoría de los tumores, denominada inestabilidad cromosómica (CIN). CIN es debida a ganancia y/o pérdida de cromosomas enteros o fragmentos largos de cromosomas durante la división celular (Kops et al., 2005 citado por Largo C., 2007), como consecuencia aparece un desequilibrio en el número de cromosomas (aneuploidía) y una alta tasa de pérdida de heterocigosidad (LOH).

Estos cambios dan ventaja a la célula tumoral, ya que se elimina el alelo funcional de un gen supresor. Se desconocen los mecanismos por los que aparece

CIN, aunque se han propuesto varios genes como los que regulan el ciclo celular, la crisis telomérica y centrosómica.

Estudios sugieren que la aneuploidía es una causa directa del cáncer, debido a que provoca con mayor frecuencia inestabilidad genética en los genes que controlan los puntos de control de la mitosis (Kops et al., 2005 citado por Largo C., 2007). Es por ello que el cáncer es una enfermedad genética en la que aparecen defectos específicos que se asocian a una predisposición para su origen, progreso y metástasis en diferentes tipos de neoplasias. La identificación de estas alteraciones contribuye a la detección temprana, el mejor diagnóstico y adecuado tratamiento de las neoplasias (Largo C., 2007).

1.4.1.3 El Cáncer

El cáncer es el crecimiento anormal y no controlado de las células. La transformación de una célula resulta de alteraciones de su ADN que se acumula con el tiempo. El cambio en la información genética causa que una célula no funcione apropiadamente. Una característica importante de las células cancerosas es su habilidad para dividirse rápidamente, y el resultado de la acumulación de células cancerosas se denomina tumor. Si el tumor crece y no invade los tejidos que están alrededor se lo llama benigno. Por otro lado, si el tumor se esparce a los tejidos cercanos o a los distantes se lo denomina maligno.

El cáncer no consiste en una sola enfermedad. Se han identificado más de 100 tipos con diferentes causas y síntomas. Los cuatro tipos principales de cáncer son carcinomas, sarcomas, leucemias y linfomas. Aproximadamente el 90% de los cánceres humanos son carcinomas, los cuales tienen origen en piel o epitelio de los órganos internos, glándulas y cavidades corporales (pulmón, próstata, mama, piel, entre otros). Los sarcomas son menos comunes e involucran la transformación de células del tejido conectivo (cartílago, hueso, músculo, entre otros) formando tumores sólidos (Almeida & Barry, 2011).

El cáncer se caracteriza por la alteración de procesos celulares fuertemente regulados, tales como diferenciación, proliferación y muerte celular programada. Las células tumorales poseen diferentes propiedades, entre las cuales se encuentran la pérdida de diferenciación, ganancia de habilidades proliferativas, sobrepasan los *checkpoints* del ciclo celular, fallas en la reparación del ADN, inmortalidad, angiogénesis, metabolismo alterado, inestabilidad genómica, señalización celular anormal y movimiento (Scheneider, 2011).

1.4.1.3.1. Fases del proceso neoplásico

Una célula atraviesa por múltiples fases para transformarse en una célula maligna, dentro de las cuales se incluyen la iniciación, promoción, progresión, invasión y metástasis.

1.4.1.3.1.1. Iniciación

El desarrollo del tumor comienza cuando una célula del cuerpo empieza a multiplicarse dando lugar a una pequeña colonia de células en el mismo tejido. En esta fase una célula normal sufre un cambio genético irreversible caracterizado por una capacidad intrínseca de crecimiento autónomo, permaneciendo latente por semanas, meses o años. Durante este tiempo la célula va a ser fenotípicamente distinta de otras células en ese tejido. La iniciación implica alteración del ADN celular en uno o varios sitios del genoma (Haschek *et al.*, 2009).

1.4.1.3.1.2 Promoción

En esta etapa agentes específicos llamados promotores, realzan el desarrollo de los neoplasmas. Dentro de estos se incluyen agentes como hormonas, que no interactúan directamente con el ADN celular, pero influyen en su expresión. La promoción del tumor puede estar modulada por diferentes factores, tales como edad, sexo, dieta y balance hormonal (Haschek *et al.*, 2009).

1.4.1.3.1.3. Progresión

En esta fase las mutaciones genéticas continúan permitiendo a la célula tumoral la ganancia o pérdida de ciertas características, pero en este caso dichas mutaciones pueden permitirle al tumor funcionar de manera independiente. La progresión se debe a la exposición a carcinógenos, así como a mutaciones

espontáneas que aportan al crecimiento anormal de las células cancerosas. Sus cambios genéticos son irreversibles. El tumor va a consistir en una población de células tumorales malignas, las cuales poseen un incremento en la habilidad proliferativa, una nutrición autónoma, una variedad de cariotipos anormales con deleciones inusuales, rearrreglos y potencial metastásico (Scheneider, 2011).

1.4.1.3.1.4. Invasión y metástasis

En esta etapa, las células malignas sufren cambios genéticos para ganar la habilidad de invadir los tejidos que están a su alrededor y producir colonias tumorales. El proceso metastásico involucra múltiples pasos. En el primero, las células pierden adhesión a las células vecinas y adquieren la habilidad de moverse a través de locomoción. Las células invaden la membrana celular, lo que les da acceso a los tejidos vecinos y al sistema linfático o circulatorio. La ruta que tiene un grupo de células metastásicas es específica y predecible dependiendo del tipo y de la localización del tumor inicial. El paso final se denomina colonización, en la que las células cancerosas han invadido el nuevo tejido. Algunas van a permanecer inactivas por años mientras que otras comenzarán a crecer inmediatamente (Scheneider, 2011).

1.4.2. Sarcoma de Ewing

La familia de tumores del sarcoma de Ewing (ESFT) incluye un grupo heterogéneo de neoplasias constituidas por células redondas de pequeño tamaño

con mínima evidencia morfológica de diferenciación, o por células más grandes con diferentes grados de diferenciación neuroectodérmica. El ESFT se caracteriza por tener un fuerte potencial metastásico (Lozano, 2007). Todos los miembros de la familia ESFT comparten características citogenéticas, histológicas y moleculares similares y se derivan de células mesenquimales especiales (Coppola, 2010).

El sarcoma de Ewing es la segunda neoplasia maligna más común de hueso que afecta principalmente a niños y adolescentes en un 80%, donde el género masculino es comúnmente más afectado (Heymann, 2009). Este tipo de sarcoma se desarrolla de forma común en los huesos que conforman el tronco y en los huesos largos. En el esqueleto del tronco predomina en la pelvis, seguido por la escápula, columna vertebral, costillas y clavícula. De los huesos largos el sitio más común es el fémur, seguido por el húmero, tibia y huesos del antebrazo. Aproximadamente el 15% de los pacientes presentan tumores primarios en tejidos blandos (Iwamoto, 2007).

No existe evidencia de predisposición familiar o factores ambientales que provoquen el ESFT. Ciertos estudios han demostrado un incremento en el riesgo de contraer tipos de cáncer secundarios después de la terapia para ESFT, tales como leucemia mieloide aguda y osteosarcoma (Heymann, 2009).

El sarcoma de Ewing resulta de una translocación cromosómica que involucra al gen *EWS* y a un miembro de la familia de factores de transcripción ETS, principalmente *FLI-1*, dando lugar a la formación de una nueva oncoproteína de

fusión EWS/FLI-1 específica de las células tumorales. Esta oncoproteína desencadena un programa de iniciación de división en las células mesenquimales primarias. Los estudios indican que promueve al menos dos eventos que tienen relación con el desarrollo y progreso del tumor, y la proliferación y supervivencia celular. Esto se consigue por la inducción de otros genes candidatos como *PDGFC*, *IGFI*, *MYC*, *CCND-1* y *NKX2-2*, y también escapando de la apoptosis mediante la represión de *p21*, *p57*, *TGFGR11* y *IGFDPP3*. Mediante la citogenética convencional se encontró que el sarcoma de Ewing se caracteriza por la presencia de una de cinco translocaciones balanceadas con el gen *EWS* en la banda q12 del cromosoma 22, translocación que se fusiona con uno de los cinco miembros de la familia ETS (*FL1-1*, *ERG*, *ETV 1*, *EIA* y *FEV*) en los cromosomas 11, 21, 7, 17 y 2, respectivamente (Coppola, 2010).

EWS es una proteína de unión con ARN de función desconocida pero tiene un dominio de fuerte activación transcripcional (Bleyer & Barr, 2007). *EWS-FLI1*, que se transloca en (11;22)(q24;q12). Es la proteína de fusión más común y se asocia con el 85% de los casos de sarcoma de Ewing (Figura.1.1). Existen 18 variantes de transcriptos *EWS-FLI1*. Todas las translocaciones contienen el dominio *N*-terminal. El análisis de la estructura genómica de *EWS* demostró que el gen está compuesto por 17 exones distribuidos en 40 Kb. Los primeros 7 exones codifican polipéptidos repetitivos con una secuencia proteica consenso SYGQQS seguido por una región bisagra codificada por los exones del 8 al 10; mientras, el dominio de unión de RNA está codificado por los exones del 11 al 13. Por lo tanto, la proteína de fusión *EWS* está codificada por los exones del 1 al 7 y el dominio *FLI1* por el exón 9. Las dos

fusiones más comunes son EWS exón 7-FLI1exon 6, el cual es un transactivador menos potente y confiere un mejor pronóstico (tipo 1) y EWS exón 7-FLI 1 exón 5 (tipo 2) (Volgestein & Kinzler, 2002).

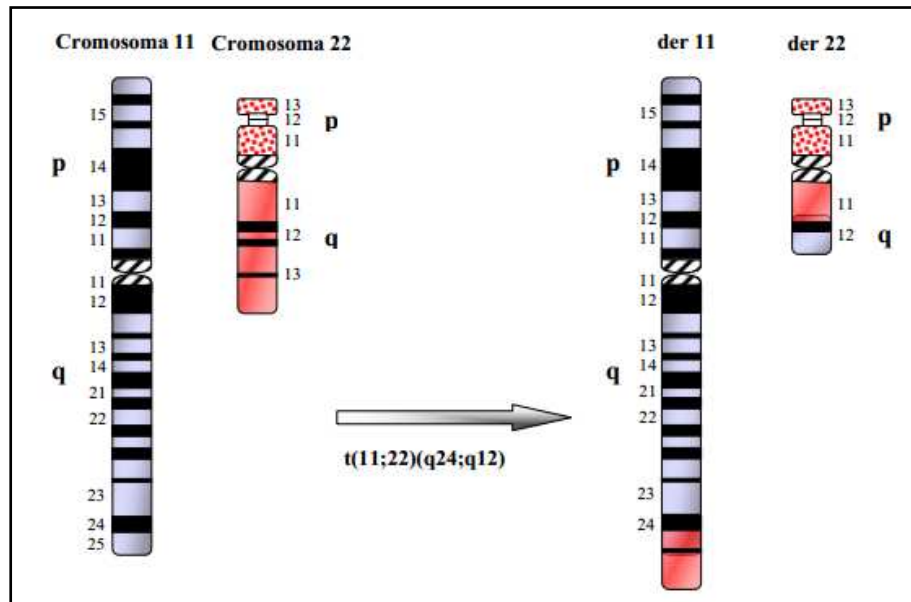


Figura 1.1. Translocación (11;22) que da lugar a la formación de la proteína de fusión (EWS-FLI1) a partir de los genes *EWS* y *FLI1* en el Sarcoma de Ewing. Tomado de: Mateo, 2007.

Los patrones proteicos de EWS-FLI1 fueron identificados como parte del empalmosoma y subsecuentemente están implicados como moduladores del *splicing*. Mediante purificación bioquímica y caracterización se reveló que EWS-FLI1 es una proteína desordenada y su desorden intrínseco es crítico para su actividad transcripcional caracterizándose por la falta de una estabilidad estructural (Erkizan *et al.*, 2010). Uno de los blancos de la proteína de fusión EWS-FLI1 es la telomerasa que se expresa con altos niveles en el sarcoma de Ewing (Coppola, 2010).

Al sarcoma de Ewing también se lo asocia con algunos cambios cromosómicos secundarios, con ganancias numéricas cromosómicas que incluyen la trisomía del cromosoma 8, translocaciones como t(1;16)(q12;q11.2) y mutaciones o deleciones en *p53* y *p16*, que se asocian con un pronóstico clínico pobre (Coppola, 2010).

La segunda translocación más común involucra al gen *EWS* del cromosoma 22 y el gen *ERG* del cromosoma 21, que también es un factor de transcripción de la familia ETS (Bleyer & Barr, 2007). Los efectos de este tipo de translocación parecen ser análogos al de la fusión EWS-FLI1, y también hay un espectro similar de variantes moleculares (Coleman & Tsongalis, 2002).

Una tercera variante involucra al gen *EWS* y el gen *ETV1* en el cromosoma 7 p 22 y la cuarta variante en t(17;22) (q21;q12) la cual se ha descrito que une al dominio de transactivación de *EWS* con el cuarto miembro de la familia EIA. El gen *ETV4* se conoce por activar la transcripción de los genes de la enzima metaloproteinasa que vinculan potencialmente a la proteína de fusión EWS-ETV4 con las propiedades invasivas del tumor (Volgestein & Kinzler, 2002).

1.4.3. Cáncer de mama- *HER 2/neu*

A nivel celular existe una diversidad de mecanismos moleculares que pueden funcionar como oncogénicos. Ciertos oncogenes codifican receptores mutados de factores de crecimiento que poseen actividad tirosina quinasa (TK, por sus siglas en

inglés). Estos receptores al activarse mediante ligandos dan lugar a una activación de las vías de señalización celular que llevan a proliferación descontrolada de las células tumorales (Quintela, 2005).

Existen dos mecanismos principales mediante los cuales estos genes participan en el origen del cáncer, entre los que se encuentran la amplificación y la sobreexpresión de los oncogenes y sus productos. Con este fin, se pueden amplificar pequeñas regiones en los brazos de los cromosomas o los cromosomas enteros.

Actualmente, las mutaciones que ocurren con mayor frecuencia durante la evolución del cáncer de mama han sido ya identificadas. Se han caracterizado un gran número de oncogenes, pero solo algunos tienen relación con la progresión de la enfermedad. Algunos genes que se utilizan como marcadores moleculares sirven como factor pronóstico de evolución y tratamiento del cáncer de mama, dentro de estos se destaca el gen *HER2/neu* (González *et al.*,2007). La amplificación de este oncogen se encuentra en un 30 % de los cánceres de mama humanos y se correlaciona con más incidencia a metástasis en los ganglios regionales, grado histológico más agresivo y presencia de estadios más avanzados (Quintela, 2005).

El oncogén *HER2/neu*, también conocido como *c-erbB2*, se encuentra localizado en el cromosoma 17q21.1 y codifica una proteína (p185HER2/neu) de 185 KD (Cuadros & Villegas, 2008). Además, pertenece a la familia de los receptores del factor de crecimiento epidérmico EGFR o ErbB que se caracterizan por su actividad tirosín quinasa. Esta familia de proteínas consiste en cuatro grupos de receptores,

entre los que se encuentran ErbB (HER-1), ErbB-3 (HER-3), ErbB-4 (HER-4) cada uno con afinidad por ligandos de activación específicos, y ErbB-2 (HER2/neu) que no necesita unión a ligandos para su activación y se caracteriza por presentar una gran homología con el receptor del factor de crecimiento epidermal (*EGFR* o *HER1*) (González *et al.*,2007).

La familia de los receptores EGFR se encuentra localizada en la membrana plasmática celular y está compuesta por un dominio extracelular(rico en cisteína) de unión al ligando que se une al receptor y lo activa, un segmento lipofílico transmembrana de anclaje y un dominio intracelular catalítico que constituye el segmento carboxiterminal con actividad TK (exceptoHER-3), susceptible de fosforilarse por degradación del ATP y de transmitir una señal hacia el interior de la célula a través de cascadas de señalización (González *et al.*,2007), como se muestra en la Figura 1.2. Esta familia de receptores está involucrada en la división y proliferación celular, principalmente en la comunicación célula-célula y célula-estroma, que se conoce como transducción de señal, en el que factores de crecimiento externos o ligandos afectan la transcripción de varios genes por fosforilación o desfosforilación.

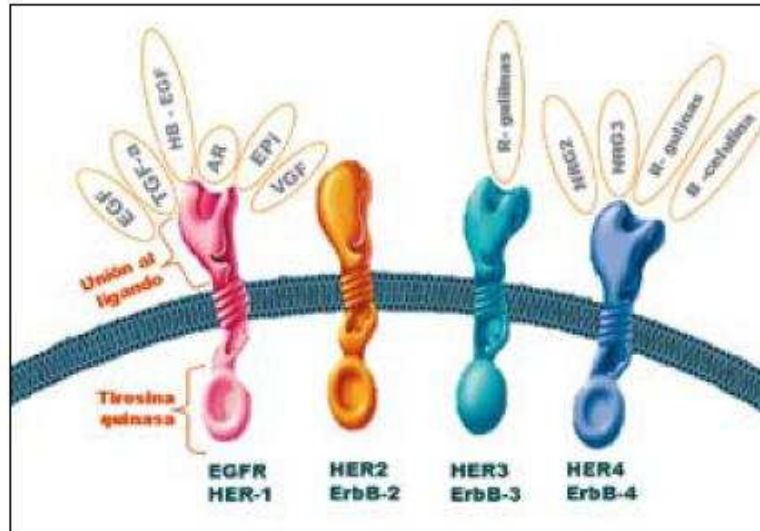


Figura 1.2. Estructura de la familia de receptores ErbB (factor de crecimiento epidérmico). Tomado de: González *et al*, 2007.

La activación del receptor requiere tres variables: un ligando, un receptor y un compañero dimerizado. Los receptores de la familia ErbB son activados por la dimerización que puede darse entre dos receptores idénticos (homodimerización) o entre diferentes miembros de la misma familia (heterodimerización).

Los mecanismos que provocan la dimerización son:

1. La unión al ligando (factor de crecimiento).
2. La sobreexpresión del receptor.
3. La transactivación por un receptor homólogo (heterodimerización).

Tras la dimerización se produce activación de la función tirosina-quinasa de la porción intracelular del receptor. Este es el suceso clave que inicia la cascada de

señales de transducción intracelulares estimuladoras de la actividad mitogénica, como Ras/Raf/MEK/MAPK o PI3K/Akt (González *et al.*, 2007).

La sobreexpresión del gen *HER2/neu* conduce a la activación del receptor HER2/neu por autofosforilación. Este estado activo se mantiene por el reclutamiento de Src y PI3K por parte del receptor. La proteína Src es una tirosina quinasa que tiene como función tomar un grupo fosfato de una molécula de ATP y fosforilar una o más proteínas diana sobre un resto tirosina causando cambios en las biomoléculas y de esta manera las actividades celulares son reguladas (CancerQuest, 2008). La enzima PI3K (Por sus siglas en inglés) fosfatidilinositol 3 quinasa, transmite señales en las células ayudando a controlar el crecimiento celular (Instituto Nacional del Cáncer, 2010). La activación de PI3K conduce a la activación de la vía proto-oncogénica de señalización Akt –mTOR a través de PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato). Por lo tanto, se desactiva el gen supresor PTEN dando lugar a un aumento de los niveles de PIP3 y una activación de PI3K (Nagata *et al.*, 2004), como se muestra en la Figura 1.3. La sobreexpresión del gen *HER2/neu* desempeña un papel en la progresión del tumor produciendo títulos elevados de crecimiento celular y transformación oncogénica (Quintela, 2005).

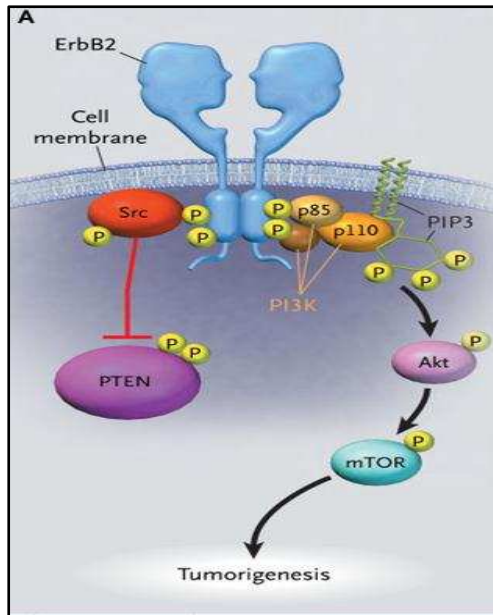


Figura 1.3. Mecanismo de amplificación del receptor HER2/neu mediante la ruta Akt –mTOR a través de PIP3 dando como resultado tumorigenesis. Modificado de: Nagata. Y *et al*, 2004.

En cada célula normal hay dos copias del gen *HER2* y, aproximadamente, 50.000 copias de moléculas de proteína en la superficie celular teniendo un papel importante en el crecimiento y el desarrollo de las células epiteliales de las glándulas mamarias. Por otro lado, en una célula tumoral se puede encontrar más de una copia del gen y más de 1 millón de copias de la proteína en la superficie celular favoreciendo la formación de heterodímeros de HER2 y convirtiendo a la célula en extremadamente sensible a factores de crecimiento (Cuadros & Villegas,2008).

HER 2 se encuentra amplificado en alrededor del 20 al 30% de los cánceres de mama, aunque la sobreexpresión puede darse sin amplificación génica en el 3 a 7% de los casos debido a una polisomía del cromosoma 17 (Cuadros & Villegas, 2008). En mujeres jóvenes son más frecuentes los cánceres de mama que

sobreexpresan el gen *HER2/neu* y tienden a ser tumores de alto grado de malignidad. El *HER2/neu* se sobreexpresa con mayor frecuencia en carcinoma ductal *in situ* con un fenotipo de tumor agresivo presentando características histológicas particulares, como son el alto grado nuclear, actividad mitótica aumentada (alta fracción de la fase S) y ausencia de receptores hormonales. *HER2/neu* es utilizado como blanco terapéutico al cual se le unen anticuerpos monoclonales específicos en el dominio extracelular del receptor, como el trastuzumab (González *et al*, 2007).

1.4.4. Linfoma de Burkitt

El linfoma de Burkitt (LB) es de tipo no-Hodking y comprende un grupo heterogéneo de neoplasias de células B altamente agresivas. Estas células B tienen un tamaño intermedio y se infiltran en tejidos nodales o extranodales con un patrón difuso. Sus marcadores de superficie son CD19, CD20, inmunoglobulina IgM, cadenas ligeras Ig κ ó Ig λ , así como también niveles intermedios de CD10. La tasa de división celular en el LB es una de las más altas entre los tumores humanos y se ve reflejado por la presencia de numerosas figuras mitóticas y una fracción elevada de células en crecimiento (Hecht & Aster, 2000).

Existen tres subtipos del LB. El primero se describe como forma endémica, y se encontró en África ecuatorial. Se presenta en sitios extranodales de adolescentes y adultos jóvenes. Se caracteriza por un tumor de células B infectadas con el virus de Epstein Barr (EBV). El segundo subtipo es de forma esporádica, que es morfológicamente idéntica con el linfoma de Burkitt. Este es más frecuente en los

Estados Unidos. El tercer subtipo es común en personas infectadas con VIH (Advani, 2010).

La supervivencia del centro germinal de células B depende de la expresión de un receptor Ig capaz de reconocer con una alta afinidad al antígeno. La habilidad para fabricar anticuerpos de alta afinidad requiere de una hipermutación somática, en la cual el centro germinal de las células B adquiere mutaciones a alta velocidad en regiones de genes *Ig* que codifican residuos de unión al antígeno. Ambas cadenas de Ig (Ig κ y Ig λ) en los tres subtipos de LB han sufrido una hipermutación somática (Hecht & Aster, 2000).

El linfoma de Burkitt se asocia con translocaciones cromosómicas que desregulan la expresión de *C-MYC*, un gen que codifica un factor de transcripción básico de estructura hélice-asa-hélice (HLH, por sus siglas inglés), localizado en el cromosoma 8q24. Este codifica una proteína de 64 KD. *C-MYC* es el homólogo celular del oncogén *V-MYC*. La expresión alterada de *C-MYC* ocurre en una variedad de cánceres humanos incluyendo cáncer de pulmón y de mama. *MYC* es rápidamente inducido por una variedad de estímulos mitogénicos, que no requieren de expresión génica o síntesis proteica (Coppola, 2010). *C-MYC* normalmente tiene un rol central en la regulación transcripcional de un set de genes que controlan diferentes procesos celulares, incluyendo la progresión del ciclo celular y la muerte celular programada (Hecht & Aster, 2000).

Las translocaciones cromosómicas características de LB siempre resultan por la yuxtaposición de las secuencias de ADN que codifican para *C-MYC* con las secuencias de los genes *Ig* denominados *enhancers*. Estos se unen a factores específicos de transcripción de células B capaces de activar la transcripción desde genes que están localizados a 500 000 pb de distancia (Hecht & Aster, 2000).

Debido a que los elementos *enhancer Ig* son activos específicamente en células B maduras, su yuxtaposición con *C-MYC* en las células B, maneja altos niveles de ARN *C-MYC* y expresión proteica. Por lo tanto, las secuencias reguladoras negativas que se encuentran dentro de *C-MYC* son removidas como consecuencia directa de una translocación cromosómica o son mutadas a través de otros mecanismos contribuyendo al incremento de la actividad de *C-MYC* (Hecht & Aster, 2000).

En el 80% de los casos de LB, el patrón de translocación para *C-MYC* es el locus *IgH*, dando lugar a la formación de una translocación t(8;14) (q24;q32). En el 15% de casos, el patrón de translocación es el locus κ en el cromosoma 2p11, y el 5% restante, involucra al locus λ en el cromosoma 22q11 como se muestra en la Figura 1.4 (Gang&Schulz, 2007),

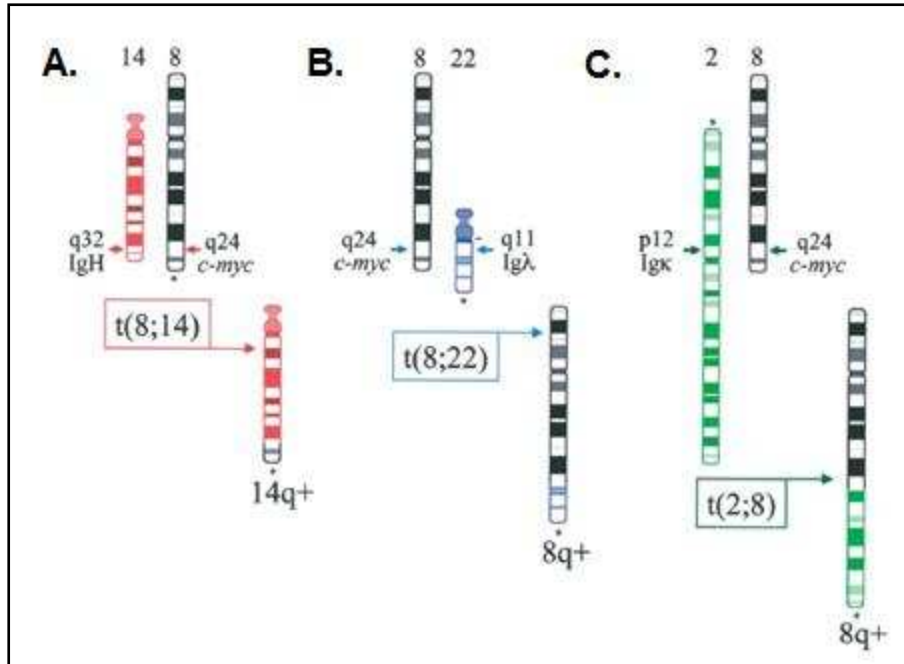


Figura 1.4. Translocaciones de *C-MYC* en el Linfoma de Burkitt. A. Translocación clásica t(8;14). B. Translocación t(8;22) y C. Translocación t(2;8). Tomado de: Hecht & Aster, 2000.

En los tumores con la translocación t(8;14), el gen *C-MYC* se localiza en el cromosoma 8 y el gen *IgH* en el cromosoma 14 (Hecht & Aster, 2000).

En el subtipo LB endémico, el punto de ruptura (sitio específico en una secuencia de ADN donde se va a producir una anomalía cromosómica estructural) (Barbouti *et al*, 2004) ocurre en el cromosoma 8 en dirección 5' al exón 1 de *C-MYC*. En el cromosoma 14, los puntos de ruptura ocurren en las regiones de unión *IgH*.

En LB esporádico y asociado a VIH, los puntos de ruptura tienden a caer entre los exones 1 y 2 de *C-MYC* en el cromosoma 8 y en la región de intercambio *IgH* en el cromosoma 14. En los dos tipos de translocaciones restantes, el locus *C-MYC* se

une al locus *Ig κ* en el cromosoma 2 t(2;8) (p12;q24) o al locus *Ig λ* en el cromosoma 22 t(8;22)(q24;q11). Los puntos de ruptura en los cromosomas 2 y 22 ocurren en el extremo 5' de las regiones constantes de los genes κ y λ , respectivamente (Gang & Schulz, 2007).

Eventos genéticos adicionales pueden ocurrir en LB y comúnmente involucran la ruta *CDKN2A-MDM2-p53*, importante en la regulación del ciclo celular y la familia de proteínas anti-apoptóticas BCL2 a través de *BIM* (gen activador de la muerte celular que pertenece a la familia BCL2) (Matsui *et al*, 2005), que se une e inactiva a BCL2. Las mutaciones en *TP53*, ocurren en un 30%, mientras que la inactivación de *CDKN2A* y la sobreexpresión de *MDM2* (gen regulador negativo del gen supresor tumoral *p53*) son menos comunes pero representan mecanismos alternativos para inhibir *p53*. *CDKN2A* produce varias proteínas incluyendo p16INKMa y p14ARF a través de *splicing* alternativo. *MDM2* bloquea el dominio de transactivación y transporta a *p53* al citoplasma para su degradación, mientras que p14ARF inhibe *MDM2* (Crisan, 2010).

1.4.5. Neuroblastoma

El neuroblastoma es el segundo tumor sólido pediátrico más frecuente en niños menores a 1 año de edad. Este se deriva de las células de la cresta neural y surge en la médula adrenal o en los ganglios paraespinales simpáticos. Además, comprende del 8 al 10% de todas las neoplasias pediátricas. Según la clasificación histológica es un miembro de la familia de células tumorales pequeñas, redondas y

azules. Dentro de los tumores neuroblásticos se incluyen neuroblastomas, ganglioneuroblastomas y ganglioneuromas. Estos tumores se clasifican como favorables y no favorables dependiendo del grado de diferenciación neuroblástica (Carroll & Finlay, 2010) y se caracterizan por ser agresivos, quimioresistentes y generalmente incurables (Bown, 2001).

La mayoría de los niños con estadiaje de la enfermedad 1 y 2 pueden curarse solamente con cirugía. Los niños mayores de 1 año de edad con estadio avanzado mueren por enfermedad progresiva. Esta diversidad clínica se correlaciona con factores clínicos y biológicos incluyendo la etapa del tumor, edad del paciente, histología del tumor, índice de ADN y anormalidades genéticas (Weinstein *et al.*, 2003). Las anormalidades genéticas más comunes asociadas con este tipo de tumor incluyen delección en el brazo corto de cromosoma 1 (LOH), ganancia en el brazo largo del cromosoma 17 y amplificación del gen *N-MYC* (Bown, 2001).

Los estudios citogenéticos han mostrado que la translocación desbalanceada der(1)t(1p;17q), es una característica repetitiva en las líneas celulares de tumores primarios del neuroblastoma. Deleciones en el brazo corto del cromosoma 3 y en el brazo largo del cromosoma 11, se han definido como marcadores de pronóstico pobre de esta enfermedad (Jeison *et al.*, 2010).

La ploidía de ADN es un importante discriminador de la respuesta a la quimioterapia. La triploidia se observa en tumores de bajo estadiaje y se asocia con

una mayor tasa de supervivencia; mientras, una diploidia se asocia con una falla temprana en el tratamiento (Halperin *et al.*, 2010).

N-MYC es un proto-oncogen de la familia de factores de transcripción MYC que se encuentra en el cromosoma 2 (2p24). Dos copias del gen se presentan normalmente en cada célula. Se considera amplificado cuando hay más de 10 copias por célula; sin embargo, su amplificación puede resultar en 50 hasta 400 copias del gen por célula (Tomlinson & Kline, 2009). También, se lo encuentra como cuerpos de cromatina extracromosomal denominados *doble minute* (dmins), que se observan en aproximadamente 30% de los neuroblastomas primarios y regiones homogéneamente teñidas (HSR) como se muestra en la Figura 1.5 (Halperin *et al.*, 2010).

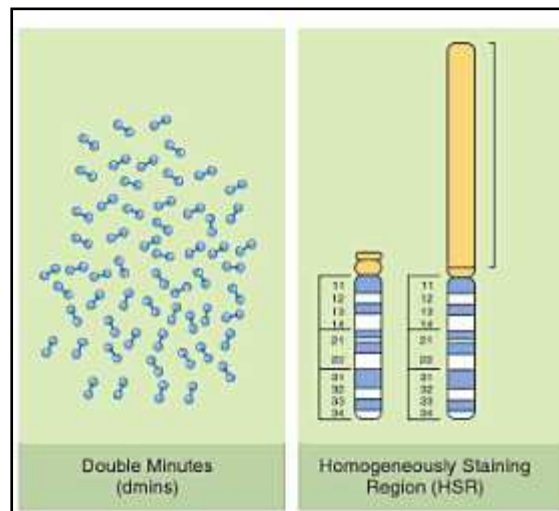


Figura 1.5. El gen *N-MYC* representado por cuerpos de cromatina llamados *double minutes* (derecha). Gen *N-MYC* representado como regiones homogéneamente teñidas (HSR) (izquierda). Modificado de: Halperin *et al.*, 2010.

La amplificación de *N-MYC* ocurre en aproximadamente el 20% de neuroblastomas primarios y se asocia fuertemente con la presencia de metástasis y pronóstico pobre. Contribuye a un comportamiento clínico agresivo en tumores de alto riesgo. La amplificación de *N-MYC* se observa en un 30-40% de pacientes con estadio avanzado.

El estado de *N-MYC* es una propiedad biológica inherente de las células tumorales del neuroblastoma y no cambia durante el tratamiento como señal de quimioresistencia (Carroll & Finlay, 2010).

La familia de las TK está compuesta por mediadores críticos en la señalización de las neutropinas y tiene un rol esencial en el desarrollo neuronal. La expresión diferencial de los receptores de neutropina se asocia con las características clínicas y biológicas del neuroblastoma. La expresión de *trkA* está inversamente relacionado a con el estadiaje de la enfermedad y la amplificación de *N-MYC*; mientras, *trkB* se expresa en tumores con estadio avanzado (Weinstein *et al.*, 2003).

1.4.6. Linfoma anaplásico de células grandes

El linfoma anaplásico de células grandes es una malignidad de células tipo T anaplásicas grandes pleomórficas CD 30+. Por lo general, estas expresan ALK (quinasa de linfoma anaplásico) y proteínas citotóxicas. Estas células tumorales tienen tendencia a crecer de manera cohesiva en los nódulos linfáticos (Naeim *et al.*, 2008).

Estas células tumorales poseen un citoplasma abundante que muestra numerosas vacuolas. La variante de células pequeñas se caracteriza por una mezcla de células linfoides pequeñas, medianas y grandes. Los núcleos de las células medianas y pequeñas son irregulares (Stein *et al*, 2000). Este tipo de linfomas constituyen la cuarta parte de los linfomas no Hodgkin que se desarrollan en niños y adolescentes (Volgstein & Kinzler, 2002). Estos tumores tienen, por lo general, un buen pronóstico y se asocian a una translocación cromosómica específica t(2;5)(p23;q35) que involucra al gen *ALK* (2p23); el cual codifica una tirosina quinasa que no se expresa en células linfoides normales. Esta anomalía ha mostrado ser oncogénica *in vivo* e *in vitro* (Greenland *et al*, 2001).

El gen *NPM* localizado en la región 5q35 se fusiona con el gen que codifica la quinasa del linfoma anaplásico (*ALK*) en la región 2p23. El tipo salvaje de *NPM* ha sido identificado como una fosfoproteína de 37 KD asociada con los núcleos. Por otro lado, el tipo salvaje de la proteína *ALK* es un receptor transmembrana de 200 KD. La cola intracelular de la molécula *ALK* posee el dominio catalítico tirosina quinasa que se activa como resultado de la homodimerización. La translocación t(2;5) yuxtapone la porción del gen *NPM* que codifica el dominio *N*-terminal de *NPM* (aminoácidos 1-117) a la parte del gen *ALK* que codifica para toda la región citoplasmática de la proteína *ALK*. Como consecuencia, el gen *ALK* está bajo control del promotor de *NPM* el cual induce a una permanente transcripción del gen híbrido *NPM-ALK*, que codifica a una proteína quimérica de 80 KD. El dominio *C*-terminal de *NPM* tiene señales de localización nucleares y las regiones extracelulares y transmembrana de

ALK se encuentran ausentes. La proteína NPM-ALK puede formar homodímeros o heterodímeros (Figura. 1.6) (Stein *et al*, 2000).

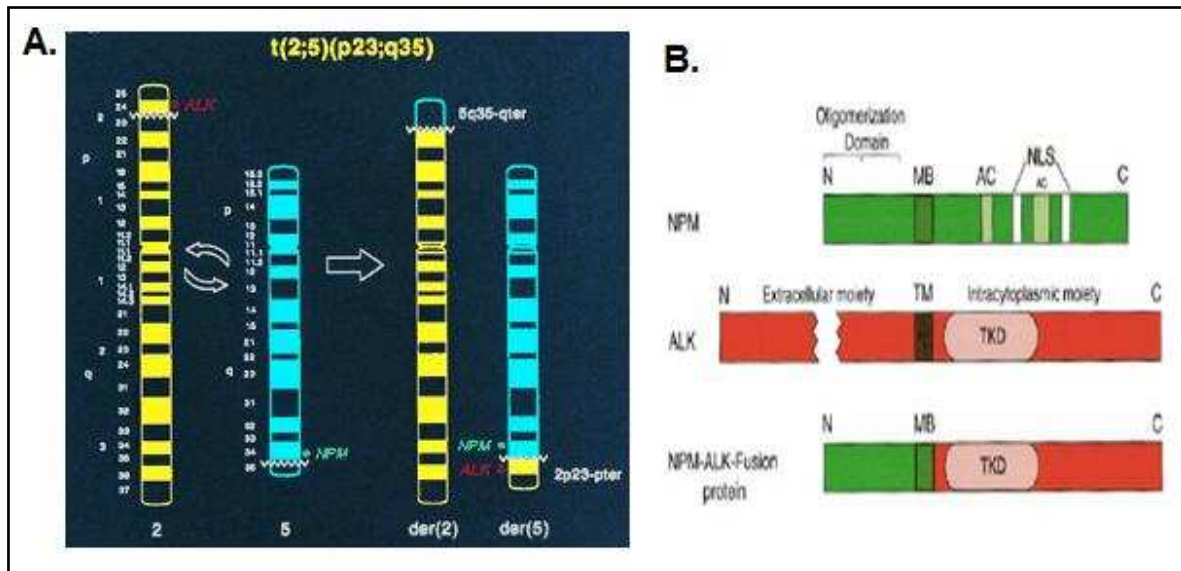


Figura 1.6. A. Se observa la translocación $t(2;5)$ a nivel cromosómico (Mathew *et al*,1997) B. Formación de la proteína de fusión NPM-ALK a partir de los genes *NPM* y *ALK* en el linfoma anaplásico de células grandes. Tomado de: Stein *et al*, 2000.

En las translocaciones $t(2;5)(p23;q35)$ y $t(1;2)(q25;p23)$, las proteínas son aptas para dimerizar e inducir autofosforilación del dominio tirosina quinasa de ALK el cual se activa en el citoplasma de las células tumorales (Greenland *et al*, 2001). Sin embargo, se reconoce que los pacientes con ALK positivo suelen ser menores de 40 años, de sexo masculino y en ellos la enfermedad puede manifestarse en un sitio extranodal. Estos pacientes poseen un pronóstico favorable comparado con pacientes de otros tipos de linfomas de células T incluyendo *ALK* negativo (Medeiros & Elenitoba-Johnson, 2007). La fuerte asociación de los linfomas anaplásicos con

t(2;5)(p23;q35) sugiere que esta translocación cromosómica participa en la patogénesis de esta enfermedad (Naeim *et al*, 2008).

Además de la clásica translocación t(2;5), se ha demostrado que ALK es activada a través de varios rearrreglos cromosómicos incluyendo la t(1;2)(q25;p23) y la inv(2)(p23;q15) (Volgestein & Kinzler, 2002).

La t (1;2)(q25;p23) se encuentra en el 15% de los casos. Esta produce una proteína de fusión de ALK con tropomiosina 3. Debido a que esta no tiene una señal de localización nuclear, su tinción es exclusivamente citoplasmática.

El 5% de los casos corresponden a la inversión del cromosoma 2 inv(2)(p23;q15) que resulta de la fusión de la proteína ALK y ATIC-2, una enzima involucrada en la síntesis de purinas (Kirkham & Sheperd, 2007).

1.4.7. Técnica de FISH

“La técnica de FISH (hibridación *in situ* con fluorescencia) es un método híbrido entre la citogenética y la biología molecular desarrollada en los años 80 basada en las técnicas de hibridación *in situ*. Consiste en la detección de secuencias concretas de ácidos nucleicos (ADN o ARN) mediante el empleo de sondas específicas marcadas radioactivamente o con sustancias no radioactivas, como en el caso de FISH, en la que se sustituye isótopos radioactivos por un fluorocromo” (Tojo, 2009).

Se basa en la hibridación de una sonda de ADN marcada con una sustancia fluorescente sobre su secuencia complementaria en el genoma, tanto en la metafase cromosómica o en el núcleo en interfase (Calasanz, 2001). La alta sensibilidad y especificidad de la técnica FISH y la rapidez de los ensayos han hecho de esta técnica una importante estrategia diagnóstica con numerosas aplicaciones. Entre las técnicas derivadas de FISH convencional, las más importantes son la hibridación genómica comparada (CGH) de enorme utilidad en tumores sólidos y el cariotipo multicolor (SKY-FISH y M-FISH) (Tojo, 2009).

Los dos componentes principales de la técnica de FISH convencional son la sonda de ADN marcada con fluorescencia y la secuencia diana en la muestra tumoral para la cual es específica. Cabe recalcar que no es una técnica de búsqueda de nuevas alteraciones cromosómicas, sino que detecta únicamente aquello que se está buscando mientras que el resto del genoma permanece oculto (Tojo, 2009).

FISH es una técnica que permite trabajar en tejido fresco, muestras congeladas, muestras destinadas al análisis citológico o tejidos parafinados, debido a que la molécula de ADN es muy estable. En teoría cualquier célula con núcleo puede ser examinada mediante esta técnica, lo que hace que sea muy útil en estudios retrospectivos de tumores sólidos (Blancato & Haddad, 2000). Esta técnica es rápida y con ella pueden ser analizadas un gran número de células en poco tiempo (Tojo, 2009). La factibilidad de aplicar FISH en tejidos fijados ha permitido el estudio de una variedad de enfermedades que no poseen una previa información citogenética (Blancato & Haddad, 2000).

Al principio se utilizó FISH sólo como una herramienta en investigación, pero el desarrollo de sondas estandarizadas marcadas con fluorocromos y los nuevos sistemas de visualización han hecho de FISH una herramienta válida y útil para el diagnóstico (Tojo, 2009). Dentro de las aplicaciones de FISH se incluyen la detección de aneuploidías, análisis de traslocación y puntos de ruptura estructurales, detección de microdeleciones y mapeo genético (Blancato & Haddad, 2000). La determinación de anomalías recurrentes y rearrreglos consistentes es importante en el estudio de la progresión de un tumor y proveen la información sobre el diagnóstico y pronóstico del mismo. La descripción de los eventos en la progresión del tumor involucra la delección de los genes supresores de tumores y una amplificación específica de los oncogenes.

En esta técnica se estudia al ADN en la célula o en el cromosoma, mas no se lo extrae. Durante el proceso, el ADN es fijado con fijador Carnoy's (3:1 metanol y ácido acético). Luego, el espécimen es tratado con calor y formamida para denaturar la doble cadena. Después de dicho proceso, el ADN blanco está apto para unirse a la sonda de secuencia complementaria. Estas sondas marcadas con fluoróforos se hibridan basadas en la complementariedad de las bases. Por último, se visualiza la sonda hibridada con el ADN diana en un microscopio de fluorescencia (Blancato & Haddad, 2000).

La fluorescencia tiene la ventaja de proveer detección dual o múltiple a través del uso de diferentes fluoróforos en el mismo experimento. La intensidad de la señal

con fluorescencia es mucho mejor que las tinciones inmunohistoquímicas (Blancato &Haddad, 2000).

La clave del éxito de FISH está en usar un protocolo eficiente que exponga el blanco de los genes y permita la penetración de la sonda, pero que mantenga la morfología y la estabilidad de la célula.

1.4.7.1. Principales etapas de la técnica de FISH

1.4.7.1.1. Pretratamiento de las placas

Se realiza este proceso con tres propósitos: remover el ARN y proteínas que podrían unirse a la sonda, permitir el acceso de las sondas al ADN permeabilizando el material blanco y fijar la preparación para que los cromosomas y los núcleos no se pierdan de la placa durante el procedimiento (Schwarzacher *et al.*, 2000).

1.4.7.1.2. Denaturación e hibridación

Para permitir que la hibridación de la sonda de ADN marcada, el ADN blanco en la placa debe ser denaturado para convertirlo en ADN de cadena simple. Altas temperaturas y concentraciones de formamida se utilizan para la denaturación. Para poder saber que una denaturación fue exitosa, hay que evaluar la morfología cromosómica y la señal de hibridación *in situ* (Schwarzacher *et al.*, 2000).

1.4.7.1.3. Lavados post-hibridación

Los lavados post-hibridación remueven la sonda que no se ha hibridado y las mezclas utilizadas para la hibridación. Es crítico que las temperaturas se controlen en este proceso, ya que al incrementar unos pocos grados por solamente unos segundos se puede remover la mayor parte de la sonda. Por lo tanto, la temperatura no debe exceder de los 60°C para evitar la pérdida de material celular (Schwarzacher *et al.*, 2000).

1.4.7.1.4. Contraintinción y visualización del ADN

El ADN es teñido usualmente con fluorocromos que pueden ser visualizados por separado o juntos con la señal de hibridación *in situ* para dar un contraste con color. Uno de los más utilizados para la contraintinción es el DAPI (4'-6-diamino-2-fenilindol), el cual va a tener una fluorescencia azul bajo la excitación del UV. Este es excelente para teñir el ADN lo que permite mostrar patrones de bandas característicos para la identificación de cromosomas y no interfiere con la excitación y detección de las señales de hibridación rojas y verdes (Schwarzacher *et al.*, 2000).

Una parte importante de la técnica FISH es la visualización de los resultados con un microscopio de fluorescencia y la utilización de una cámara automática. Un óptimo funcionamiento del microscopio se requiere para el análisis. Existen dos tipos de microscopios de fluorescencia, que difieren en la forma en que la luz está en contacto con la muestra. Además, es necesaria una lámpara de mercurio de alta

presión para la detección de la fluorescencia. También el microscopio debe estar equipado con filtros óptimos que permitan detectar ciertas longitudes de onda de luz. Los filtros son diseñados para cada uno de los fluoróforos (Blancato &Haddad, 2000).

1.4.7.2. Sondas

La sonda reconoce y se une a la secuencia complementaria de ADN. Se dispone de sondas específicas para cromosomas individuales y para regiones cromosómicas que permiten identificar rearrreglos particulares, es decir de tipo estructural, u obtener un diagnóstico de tipo numérico al existir un número anormal de cromosomas (Tojo, 2009).

Las sondas directas son aquellas que pueden estar marcadas directamente con fluorocromos que no necesitan anticuerpos para su detección; mientras, las sondas indirectas tienen moléculas marcadoras que necesitan de anticuerpos para su detección (Tojo, 2009). Para el estudio de las neoplasias se emplean sondas sintéticas PNA que según a la región a la que se unan se distinguen de la siguiente manera:

- Sondas centroméricas
- Sondas de pintado cromosómico
- Sondas teloméricas
- Sondas de locus específico

- Sondas de fusión
- Sondas dual color dual fusión
- Sondas de separación o split

1.4.7.2.1. Sondas centroméricas

Están formadas por secuencias repetitivas de ADN e hibridan en la región centromérica del cromosoma (Tojo, 2009). Tienen 171 pares de bases de ADN monomérico, el cual se repite N veces. Este bloque de ADN repetitivo es luego copiado N -veces en un alto orden repetitivo en el centrómero de cada cromosoma. La mayor parte de este ADN es idéntico en todos los cromosomas humanos, pero del 2 al 3% del ADN es variable (Blancato & Haddad, 2000). Estas sondas permiten detectar alteraciones cromosómicas de tipo numérico y valorar la ausencia o presencia de alteraciones numéricas (monosomías, trisomías), tanto de metafases como de interfases sin la necesidad de tener células en división (Figura 1.7) (Tojo, 2009).

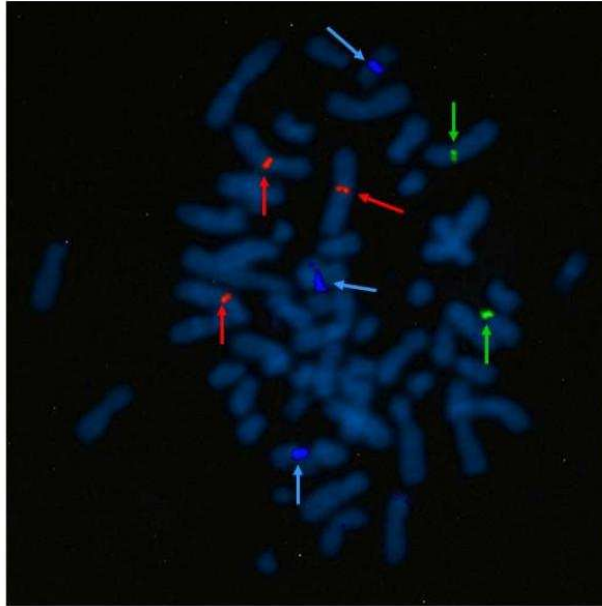


Figura 1.7. Sonda centromérica en una metafase. Señales centroméricas rojas marcan el cromosoma 3, señales verdes son del cromosoma 7 y las señales azules son del cromosoma 17. Tomado de: Nishio *et al*, 2010.

1.4.7.2.2. Sondas de pintado cromosómico

Están formadas por una batería de sondas que en su conjunto hibridan con todo el cromosoma (Tojo, 2009). Estas permiten visualizar alteraciones citogenéticas tanto numéricas como estructurales, pero sólo lo hacen en metafases debido a que la cromatina se encuentra condensada. (Blancato & Haddad, 2000). Además confirman de forma inequívoca cariotipos con translocaciones complejas o con cromosomas marcadores, como se muestra en la Figura 1.8 (Tojo, 2009).

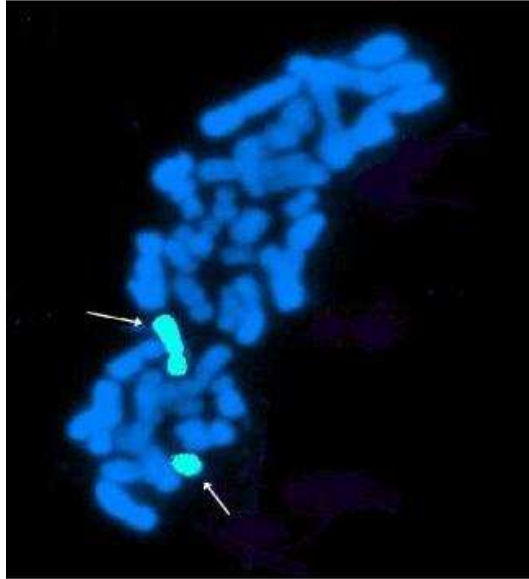


Figura 1.8. Sonda de pintado cromosómico en una metafase para el cromosoma X de color verde.

Tomado de: Mohamed *et al*, 2009.

1.4.7.2.3. Sondas Teloméricas

Las sondas teloméricas son de gran utilidad para la detección de pequeñas translocaciones recíprocas que ocurriesen cerca del final del cromosoma (Dunham *et al.*, 2000 citado por Oleas.G., 2008), para estudiar translocaciones crípticas y mapeo de genes (Figura 1.9.) (Blancato& Haddad, 2000).

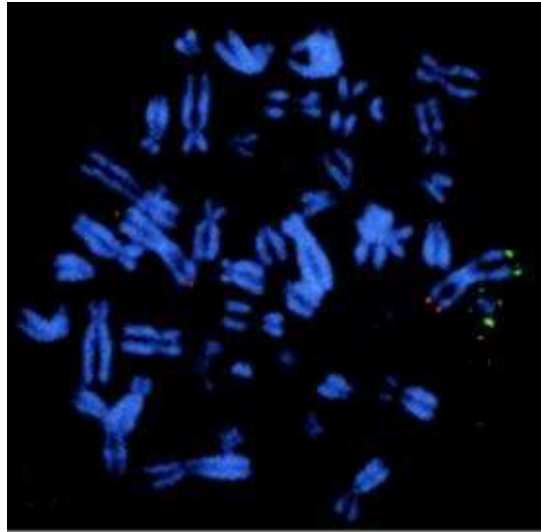


Figura 1.9. Sonda subtelomérica para el cromosoma 3, donde el brazo largo 3 está marcado con color rojo y el brazo corto 3 está de color verde. Tomado de: Cockwell *et al*, 2000.

1.4.7.2.4. Sondas de locus específico

Las sondas de *locus* específico, también llamadas sondas de secuencia única, hibridan con el ADN de una región genómica concreta correspondiente a un gen o una banda cromosómica. Estas son muy útiles para detectar alteraciones cromosómicas difíciles de identificar en las técnicas de bandeo convencional, como microdeleciones (Tojo, 2009).

Los rearrreglos cromosómicos identificados por las sondas de *locus* específico son la amplificación de un gen en el cromosoma y la translocación. En la amplificación de un gen, las secuencias del *locus* específico hibridan a genes que cuando se amplifican proveen información sobre el diagnóstico y pronóstico de

cánceres específicos. Estas amplificaciones tiene la forma de regiones homogéneamente teñidas que son expresiones citológicas de genes amplificados en tumores. Los genes que se analizan comúnmente por amplificaciones incluyen el gen *HER-2/neu* que indica un pronóstico de cáncer de mama, el gen *N-MYC* que se amplifica en neuroblastoma y el gen *C-MYC* que se amplifica en algunos casos en cáncer de ovario, esto tanto para tejido fresco como para tejido embebido en parafina (Blancato& Haddad, 2000).

Por otro lado para el análisis de translocación por FISH, se utilizan sondas duales de *locus* específico. Los dos genes involucrados en la translocación, localizados en diferentes cromosomas pueden ser fácilmente visualizados en metafase y núcleos. La importancia de FISH radica en que se puede realizar la detección en núcleos en interfase permitiendo que una mayor cantidad de células puedan ser evaluadas. Este tipo de estudio se realiza para observar la translocación (8;14) que es la más común en el linfoma de Burkitt (Figura 1.10) (Blancato& Haddad, 2000).



Figura 1.10. Sonda de locus específico en interfase para el locus 11q23 marcado por la señal color verde y el color naranja. Tomado de: SOLCA, 2011.

1.4.7.2.5. Sondas de fusión

Las sondas de fusión se basan en una sonda específica para cada uno de los *loci* involucrados en la translocación, de tal manera que presentan dos fluorocromos, uno llamado *Spectrum Orange* que tiene un espectro de absorción de 559-560nm y el otro es *Spectrum Green* con un espectro de absorción a 497-509nm. La presencia de la translocación va a producir una yuxtaposición de señales (roja y verde juntas o de coloración amarilla), como se observa en la Figura 1.11 (Tojo, 2009).

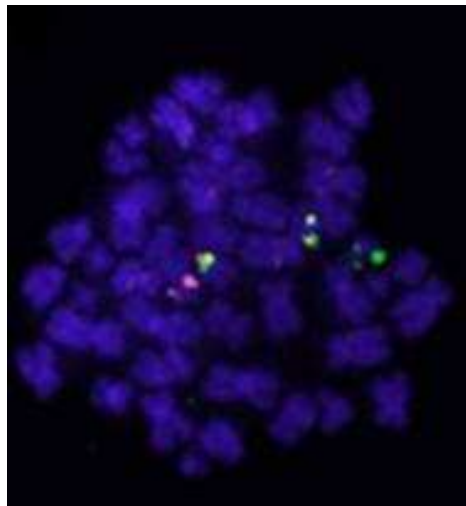


Figura 1.11. Sonda de fusión en una metafase para la t(8;21), donde se observa una señal roja que marca el cromosoma 8, una señal verde que marca el cromosoma 21 y una señal de fusión que indica que dicha translocación es positiva. Tomado de: SOLCA, 2011.

1.4.7.2.6. Sondas *dual color dual* fusión

Se trata de una combinación de dos sondas para los dos genes implicados en la translocación, cada una de ellos marcados con un fluorocromo distinto y diseñado de tal manera que ambos se extienden a ambos lados del punto de ruptura, así se observará en color rojo un par cromosómico y en color verde otro par distinto. Si la célula tiene un patrón normal, con estas sondas se verán dos señales rojas y dos señales verdes. Si existe una anomalía, aparecerán señales de fusión (Figura 1.12) (Tojo, 2009).

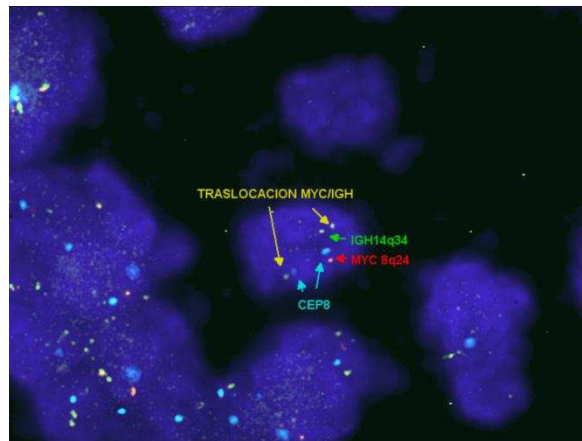


Figura 1.12. Sonda *dual color dual* fusión para t(8;14) en núcleos. La señal roja marca el cromosoma 8 y la señal verde el cromosoma 14, la señal celeste marca el centrómero del cromosoma 8. Las dos señales de color amarillo muestran que es positivo para la t(8;14) Tomado de: SOLCA, 2011.

1.4.7.2.7. Sondas de separación o split

Estas sondas han sido diseñadas para la detección de translocaciones de *loci* que pueden reordenarse con diversos cromosomas. Van dirigidas contra regiones que flanquean el punto de ruptura de manera que una de ellas se extiende desde el punto de ruptura hacia el centrómero y la otra desde el punto de ruptura hacia el telómero de un mismo gen. Por lo tanto, en el patrón de normalidad se ven dos señales yuxtapuestas. Si existe una translocación se observarán dos señales naranja y dos señales verdes separadas (Figura.1.13) (Tojo, 2009).

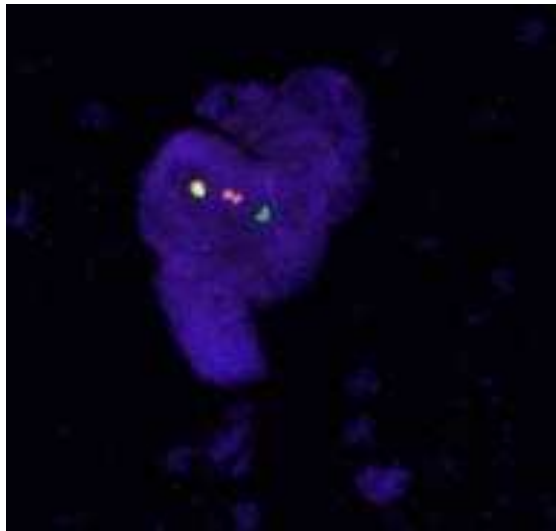


Figura 1.13. Sondas de separación o split, para la región 22q12 en núcleos. Se observa una señal roja y una verde separadas y una señal amarilla se fusión, lo que indica que es positivo para translocación t(11;22). Tomado de: SOLCA, 2011.

1.5. Sistema de hipótesis o pregunta de investigación

La Técnica de FISH permite la identificación de rearrreglos cromosómicos asociados con tumores sólidos en muestras de tejidos embebidos en parafina y de tejidos en congelación.

CAPITULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Participantes

El presente proyecto fue financiado por el Hospital Solón Espinosa Ayala (SOLCA), con el objetivo de aportar al desarrollo científico en el área de diagnóstico de tumores sólidos. El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética del hospital, bajo la dirección de la Dra. Ligia Ocampo y la Lcda. Catherine Carrera.

Se contó con la colaboración del Laboratorio de Patología del Hospital Solón Espinosa Ayala (SOLCA), el cual proveyó los cortes de tumores sólidos parafinados y en congelación.

2.2. Zona de estudio

El proyecto se desarrolló en el Laboratorio de Genética Humana, del Hospital Oncológico Solón Espinosa Ayala (SOLCA), ubicado en el cantón Quito, provincia de Pichincha.

2.3. Período de tiempo de investigación

La investigación se realizó entre marzo del 2011 y enero del 2012, es decir en un periodo de tiempo de 10 meses.

2.4. Diseño

En este proyecto se analizaron un total de 20 muestras de tumores sólidos mediante la técnica de FISH recolectadas durante el periodo marzo 2011 hasta enero 2012. El resultado final en cada caso fue presencia o ausencia de los rearrreglos cromosómicos en estudio.

Con los resultados obtenidos se realizó un análisis descriptivo de datos y una comparación con los resultados previamente obtenidos con la técnica histopatológica, elaborando una tabla de contingencia en donde se enfrentan los resultados de histopatología vs FISH para poder calcular la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, índice de Youden, análisis de la curva de ROC (Curva de Características Operacionales del Receptor) de la técnica de FISH en relación a la otra técnica. Además, se desarrollaron las pruebas estadísticas *Chi* cuadrado de independencia, la prueba de McNemar y para determinar la concordancia entre ambas pruebas se calculó el índice de Kappa.

2.5. Procedimientos

Los protocolos utilizados en el presente trabajo fueron proporcionados por el Laboratorio de Genética del Hospital Solón Espinosa Ayala (SOLCA), los cuales se describen a continuación.

2.5.1. Tejidos embebidos en parafina

2.5.1.1. Obtención de los cortes de tejidos parafinados

Las muestras utilizadas en este estudio se obtuvieron con un pedido previo al Laboratorio de Patología de SOLCA núcleo Quito. El corte de la muestra provista por este laboratorio estaba parafinada en una placa silinizada.

2.5.1.2. Desparafinización de las placas

Se realizó la desparafinización utilizando el reactivo Hemo-De[®], permitiendo de esta manera la eliminación de la parafina de la muestra. El procedimiento se detalla a continuación:

1. Se colocaron las placas en Hemo-De[®] durante 15 minutos.
2. Nuevamente se colocaron en Hemo-De[®] por 10 minutos.

3. Se colocaron las placas en etanol 100% para realizar la deshidratación respectiva durante 5 minutos a temperatura ambiente y nuevamente se colocaron las placas en etanol 100% por 5 minutos.
4. Se dejaron secar las placas.

2.5.1.3. Pretratamiento de placas utilizando el kit Vysis[®] de pretratamiento de parafinas

Para permitir el acceso de la sonda al ADN blanco, se realizó el pretratamiento utilizando ácido clorhídrico a una concentración establecida por el protocolo de Abbott Molecular,inc, 2000(Abbott Molecular,inc, 2000) y la solución de pretratamiento, como se describe a continuación:

1. Se colocaron las placas en HCl 0.2N durante 20 minutos y a continuación en agua destilada por 3 minutos.
2. Se colocaron las placas en *buffer* de lavado durante 3 minutos y se las sumergió en solución de pretratamiento durante 30 minutos a una temperatura de 80°C.
3. Nuevamente se colocaron las placas en agua purificada (ultrapura) por 1 minuto, luego en *buffer* de lavado dos veces por 5 minutos cada una.
4. Se eliminó el residuo de *buffer* de lavado y se colocaron las placas por 10 o más minutos en solución de proteasa (25mg proteasa más 1 vial *buffer* de

proteasa) a 37°C y se lavaron dos veces por cinco minutos en *buffer* de lavado cada una.

5. Se secaron las placas completamente.

2.5.1.4. Fijación de la muestra

Para la fijación de la muestra se utilizó formalina a una concentración establecida por el protocolo de Abbott Molecular,inc, 2000 (Abbott Molecular,inc, 2000). El protocolo utilizado se detalla a continuación:

1. Se colocaron las placas en formalina al 10% durante 10 minutos, y se lavaron las placas en *buffer* de lavado dos veces por cinco minutos cada una.
2. Se secaron las placas completamente.

2.5.1.5. Denaturación e Hibridación

El ADN blanco en la placa se denaturó a una temperatura alta utilizando formamida. Una vez denaturado, se colocó la sonda según el rearrreglo cromosómico específico a identificar en el área de interés. El protocolo utilizado se describe a continuación:

1. Se colocó la sonda a temperatura ambiente en oscuridad.
2. Se desnaturalizó la muestra con formamida a 73°C durante 5 minutos.

3. Se colocaron las placas durante 1 minuto en etanol 70%, 1 minuto en etanol 85% y 1 minuto en etanol 100% y se dejaron secar las placas completamente para de esta manera evaporar el etanol sobrante de las mismas.
4. Se colocaron 10 µl de sonda en el área a hibridar de interés.
5. Se cubrió la zona, se selló con pegamento (*rubber cement*) y se colocaron en cámara húmeda a 80°C por 10 minutos y luego a 37°C por 18 horas.

2.5.1.6. Lavado posthibridación

Para eliminar los restos de sonda que no ha hibridado, se utilizaron las soluciones de lavado posthibridación que se prepararon según el protocolo establecido por Abbott Molecular,inc, 2000. El protocolo se detalla a continuación:

1. Se retiró el pegamento de las placas, verificando que las placas estén húmedas) y se las sumergió en solución de lavado posthibridación 0.4X SSC/0.3% NP40 a 72°C y se dejó secar las placas por 2 minutos excepto para HER-2/neu, en donde se utilizó como solución de lavado 2X SSC/0.3% NP40.
2. Se lavaron las placas en solución de lavado 2X SSC/0.1% NP40 a temperatura ambiente durante 5 segundos a 1 minuto excepto para HER-2/neu que se utilizó 2X SSC/0.3% NP40.

2.5.1.7. Contratinción y visualización

Para la contratinción se utilizó DAPI (4'-6-diamino-2-fenilindol) que permitió la visualización de las señales de hibridación. El protocolo se describe a continuación:

1. Se secaron completamente las placas y se añadió 10 µl de DAPI II. Para HER-2/neu se utilizaron 10 µl de DAPI.
2. Se cubrieron las placas con un cubreobjetos y se observó al microscopio.

2.5.2. Tejidos en congelación

2.5.2.1. Obtención de los cortes de tejidos congelados

Las muestras utilizadas en este estudio se obtuvieron con un pedido previo al Laboratorio de Patología de SOLCA núcleo Quito. El corte de la muestra utilizado se encontraba en congelación en una placa silinizada.

2.5.2.2. Fijación de la placa

La fijación de las placas se realizó utilizando fijador de Carnoy en proporción 3:1 de metanol y ácido acético, respectivamente. Para los lavados de las placas se utilizó PBS. El protocolo se detalla a continuación:

1. Se realizó la fijación de las placas con fijador de Carnoy durante 15 minutos dejando que se seque a temperatura ambiente.
2. Se colocaron las placas por 1 hora en una solución 2X de SSC a 37°C

3. Se preparó una solución de proteasa (25 mg de proteasa más 0,5ml de HCL 0,1N más 49,5 ml de agua) a 37°C.
4. Se lavaron las placas dos veces con PBS durante tres minutos cada una.

2.5.2.3. Digestión con proteasa

Se procedió a realizar la digestión de las placas mediante el uso de un vial de la enzima proteasa modificando el tiempo de digestión. El protocolo utilizado se describe a continuación:

1. Se colocaron las placas en proteasa el tiempo necesario hasta observar que esté digerido comenzando con 5 minutos.
2. Se lavaron las placas dos veces con PBS durante tres minutos cada una.

2.5.2.4. Fijación de la muestra

Para la fijación de la muestra se utilizó formalina a una concentración establecida previamente. El protocolo se describe a continuación:

1. Se sumergieron las placas en formalina al 10% durante 2 minutos a temperatura ambiente.
2. Se lavaron las placas dos veces con PBS durante tres minutos cada una.

2.5.2.5. Denaturación e hibridación

El ADN blanco en la placa se denaturó a una temperatura alta utilizando formamida. Una vez denaturado el ADN blanco, se colocó la sonda según el rearreglo cromosómico específico a identificar en el área de interés. El protocolo utilizado se describe a continuación:

1. Se colocaron las placas en formamida al 70% durante 2 minutos a 73 °C.
2. Se realizó la deshidratación en etanol al 70% durante 1 minuto, en etanol al 85% por 1 minuto y en etanol al 100% por 1 minuto.
3. Sobre la zona de interés se colocaron 10µl de sonda.
4. Se cubrieron las placas y se sellaron con pegamento *rubber cement*.
5. Se dejaron en cámara húmeda a 80°C durante 10 minutos y a 37°C por 18 horas.

2.5.2.6. Lavado posthibridación

Para eliminar los restos de sonda que no ha hibridado se utilizaron las soluciones de lavado posthibridación que se prepararon según el protocolo establecido por Abbott Molecular,inc, 2000. El protocolo se detalla a continuación:

1. Se retiró el pegamento de las placas, verificando que las placas estén húmedas y sumergirlas en solución de lavado o posthibridación 0.4X SSC/0.3% NP40 a 72°C y se dejaron secar las placas por 2 minutos.

2. Se lavaron las placas en solución de lavado 2X SSC/0.1% NP40 a temperatura ambiente durante 5 segundos a 1 minuto.

2.5.2.7. Contratinción y visualización

Para la contratinción se utilizó DAPI (4'-6-diamino-2-fenilindol) que permitió la visualización de las señales de hibridación. El protocolo se describe a continuación:

1. Se escurrieron las placas sin dejar secar completamente y se añadió 10µl de DAPI II.
2. Se cubrieron las placas con un cubreobjetos y se observaron al microscopio de fluorescencia.

2.6. Análisis de datos

2.6.1. Valoración de núcleos

Las señales de fluorescencia se evaluaron contando 200 núcleos por placa. Únicamente se contaron los núcleos que no se encontraron sobrelapados y en los cuales se pudo distinguir claramente el borde. Para el caso de HER2/*neu* se evaluaron 20 núcleos.

Para cada uno de los tumores sólidos mencionados anteriormente, se utilizaron diferentes tipos de sondas, por lo que la valoración de los núcleos dependió

de la disposición de las señales para dar un criterio de positividad. A continuación se menciona la interpretación para cada caso.

2.6.1.1. Sarcoma de Ewing

Para la determinación de la translocación t(11; 22) en el sarcoma de Ewing se utilizó la sonda *Vysis LSI EWSR1 Dual Color Break Apart* (Abbott Molecular,inc, 2000). Para determinar la presencia o ausencia se tomaron en cuenta los siguientes parámetros. Es negativo cuando se observen dos señales fusionadas, es decir color amarillo y es positivo cuando se observe un patrón de señales separadas, es decir una verde y una anaranjada (Abbott Molecular,inc, 2000).

2.6.1.2. Cáncer de mama

Para la determinación de la amplificación del gen *HER2/neu* en cáncer de mama, se utilizó la sonda *HER2 /neu CEP17 PathVysion* (Abbott Molecular,inc, 2000). Para determinar la presencia o ausencia se tomaron en cuenta los siguientes parámetros. Para el cálculo de la tasa, se emplea la siguiente relación:

$$\frac{\text{Total de señales rojas (HER2/neu)}}{\text{Total de señales verdes (CEP17)}}$$

Por lo tanto, es negativo cuando las muestras tienen una tasa menor a 2 y en los núcleos se observan dos señales naranjas (gen *HER2*) y dos señales verdes (CEP 17). Es positivo cuando tienen una tasa mayor a 2, y en los núcleos se

observan más de seis señales naranjas y dos señales verdes (Abbott Molecular,inc, 2000).

2.6.1.3. Neuroblastoma

Para la determinación de la amplificación del gen *N-MYC* en neuroblastoma, se utilizó la sonda Vysis LSI *N-MYC (2p24) spectrum green /CEP 2 spectrum orange* (Abbott Molecular,inc, 2000). Para determinar la presencia o ausencia se tomaron en cuenta los siguientes parámetros. Es amplificación negativa cuando se observan dos señales verdes que corresponden al gen *N-MYC* y dos señales naranjas que corresponden a CEP 2. Es positiva cuando se encuentra una poliploidía (más de diez señales), *dobles minutos (dmins)*, o regiones homogéneamente teñidas (Abbott Molecular,inc, 2000).

2.6.1.4. Linfoma de Burkitt

Para la determinación de la translocación t(8; 14) en el Linfoma de Burkitt, se utilizó la sonda Vysis LSI *IGH/MYC dual-Color Dual Fusion* (Abbott Molecular,inc, 2000). Para determinar la presencia o ausencia se tomaron en cuenta los siguientes parámetros. Es negativo cuando se observan dos fusiones es decir dos señales amarillas. Es positiva cuando se observa una señal verde, una señal naranja y una señal de fusión amarilla (Abbott Molecular,inc, 2000).

2.6.1.5. Linfoma anaplásico de células grandes

Para la determinación de la translocación t(2;5) en el linfoma anaplásico de células grandes, se utilizó la sonda Vysis LSI *ALK Dual Color, Break Apart Rearrangement* (Abbott Molecular,inc, 2000). Para determinar la presencia o ausencia se tomaron en cuenta los siguientes parámetros. Es negativo cuando se observan dos señales amarillas que muestran la fusión de las señales. Es positivo cuando se observan una señal naranja, una señal verde y una señal de fusión (Abbott Molecular,inc, 2000).

2.6.2. Análisis descriptivo de datos

Se realizó una base de datos con los resultados de las muestras de tumores sólidos, recolectadas desde marzo del 2011 hasta enero del 2012, en la que se incluyó; edad del paciente, sexo, tipo de tumor, origen del tumor, tiempo de almacenamiento, diagnóstico histopatológico y diagnóstico por FISH. Para el análisis se utilizaron los paquetes estadísticos InfoStat v2.0 y EPIDAT v3.1.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1. Detección de los rearrreglos cromosómicos en los diferentes tipos de tumores sólidos.

3.1.1. Visualización y valoración de los núcleos

Después de analizar cada una de las muestras de tumores sólidos mediante la técnica FISH, a través de valoración de los núcleos, se determinaron los resultados que se presentan a continuación.

3.1.1.1 Sarcoma de Ewing

A través de la valoración de núcleos se encontró que tres muestras eran de Sarcoma de Ewing, a continuación se presentan las fotografías del caso N°1 y del caso N°9.

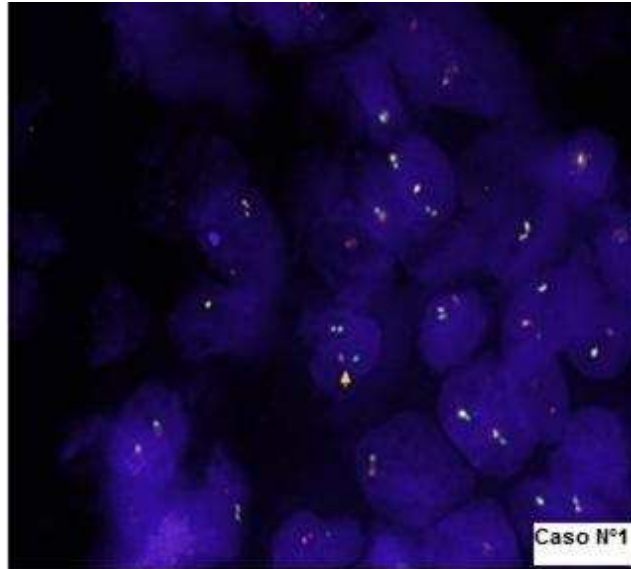


Figura 3.1. Fotografía de núcleos en interfase de una muestra de fémur con translocación 22q12 positiva en sarcoma de Ewing (TOC). La fotografía fue obtenida mediante el programa Cytovision v 7.2 mediante el microscopio de fluorescencia en 100X (SOLCA, 2011).

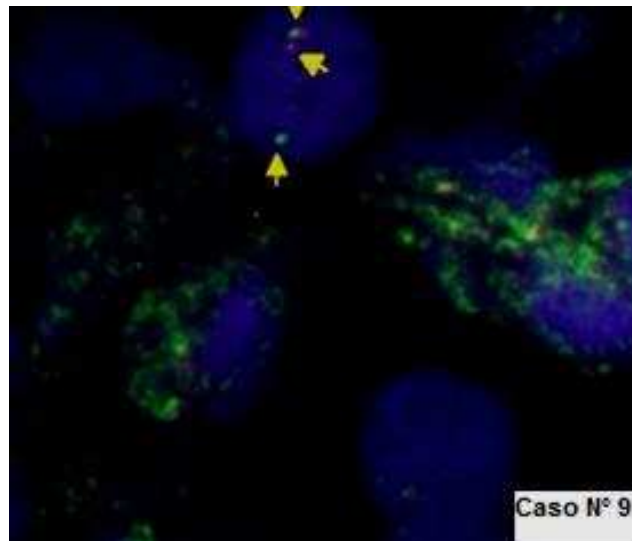


Figura 3.2. Fotografía de núcleos en interfase de una muestra de origen retroperitoneal con translocación 22q12 positiva en sarcoma de Ewing (FFPE). La fotografía fue obtenida mediante el programa Cytovision v 7.2 mediante el microscopio de fluorescencia en 100X (SOLCA, 2011).

3.1.1.2 Linfoma de Burkitt

Mediante la valoración de núcleos se encontró que dos muestras eran de linfoma de Burkitt, a continuación se presentan las fotografías del caso N°2 y N°13.

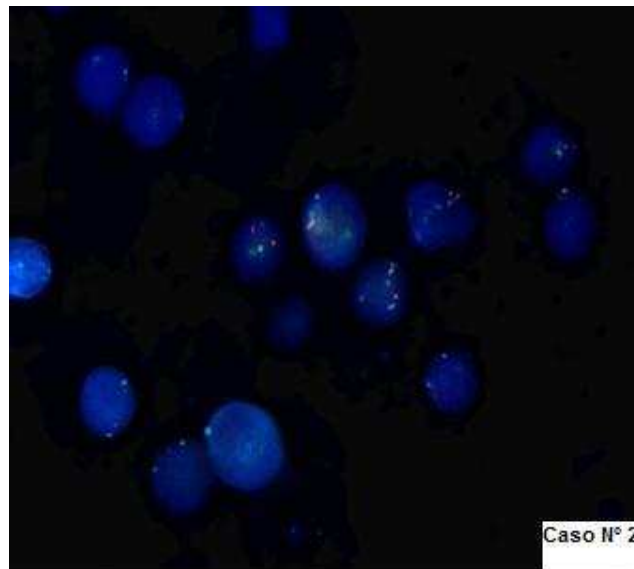


Figura 3.3. Fotografía de núcleos en interfase de una muestra de ganglio inguinal con translocación 8q14 negativa en linfoma de Burkitt (FFPE). La fotografía fue obtenida mediante el programa Cytovision v 7.2 mediante el microscopio de fluorescencia en 100X (SOLCA, 2011).

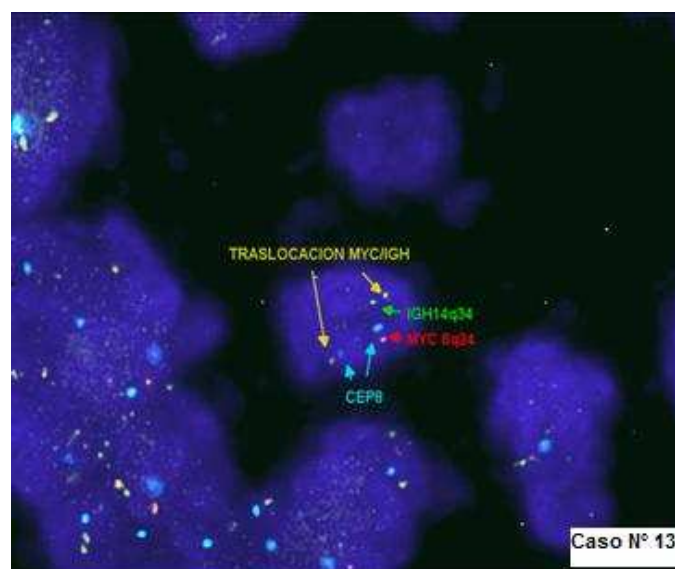


Figura 3.4. Fotografía de núcleos en interfase de una muestra de ganglio con translocación 8q14 positiva en linfoma de Burkitt (TOC). La fotografía fue obtenida mediante el programa Cytovision v 7.2 mediante el microscopio de fluorescencia en 100X (SOLCA, 2011).

3.1.1.3 Cáncer de Mama

A través de la valoración de núcleos se encontró que siete muestras eran de cáncer de mama, a continuación se presentan las fotografías del caso N°4 y del caso N°7.

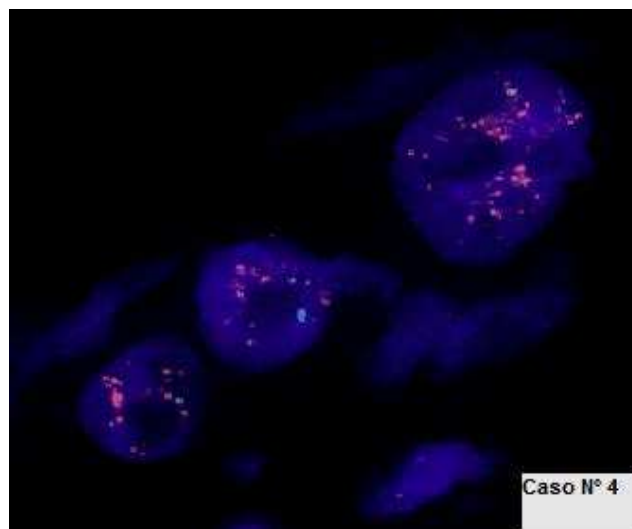


Figura 3.5. Fotografía de núcleos en interfase de una muestra de mama con amplificación positiva para el gen *HER2/neu* en cáncer de Mama (FFPE).La fotografía fue obtenida mediante el programa Cytovision v 7.2 mediante el microscopio de fluorescencia en 100X (SOLCA, 2011).

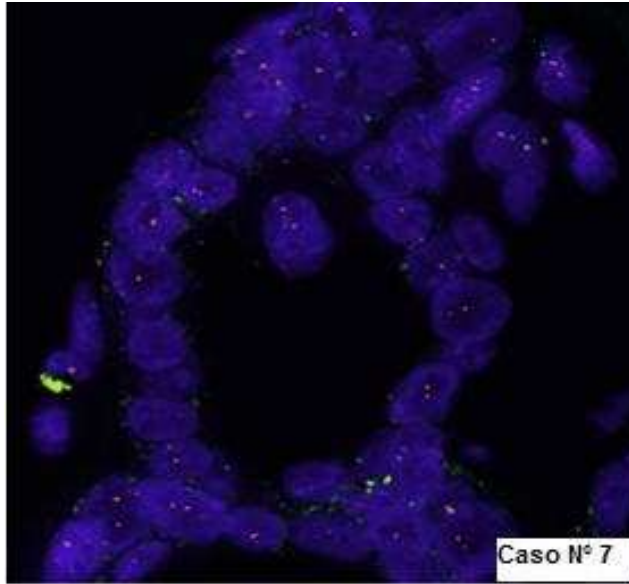


Figura 3.6. Fotografía de núcleos en interfase de una muestra de mama con amplificación negativa para el gen *HER2/neu* en cáncer de Mama (FFPE). La fotografía fue obtenida mediante el programa Cytovision v 7.2 mediante el microscopio de fluorescencia en 100X (SOLCA, 2011).

3.1.1.4 Neuroblastoma

A través de la valoración de núcleos se encontró que cuatro muestras corresponden a neuroblastoma. A continuación se presentan las fotografías del caso N°6 y del caso N°15.

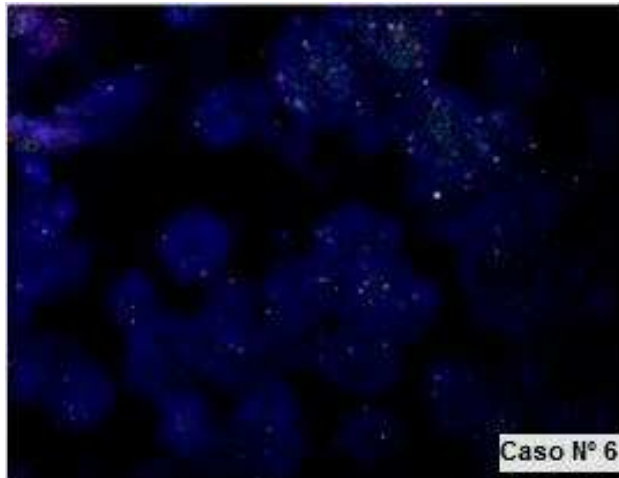


Figura 3.7. Fotografía de núcleos en interfase de una muestra de origen retroperitoneal con amplificación negativa del gen *N-MYC* en neuroblastoma (FFPE). La fotografía fue obtenida mediante el programa Cytovision v 7.2 mediante el microscopio de fluorescencia en 100X (SOLCA, 2011).

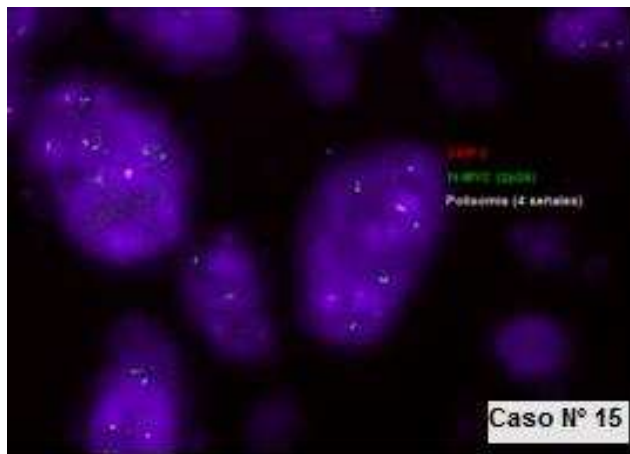


Figura 3.8. Fotografía de núcleos en interfase de una muestra de origen retroperitoneal con amplificación negativa del gen *N-MYC* en neuroblastoma (TOC). La fotografía fue obtenida mediante el programa Cytovision v 7.2 mediante el microscopio de fluorescencia en 100X (SOLCA, 2011).

3.1.1.5 Otros tumores sólidos

Mediante la valoración de núcleos se encontró que cuatro muestras eran de otros tumores sólidos, a continuación se presentan las fotografías del caso N°14 y del caso N°11.

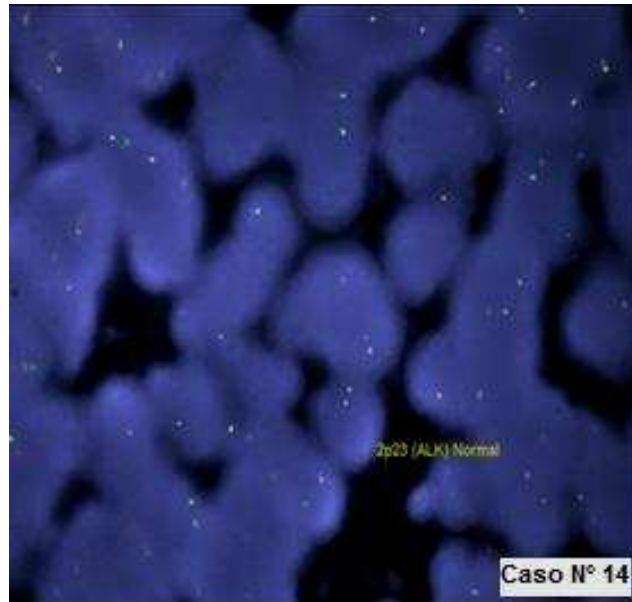


Figura 3.9. Fotografía de núcleos en interfase de una muestra de ganglio retroperitoneal con translocación 2p23 ALK negativa en linfoma No Hodgking de células pequeñas (TOC). La fotografía fue obtenida mediante el programa Cytovision v 7.2 mediante el microscopio de fluorescencia en 100X (SOLCA, 2011).

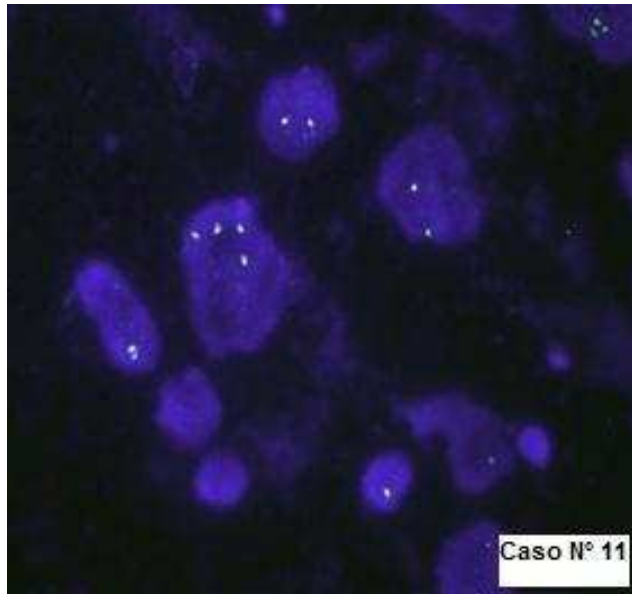


Figura 3.10. Fotografía de núcleos en interfase de una muestra retroocular con translocación 2p23 ALK negativa, correspondiente a un caso de retinoblastoma (TOC). La fotografía fue obtenida mediante el programa Cytovision v 7.2 mediante el microscopio de fluorescencia en 100X (SOLCA, 2011).

3.1.2. Análisis descriptivo de los datos

Se confeccionó una base de datos (Tabla 3.1) de 20 casos clínicos recopilados desde Marzo del 2011 hasta Enero del 2012. Con esta información se realizó el análisis descriptivo de datos que se presenta a continuación.

Tabla 3.1 Información y resultados del análisis de las diferentes muestras de tumores sólidos empleados en el estudio (N° de muestra, edad y sexo del paciente, diagnóstico médico, técnica histopatológica, técnica de FISH, tipo de tejido, tiempo de almacenamiento, localización topográfica y los resultados) obtenidos desde Marzo 2011 hasta Enero 2012.

N° de muestra	Sexo	Edad	Localización topográfica	Diagnóstico	Resultado histopatológico	Tipo de Tejido (TOC y FFPE)	Tiempo de almacenamiento	Translocación o amplificación esperada	Result. FISH
1	M	21	Fémur	Sarcoma Ewing PEANUT	+	TOC	0	22q12	+
2	M	65	Ganglio Inguinal	Linfoma Burkitt	+	FFPE	15 días	8q14	-
3	F	12	Tibia	Sarcoma Ewing PEANUT	+	TOC		22q12	+
4	F	56	Mama	Carcinoma Ductal	+	FFPE	301 días	Her2-neu/CEP17	+
5	F	1	Suprarrenal	Neuroblastoma	+	FFPE	19 días	N-MYC	-
6	M	17	Retroperitoneal	Neuroblastoma	+	FFPE	7 días	N-MYC	-
7	F	57	Mama	carcinoma Multifocal	+	FFPE	20 días	Her2-neu/CEP17	+
8	M	2	Suprarrenal	Neuroblastoma	+	TOC	0	N-MYC	-
9	F	2	Retroperitoneal	Sarcoma Ewing PEANUT	+	FFPE	30 días	22q12	+
10	F	73	Paratoroides	Linfoma No Hodgkin	-	TOC	0	2p23 ALK	-
11	F	2	Retroocular	Linfoma No Hodgkin	-	TOC	0	2p23 ALK	-
12	M	14	Ganglio	Linfoma No Hodgkin	-	TOC	0	2p23 ALK	-
13	M	14	Ganglio	Linfoma Burkitt	+	TOC	0	8q14	+
14	F	34	Ganglio Retroperitoneal	Linfoma No Hodgkin	-	TOC	0	2p23 ALK	-
15	M	7	Retroperitoneal	Neuroblastoma	+	TOC	0	N-MYC	-
16	F	68	Mama	Carcinoma ductal infiltrante mod. Diferenciado	+	FFPE	30 días	Her2-neu/CEP17	-
17	F	47	Mama	Carcinoma ductal in situ extenso de alto grado	+	FFPE	180 días	Her2-neu/CEP17	-
18	F	58	Mama	Carcinoma ductal infiltrante mod. Diferenciado	+	FFPE	120 días	Her2-neu/CEP17	+
19	F	40	Mama	Carcinoma ductal infiltrante mod. Diferenciado	+	FFPE	30 días	Her2-neu/CEP17	-
20	F	37	Mama	Carcinoma ductal infiltrante mod. Diferenciado	+	FFPE	66 días	Her2-neu/CEP17	+

M: Masculino; **F:** Femenino

+: Positivo; **-**: Negativo

TOC: Tejido en congelación; **FFPE:** Tejido parafinado.

En la Tabla 3.1 se observa que existieron siete muestras de tumores sólidos procedentes de sexo masculino (35%) y trece muestras de sexo femenino (65%). Las edades al tiempo del diagnóstico variaron entre 1 a 68 años (promedio, 31 años). La localización topográfica para sarcoma de Ewing fue tibia y fémur en dos pacientes y de origen retroperitoneal en un paciente. Para neuroblastoma fue suprarrenal en dos pacientes y retroperitoneal en dos pacientes. Para linfoma de

Burkitt la localización topográfica fue en el ganglio en dos pacientes. Para cáncer de mama fue en la mama en siete pacientes y finalmente para linfoma no Hodgkin fue en la paratiroides en un paciente, retroocular en un paciente y en el ganglio en dos paciente. Nueve de veinte muestras (45%) fueron biopsias congeladas y las once muestras restantes (55%) eran parafinadas.

Con respecto a la técnica histopatológica, dieciséis muestras de tumores sólidos (80%) fueron diagnosticadas como positivas y cuatro casos (20%) como resultados negativos. Mientras mediante la técnica FISH, ocho muestras (40%) fueron positivas para el rearreglo en estudio y doce muestras (60%) fueron negativas para el rearreglo en estudio. Dentro de los rearreglos cromosómicos analizados se incluyen translocaciones tanto para sarcoma de Ewing t(11;22), linfoma de Burkitt t(8;14), linfoma no Hodgkin t(2;5) y amplificaciones tanto para cáncer de mama (gen *HER2/neu*) y neuroblastoma (gen *N-MYC*).

3.2. Características operativas de FISH vs HISTOPATOLOGÍA

Para el cálculo de las características operativas de la técnica de FISH cabe recalcar que hubo limitaciones como la disponibilidad de pocas muestras, y la comparación entre las técnicas basada en el diagnóstico proporcionado por histopatología. La histopatología es una técnica de *screening* mientras que FISH utiliza una sonda de locus específico, lo que genera un sesgo para la comparación. Este sesgo va a influir directamente en el cálculo de estos valores. Mediante el

análisis de los resultados de las dos técnicas se determinaron mediante el uso del software estadístico EPIDAT v3.1, las características operativas que se presentan en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2 Características operativas de la técnica de FISH comparada con la de Histopatología (*gold standard*) para los tumores sólidos mediante el software estadístico EPIDAT v3.1 (2012).

CARACTERÍSTICA OPERATIVA	VALOR	IC (95%)	
Sensibilidad (%)	100,00	93,75	100,00
Especificidad (%)	33,33	2,49	64,17
Valor predictivo positivo (%)	50,00	22,38	77,62
Valor predictivo negativo (%)	100,00	87,50	100,00
Índice de Youden	0,33	0,07	0,60

La construcción de la curva de ROC permite medir la capacidad discriminatoria de una prueba diagnóstica, tomando en cuenta que el rango de valores se encuentra entre 1 que significa una discriminación perfecta y 0,5 que significa que no hay diferencias en la distribución de los valores de la prueba entre los 2 grupos.

Con estos datos se calculó el rendimiento y la capacidad diagnóstica de la prueba de FISH para tumores sólidos mediante la curva de ROC, en la que se obtuvo un área bajo la curva de 0,667. (Figura 3.11)

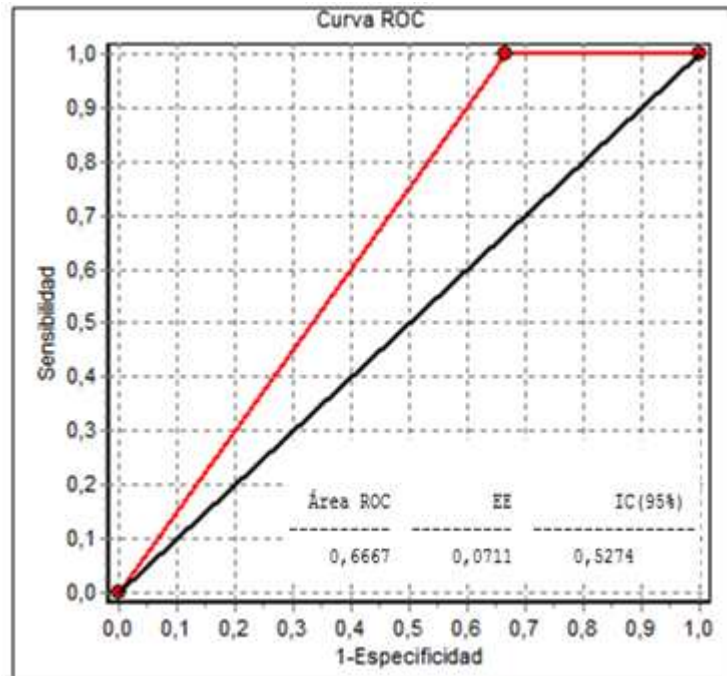


Figura 3.11. Curva de ROC de FISH vs. Histopatología (*gold standard*), obtenido mediante el software estadístico EPIDAT v3.1 (2012).

3.3 Comparación de resultados

Tabla 3.3 Resultados obtenidos mediante la Histopatología y la técnica de FISH.

N° Muestra	Diagnóstico	Histopatología	FISH
1	Sarcoma Ewing PEANUT	+	+
2	Linfoma Burkitt	+	-
3	Sarcoma Ewing PEANUT	+	+
4	Carcinoma Ductal	+	+
5	Neuroblastoma	+	-
6	Neuroblastoma	+	-
7	Carcinoma Multifocal	+	+
8	Neuroblastoma	+	-

9	Sarcoma Ewing PEANUT	+	+
10	Linfoma No Hodgkin	-	-
11	Linfoma No Hodgkin	-	-
12	Linfoma No Hodgkin	-	-
13	Linfoma Burkitt	+	+
14	Linfoma No Hodgkin	-	-
15	Neuroblastoma	+	-
16	Carcinoma Ductal infiltrante mod. Diferenciado	+	-
17	Carcinoma ductal in situ extenso de alto grado	+	-
18	Carcinoma ductal infiltrante mod. Diferenciado	+	+
19	Carcinoma ductal infiltrante mod. Diferenciado	+	-
20	Carcinoma ductal infiltrante mod. Diferenciado	+	+

+: Positivo; - : Negativo

3.3.1 Histopatología vs FISH

Se aplicaron las pruebas estadísticas de McNemar y *Chi* cuadrado de independencia para la comparación de resultados entre ambas pruebas (histopatología vs. FISH).

3.3.1.1 Prueba de McNemar para histopatología vs. FISH

A través de la aplicación de la prueba de McNemar, se determinó si las pruebas inducen o no cambios en los resultados. Para determinar esto se plantearon las siguientes hipótesis:

Ho: $P > 0,05$, no hubo diferencias en los resultados con ninguna de las dos pruebas diagnósticas

Ha: $P < 0,05$, si hubo diferencias en los resultados con la técnica de FISH respecto de la histopatológica.

Mediante el programa Infostat v2.0 para una tabla de contingencia 2x2 (Tabla 3.4), se determinó un valor de $P = 0,0075$ para el presente estudio.

Tabla 3.4. Tabla de contingencia para la prueba de McNemar, mediante el programa Infostat v2.0.

		Histopatología		Total
		-	+	
FISH	-	4	0	4
	+	8	8	16
Total		12	8	20

+: Positivo; - : Negativo

3.3.1.2 Prueba *Chi* Cuadrado de independencia para Histopatología vs FISH

Mediante la aplicación de la prueba *Chi* cuadrado de independencia se determinó si hay o no independencia entre ambas pruebas diagnósticas. Para determinar esto se plantearon las siguientes hipótesis:

Ho: $P > 0,05$, la técnica de FISH es independiente de la técnica histopatológica.

Ha: $P < 0,05$, la técnica de FISH no es independiente de la técnica histopatológica.

Mediante el programa Infostat v2.0 para una tabla de contingencia 2x2 (Tabla 3.5), se determinó un valor de $P = 0,068$ para la presente comparación.

Tabla 3.5. Tabla de contingencia para la prueba de *Chi* Cuadrado de independencia, mediante el programa Infostat v2.0.

		Histopatología		Total
		-	+	
FISH	-	4	0	4
	+	8	8	16
Total		12	8	20

+: Positivo; -: Negativo

3.3.1.3 Índice de Kappa para determinar la concordancia entre Histopatología vs. FISH.

El coeficiente kappa refleja la concordancia inter-observador y puede ser calculado en tablas de cualquier dimensión, siempre y cuando se contrasten dos observadores.

Este coeficiente kappa puede tomar valores entre -1 y +1. Mientras más cercano a +1, el grado de concordancia inter-observador es mayor, por otro lado, mientras más cerca se encuentre del -1, mayor es el grado de discordancia.

Mediante el programa Epidat v3.1 para una tabla de contingencia 2x2(Tabla 3.6), se determinó un valor de $\kappa=0,286$ para esta comparación.

Tabla 3.6. Tabla de contingencia para calcular el índice de Kappa, mediante el programa Epidat v3.1.

		Histopatología		Total
		-	+	
FISH	-	4	0	4
	+	8	8	16
Total		12	8	20

+: Positivo; - : Negativo

CAPITULO 4: DISCUSIÓN

Los tumores sólidos se definen como la presencia de una masa sólida formada por células neoplásicas, que se encuentra en cualquier sitio anatómico y que presenta diferentes tipos histológicos (Ministerio de Salud de Chile, 2010). Para este proyecto se eligieron como unidades experimentales a muestras de tejidos tumorales tanto en congelación como parafinados. Según González *et al.* (2010). Las muestras de tejidos tumorales reflejan la situación *in vivo* con respecto a la heterogeneidad de las células. Sin embargo, los trabajos que se basan en este tipo de muestras se ven limitados por la escasa disponibilidad de tejido, siendo la principal dificultad para la obtención de un mayor número de muestras en este estudio.

La identificación de rearrreglos cromosómicos asociados a una enfermedad determinada aporta información relevante para al diagnóstico y pronóstico en los tumores sólidos. Este conocimiento permite hacer un seguimiento en cuanto a la evolución de la enfermedad y la valoración de la respuesta al tratamiento (Calasanz *et al.*, 2000). Definitivamente, mediante el desarrollo de nuevas técnicas moleculares como la FISH se ha conseguido mejorar el diagnóstico y monitoreo de los pacientes.

Una de las ventajas de esta técnica es que permite trabajar tanto con tejidos en congelación como con parafinados. La digestión del tejido es un paso clave para la aplicación de la técnica. Según Tojo (2009), se trata de un procedimiento muy

delicado debido a que cortos tiempos de digestión pueden generar señales deficientes, mientras que los tiempos de digestión demasiado largos pueden dar lugar a los denominados “núcleos fantasmas”, con pérdida de señal. Además, para obtener una buena señal hay que tomar en cuenta las temperaturas que se encuentran establecidas en el protocolo de Abbott Molecular.Inc. (2000). Según Gómez *et al.* (2005), citado por Tojo en el 2009, en la técnica de FISH hay diferencias según el tipo de tejido en estudio ya sea congelado o parafinado, donde se observa que el éxito con tejido en congelación es del 100% y en parafinado es del 80%.

Con respecto al análisis descriptivo de datos, el Sarcoma de Ewing, tiene predilección por el género masculino con relación 1,5: 1 (Iwamoto, 2007). Por otro lado la edad también influye en el diagnóstico del paciente, según Iwamoto (2007) aproximadamente el 80% de los pacientes afectados son menores de 20 años de edad. Cuando se encuentran casos en pacientes mayores de 30 años primero se deben descartar otros tipos de tumores como carcinomas de células pequeñas y linfoma de células grandes. En cuanto a la localización topográfica del tumor, castillo & Brenes (2007) explican que el fémur es el sitio más frecuente del tumor primario y también pueden presentarse en otros sitios como la pelvis, la tibia, o huesos de los pies. Ciertos argumentos mencionados para este tipo de tumor, no se pudieron observar en nuestro estudio debido a que una de las limitaciones fue el haber obtenido un número insuficiente de muestras.

Figuerola (2003), explica que el neuroblastoma se presenta en el 80% de los casos en pacientes menores de 4 años y en el 36% en menores de 12 meses, es por ello que la edad se considera como un factor pronóstico importante en este tipo de tumor sólido. Con respecto al sexo del paciente, Papaioannou & McHugh (2005) quienes indican que el sexo masculino es afectado con mayor frecuencia con este tipo de tumor. Además las manifestaciones clínicas dependen de la localización topográfica del tumor primario, el cual se origina en cualquier lugar donde exista tejido ganglionar simpático, siendo el más común las glándulas suprarrenales en el 40% en los casos. Según Weinstein *et al.* (2003), para todos los estadios de la enfermedad, los niños menores a un 1 año tienen una mejor tasa de supervivencia, es decir un mejor pronóstico.

Según Queiroga *et al.* (2008) en su investigación, el linfoma de Burkitt se presentó con mayor frecuencia en el género masculino en una relación de 2.8 a 1 y se observó un alto porcentaje en sitios extranodales. Adicionalmente, en otras investigaciones se estimó que el linfoma de Burkitt es 1000 veces más frecuente en aquellos pacientes que presentan VIH positivo (Valenzuela *et al.*, 2010). Este mismo autor explica que el promedio de edad en la que se presenta el tipo esporádico de LB es de 14 años.

Con respecto al cáncer de mama, según el NCI (2004), citado por González *et al.* (2010), las probabilidades de padecer este tipo de cáncer aumentan a medida que la mujer envejece, es por eso que la edad es un factor muy importante. La mayoría de los casos de cáncer de mama avanzado se encuentran en mujeres a

partir de 50 años. Según González *et al.* (2007), en mujeres jóvenes es más frecuente la sobreexpresión del gen *HER2/neu*, que tienden a desarrollar tumores de alto grado de malignidad y que el gen se sobreexpresa con mayor frecuencia en el carcinoma ductal *in situ*. Algunas de las pacientes en estudio eran menores de 40 años lo que demuestra que ya no es una enfermedad exclusiva de edad avanzada, según la Dirección Seccional de Salud de Antioquia (2005), citada por González *et al.* (2010) que indica que el 63% de las pacientes con cáncer de mama está conformado por menores de 60 años y, de éstas, 33.5% por menores de 50 años. Según el NCI (2010), en los Estados Unidos, se reportaron 226 870 casos en mujeres y 2 190 en hombres, por lo que se puede presentar tanto en los hombres como en las mujeres, aunque el cáncer de mama masculino es raro.

En este estudio se les denominó como otros tipos de tumores sólidos a aquellos tumores que no fueron diagnosticados como linfoma anaplásico de células grandes, dentro de los cuales se incluye el linfoma no Hodgkin y el retinoblastoma. Según Hurria (2010), un 58% de los pacientes con linfoma no Hodgkin son mayores a 65 años de edad. El riesgo de padecer este tipo de neoplasia, es mayor en hombres que en mujeres, pero existen otros tipos de linfoma no Hodgkin que son más comunes en mujeres, y puede darse en los ganglios linfáticos (ACS, 2012). Dentro de este grupo se encuentra el linfoma difuso de células grandes, que se presenta del 30 al 35% en adultos, con una edad promedio en el momento del diagnóstico de 70 años y con mayor frecuencia en el sexo masculino (Khosravi&Pérez,2006). En este estudio al encontrarse el tumor ubicado exclusivamente en las glándulas paratiroides, se asocia con una mayor frecuencia

con una ocurrencia mayor en mujeres mayores de 50 años (Pérez *et al.*, 2000). Por otro lado, según Manzitti & Mansilla (2010), el retinoblastoma es un tumor ocular muy frecuente en la infancia, la edad promedio son los 24 meses, pero no se ha encontrado que tenga predilección por un género o raza.

Con respecto a los resultados de las técnicas aplicadas en biopsias de pacientes tanto del sexo masculino como del sexo femenino, presentaron una mayor frecuencia de resultados positivos con la técnica histopatológica, mientras que mediante FISH ambos sexos presentaron un menor porcentaje de resultados positivos. Esta diferencia en los resultados no depende de la técnica, sino de la distribución de la población en estudio.

El diagnóstico puede considerarse como el más importante paso dentro de la práctica médica, pues es la clave que lleva al tratamiento y a establecer un pronóstico. La validez de una prueba diagnóstica depende de su capacidad para detectar correctamente la presencia o ausencia de la enfermedad, lo que se expresa matemáticamente con las características operativas (sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, índice de Youden) (Ruiz de Adana Pérez, 2009). Estas características se obtienen a partir del análisis de una serie de pacientes a los que se les aplica una prueba diagnóstica (prueba en estudio). En nuestro estudio, la técnica FISH se comparó, con los de una prueba de superior rendimiento diagnóstico, llamada prueba de referencia, estándar o patrón de oro que para el estudio es la técnica histopatológica. Por ello, al determinar la sensibilidad de las dos pruebas FISH vs histopatología, se obtuvo que FISH en este trabajo tiene

una sensibilidad del 100%, lo que sugiere que la técnica FISH tiene una capacidad muy alta de detección, basada en su característica de hibridación. Mediante esto la técnica identifica los rearrreglos cromosómicos específicos en tumores sólidos, discriminando por tanto pacientes que presentan el rearrreglo cromosómico de aquellos que no lo presentan.

Se obtuvo una especificidad del 33,33%, lo cual puede deberse a que al comparar ambas pruebas, en la técnica histopatológica se realiza un análisis de todo el tumor, según su morfología más no de un rearrreglo cromosómico específico. En la técnica FISH se está utilizando una sonda de locus específico, por lo que no es una técnica de *screening*. Por ello en algunos casos clínicos, no coinciden los resultados de las dos técnicas. Esto podría deberse a que las causas del tumor analizado podrían ser otros rearrreglos cromosómicos. Sin embargo a pesar de que no se presente el rearrreglo cromosómico esperado, esto no significa que el diagnóstico histopatológico esté equivocado. Se presume que al utilizar otra variante de la técnica de FISH, tal como la FISH múltiple, se podría analizar todos los cromosomas y observar todos los rearrreglos existentes.

Según González *et al.* (2010), el índice de Youden (IJ) mide la calidad del resultado obtenido. Según este índice, cuando IJ es igual a 1 o cercano a este valor, la prueba diagnóstica es óptima. Se elige este parámetro como uno de los más importantes para valorar una técnica diagnóstica debido a que en él se combinan los valores de sensibilidad y especificidad. En este estudio, el índice de Youden fue de 0,33 debido a la baja especificidad que se obtuvo en el ensayo. El resultado obtenido

en este estudio puede deberse al hecho de que se está comparando una técnica que detecta algo muy específico con otra técnica que realiza un *screening*.

Al calcularse el valor predictivo positivo y negativo (VPP/VPN), se encontró que FISH tiene un valor predictivo positivo del 50% y un valor predictivo negativo del 100%. El valor predictivo negativo del 100% demuestra que la técnica es excelente al momento de precisar qué paciente no tiene el rearrreglo específico en estudio (González *et al.*, 2010). Pero al obtenerse un valor predictivo positivo del 50%, podría decirse que tendría poco poder en el momento de definir la probabilidad de que un paciente sea realmente positivo para el rearrreglo cromosómico esperado.

En todo estudio en el que se evalúan pruebas diagnósticas, se debe realizar el análisis de la curva de ROC, que es un índice de la exactitud diagnóstica y proporciona un criterio unificador en el proceso de evaluación de una prueba (Ruiz de Adana Pérez, 2009), es decir mide la capacidad discriminadora de un ensayo diagnóstico. (Altman & Hald, 1994). En este estudio se observó que FISH, presentó una curva intermedia, con un área bajo la curva de 0,667, que indica que es una prueba intermedia para la determinación de rearrreglos cromosómicos respecto a la prueba histopatológica. Además, indica que tiene una capacidad discriminadora menor que la histopatología, por lo tanto, no debería ser usada como única prueba diagnóstica.

Además para comparar ambas técnicas, se incluyó el análisis estadístico, mediante la prueba de McNemar en la que se obtuvo un valor de $P=0,0075$ Esto significa que se rechaza la hipótesis nula, es decir sí hubo diferencias en los

resultados con la técnica de FISH respecto a la histopatológica, lo que comprueba lo obtenido anteriormente en el análisis descriptivo de los datos. Por otro lado, al aplicarse la prueba *Chi* cuadrado de independencia, dio un valor de $P=0,068$, que significa que la técnica FISH es independiente de la técnica histopatológica. Pero como se observó con la curva de ROC, ambas técnicas no funcionan correctamente por separado, por lo tanto se sugiere que para realizar los análisis de tumores sólidos, primero se realice el análisis histopatológico y luego para confirmar o para descartar algún resultado, aplicar la técnica de FISH.

Finalmente para determinar la concordancia entre ambas pruebas, se utilizó el índice de Kappa. En este estudio se obtuvo un valor de $\kappa=0,286$. Esto significa una concordancia baja con respecto al estándar de oro.

Según King *et al.* (2000), la técnica de FISH tiene alta especificidad y sensibilidad por lo que es la más utilizada para realizar estudios de tumores sólidos sobre todo cuando no se puede realizar el cultivo de tumores o cuando se requiere una confirmación de resultados. Es por ello que cada rearrreglo cromosómico identificado tiene una gran importancia clínica.

En el sarcoma de Ewing los estudios moleculares utilizando la hibridación in situ con fluorescencia (FISH), son importantes para la evaluación de las células pequeñas indiferenciadas en este tipo de tumores, particularmente en casos en los que las características histológicas e inmunohistoquímicas están indeterminadas. La detección de las translocaciones principales va a permitir un diagnóstico definitivo de

esta neoplasia. Diferenciarla de otros tipos de cáncer como rhabdomyosarcoma y sarcoma sinovial, es crítico debido a que los tratamientos son muy diferentes para cada uno de ellos (Bernstein *et al*, 2006). El rearrreglo cromosómico EWSR1/FL1, se lo ha asociado con un mejor pronóstico en relación a las otras variantes que presentan un pronóstico menos favorable para el paciente (Mitelman&Heim, 2009). Además los métodos moleculares tanto FISH como RT-PCR sirven para monitorear al gen EWS/FL1, se ha confirmado la presencia de este rearrreglo en un 85% de los casos y muestra una correlación con la alta expresión del marcador de superficie CD99. La presencia de cambios citogenéticos adicionales, pueden dar lugar a un pronóstico pobre. (Bernstein *et al*, 2006).

Berková *et al.* (2008), realizaron una comparación entre las técnicas RT-PCR y FISH en cinco muestras de sarcoma de Ewing que fueron congeladas en nitrógeno líquido para ser usadas directamente en el análisis molecular y también fueron parafinadas. La RT-PCR usada fue menos sensible en las muestras embebidas en parafina, y solo detectó la translocación t (11;22), mientras que la técnica de FISH sí detectó el rearrreglo cromosómico mencionado y otras translocaciones menores. Las muestras que tuvieron como resultado negativo en PCR, mediante FISH fueron positivas. Además el tiempo de almacenamiento de las muestras parafinadas no influyó en la calidad de los resultados con FISH. Concluyeron que ambas técnicas son muy útiles para evaluar este tipo de sarcoma. La detección de translocaciones características mediante estos métodos puede permitir un diagnóstico definitivo de sarcoma de Ewing. De la misma manera Qian *et al.* (2005), realizó un estudio acerca

del diagnóstico molecular en muestras de sarcoma de Ewing embebidas en parafina mediante RT-PCR y FISH. Se analizaron 18 casos de sarcoma de Ewing para la $t(11;22)(q24;q12)$ y $t(21;22)(q22;q12)$ mediante RT-PCR y la $t(11;22)(q24;q12)$ en interfases por FISH con la sonda de fusión dual color. RT-PCR detectó el 72% de fusiones *EWS-FL1* y el 11% de fusiones *EWS-ERG*. FISH fue diagnosticado en 15 de los 18 casos (83%). Llegaron a la conclusión de que utilizando una combinación de RT-PCR y FISH, los resultados fueron complementarios, mejorando notablemente el diagnóstico de esta neoplasia. Yamaguchi *et al.* (2005), realizaron una investigación en la que utilizaron nuevas sondas para la hibridación in situ con fluorescencia para el diagnóstico de sarcoma Ewing y de otros tumores de células pequeñas y redondas, que tienen en común en sus rearrreglos cromosómicos al gen *EWS*, en 16 muestras de tejidos embebidos en parafina. El promedio de resultados positivos utilizando las nuevas sondas para la detección del gen *EWS* en tres tipos de tumores fue 90%. Sin embargo esto sugirió que el 10% restante de tumores no va a ser detectado por esta prueba, sino que necesita de otras pruebas como la RT-PCR para poder realizar un diagnóstico adecuado en casos que muestren una complejidad alta.

La importancia clínica de medir la amplificación del gen *HER2/neu*, en el cáncer de mama, radica en que las pacientes que tienen esta neoplasia con amplificación de *HER2/neu*, presentan un fenotipo de tumor agresivo, con mayor resistencia a los tratamientos de quimioterapia y terapia hormonal y una menor tasa de supervivencia. Es por ello que para este tipo de tumor se utiliza como tratamiento el anticuerpo monoclonal llamado trastuzumab que se dirige específicamente contra el dominio extracelular del receptor *HER2/neu*, lo que aumenta la tasa de

supervivencia de las paciente (González, 2007). Es esencial determinar si la causa del tumor es el gen *HER2*, debido a que el tratamiento es beneficioso para tratar cáncer de mama avanzado y de esta manera se puede prevenir efectos cardiotóxicos en aquellas pacientes que no muestran amplificación del gen (Sui et al, 2009). Estos mismos autores realizaron una investigación comparando la inmunohistoquímica con la técnica de hibridación in situ con fluorescencia (FISH), con 50 muestras de carcinoma ductal invasivo, se obtuvo que la inmunohistoquímica se puede utilizar como una técnica para examinar el estado del gen *HER2* y la técnica FISH se la puede utilizar como un complemento para detectar *HER2* en aquellos casos que la IHC evalúe como 2+, que no están definidos claramente si son positivos o negativos. Considerando a la técnica FISH como *gold standard*, se reportó que los resultados positivos obtenidos mediante esta técnica fueron 91.7%, 23.2%, 7.4% and 4.1% en casos con inmunohistoquímica diagnosticados respectivamente como 3+, 2+, 1+ and 0.

Por otro lado Su et al,(2011), realizaron la detección del gen *HER2/neu* en cáncer de mama invasivo mediante inmunohistoquímica IHC y FISH, en 41 pacientes con carcinoma ductal. La amplificación del gen con la técnica de FISH se observó en 15 pacientes de los cuales 8 fueron diagnosticados con IHC 3+, 6 con IHC 2+ y 1 con IHC 1+. Se encontró que el receptor estrogénico no está asociado con la amplificación de *HER2*. Se determinó que mediante FISH se puede diagnosticar con exactitud la amplificación del gen.

En el neuroblastoma la amplificación del gen *N-MYC* ocurre en aproximadamente el 20% de los neuroblastomas y se asocia fuertemente con la

presencia de metástasis y un pronóstico pobre. Estas observaciones sugieren que el gen *N-MYC* contribuye a un comportamiento altamente agresivo de este tipo de tumor. El nivel de expresión del gen *N-MYC* se correlaciona con el potencial de crecimiento de las células del neuroblastoma (Weinstein, 2003). Sartelet *et al.*(2002) en su investigación, realizaron un estudio retrospectivo en 97 muestras embebidas en parafina, mediante la técnica de FISH, para la detección de amplificación de *N-MYC* en áreas del tumor que tenían neuroblastos inmaduros. De las 97 muestras, 16 fueron amplificadas y 12 no se pudieron interpretar con Southern blot/PCR. Todos los neuroblastomas con amplificación del gen *N-MYC* que habían sido detectados con Southern blot/PCR, fueron amplificados por FISH. Cuatro tumores que no pudieron ser interpretados con Southern blot/PCR tuvieron más de cinco copias del gen *N-MYC* por FISH. Este estudio confirma que cuando se aplica la técnica de FISH en áreas inmaduras de neuroblastomas, presenta mayor sensibilidad que otras técnicas moleculares y puede detectar amplificación heterogénea. FISH se convierte en un procedimiento complementario para la evaluación del pronóstico en este tipo de tumores. Por otro lado en una investigación realizada por Abdalla *et al.* (2009), en el que se analizó la amplificación del gen *N-MYC* en 30 tumores neuroblásticos periféricos utilizando la técnica de FISH. De los 30 casos, 25 eran muestras de neuroblastoma, 2 casos de ganglioneuroblastoma y 3 casos de ganglioneuroma, en los que se obtuvo como resultado la amplificación del gen *N-MYC* en 8 casos, de los cuales 3 casos mostraron *doble minutes*, 3 casos regiones homogéneamente teñidas y 2 casos que mostraron ambos tipo de amplificación. Se concluyó que la amplificación de *N-MYC* es un marcador de pobre pronóstico y debe ser

diagnosticado en todos los casos de tumores neuroblasticos periféricos utilizando la técnica de FISH.

La presencia del gen *ALK* se asocia con el linfoma anaplásico de células grandes. Se ha realizado un separación sistémica de este tipo de linfoma en dos entidades (*ALK+* y *ALK-*), teniendo relevancia clínica y en el pronóstico. Alrededor del 80% de niños y 60% de adultos con *ALK+* ALCL se curan con quimioterapia, mientras que los pacientes con *ALK-* ALCL tienen un resultado no muy favorable. (Falini & Martelli, 2009). Li *et al.* (2004), en su investigación realizaron la detección de la translocación del gen *ALK* mediante la técnica FISH en 22 muestras de tejidos embebidos en parafina. Estas muestras también fueron analizadas utilizando la inmunohistoquímica, a través de la cual se obtuvo una expresión de la proteína ALK en 12 casos de 20. Los resultados obtenidos con la técnica FISH concordaron 100% con la inmunohistoquímica. Por otro lado Shin *et al.* (2003), realizaron detección del linfoma anaplásico de células grandes con marcador de superficie CD30+ utilizando la técnica de FISH en interfases de 9 muestras de aspirado con aguja fina. Seis muestras mostraban una translocación positiva para el gen *ALK*. Esto demostró que las muestras de aspirado también son aptas para utilizarlas con FISH.

La anormalidad del gen *C-MYC* se asocia con todos los casos de linfoma de Burkitt y es esencial para la iniciación de un proceso tumoral. La ocurrencia de la translocación t(8;14) particularmente en pacientes adultos, lleva a una revaloración del diagnóstico histopatológico, debido a que se asocia fuertemente con un resultado desfavorable (Mitelman & Heim, 2009).

En la investigación realizada por Belaud-Rotureau *et al.* (2002), se estudió la detección de la translocación t(11;14)(q13;q32) en 4 muestras de linfoma de células del manto y la translocación t(8;14)(q24;q32) en tres muestras de linfoma de Burkitt, ambos tipos de tumores embebidos en parafina, mediante la técnica de FISH. La t(11;14)(q13;q32) fue detectada en las cuatro muestras de linfoma de células del manto y la t(8;14)(q24;q32) se detectó en dos de las tres muestras de linfoma de Burkitt. Se concluyó que la técnica de FISH es importante para la detección directa de translocaciones asociadas a linfomas en muestras histológicas. Mientras que en un estudio realizado por Moon *et al.* (2008) se utilizó la técnica de FISH en combinación con la citogenética convencional, utilizando el bandeo tipo G, en una muestra de linfoma de Burkitt. Obteniendo una nueva anomalía cromosómica, una translocación doble del cromosoma 14, como resultado de la combinación entre la t(8;14) y la t(14;15), dándole al tumor una alta agresividad.

La técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), presenta ventajas sobre la citogenética convencional y otras técnicas moleculares como Southern Blot y PCR, por ejemplo permite el estudio de células en interfase y tiene una alta sensibilidad. La disponibilidad de sondas comerciales para la detección de rearrreglos cromosómicos ha facilitado el diagnóstico de las neoplasias hematológicas y en tumores sólidos (Tojo *et al.*, 2008). Desde la perspectiva médica, FISH puede ser aplicada para detectar anomalías genéticas como fusiones de genes, aneuploidías, pérdida de una región cromosómica o de todo el cromosoma o para monitorear la progresión de una aberración, lo que le hace útil tanto para el diagnóstico de una enfermedad genética o para sugerir un pronóstico. La técnica

FISH también puede ser aplicada en investigación de mapeo genético, en la identificación de nuevos oncogenes y rearrreglos cromosómicos que contribuyen en el desarrollo de varios tipos de cáncer. Recientemente FISH ha evolucionado para permitir un *screening* de todo el genoma de manera simultánea a través de sondas de pintado cromosómico multicolor tales como la FISH multiplex. Es por ello que esta técnica ha revolucionado la citogenética y se ha establecido como una herramienta de diagnóstico de alto potencial, sobre todo en lo que se refiere a la decisión del tipo de tratamiento para combatir el cáncer (Bishop, 2010).

CAPITULO 5: CONCLUSIONES

- Se realizó el análisis de 20 muestras de tumores sólidos aplicando en ellas la técnica FISH, haciendo uso de sondas de locus específico para la detección de rearrreglos cromosómicos específicos relacionados con los tumores en estudio.
- La técnica FISH permitió una adecuada identificación de los rearrreglos cromosómicos esperados en tejidos embebidos en parafina y en tejidos congelados. Esto se evidenció en tres casos asociados a sarcoma de Ewing, en dos casos asociados a linfoma de Burkitt, en cuatro casos asociados a neuroblastoma, en siete casos asociados a cáncer de mama y cuatro casos asociados a otros tumores sólidos como linfoma no Hodgkin.
- La comparación entre las técnicas basada en el diagnóstico proporcionado por histopatología, generó un sesgo debido a que la histopatología es una técnica de *screening* mientras que FISH utiliza una sonda de locus específico influyendo directamente en el cálculo de las características operativas de la técnica FISH obteniéndose así un valor de sensibilidad del 100%, de especificidad 33,33%, VPP del 50%, VPN del 100% y un IJ de 0,33.
- Con la prueba *Chi* cuadrado de independencia, se obtuvo un valor de $P=0,068$, lo que significó que la técnica FISH fue independiente de la técnica histopatológica pero al obtenerse una curva de ROC con un área bajo la curva

de 0,667, mostró que la técnica tiene una capacidad discriminadora menor, por lo que debería ser utilizada como complemento de las técnicas convencionales como la histopatología para obtener un mejor diagnóstico de los rearrreglos cromosómicos en tumores.

- Se obtuvo un valor de $\kappa=0,286$, que mostró una baja concordancia de la técnica FISH con respecto al estándar de oro, y un valor de $P=0,0075$ con la prueba de McNemar, mostrando diferencias en los resultados de la técnica de FISH con respecto a la histopatológica. Sin embargo en aquellas muestras en las que se obtuvo un resultado negativo para el rearrreglo cromosómico mediante la técnica en estudio, no significa que el diagnóstico histopatológico esté equivocado, ya que la causa del tumor pudo haber sido otro tipo de alteración genética.
- La técnica FISH es la más utilizada para el estudio de tumores sólidos sobre todo cuando existe un diagnóstico indeterminado mediante las técnicas convencionales. Además la identificación de los rearrreglos cromosómicos específicos en las neoplasias en estudio influye directamente en el pronóstico, tratamiento y monitoreo de los pacientes, lo que indica su gran importancia a nivel clínico.

CAPITULO 6: RECOMENDACIONES

- Para la comparación de técnicas se recomienda comparar a la técnica de FISH con sonda de locus específico con otra técnica que también detecte un rearrreglo cromosómico específico como PCR o inmunohistoquímica para que de esta manera la comparación sea más precisa.
- Se recomienda para futuras investigaciones aplicar la técnica RT-PCR en las muestras de tumores sólidos en estudio para complementar el diagnóstico sobre todo en aquellas muestras que la técnica FISH dio como resultado negativo, para poder saber exactamente el rearrreglo cromosómico causante del tumor.
- Se recomienda utilizar la técnica FISH en aquellos casos en los que el cultivo de tumores presente dificultades en la obtención de metafases apropiadas, en la obtención del cariotipo y cuando exista contaminación de las muestras.
- Se recomienda utilizar FISH para la detección de rearrreglos asociados a tumores que pueden ser muy difíciles de diagnosticar únicamente por su morfología.
- Se recomienda utilizar FISH cuando el diagnóstico inmunohistoquímico se encuentre indeterminado o equívoco como es el caso de evaluar la

sobreexpresión del gen *HER2/neu* en el cáncer de mama, para de esta manera confirmar si la paciente es positiva o negativa para la amplificación.

- Se recomienda utilizar FISH, para tomar la decisión sobre qué tratamiento es el más adecuado para el paciente debido a que mediante ésta se puede predecir la respuesta de los tumores a drogas usadas actualmente en la quimioterapia.
- Mediante la citogenética convencional es muy complejo obtener un cariotipo post tratamiento en muestras de médula ósea, es por ello que se recomienda utilizar FISH para monitorear al paciente durante y después de la terapia para saber si está dando un efecto positivo o de lo contrario cambiar de terapia.
- Al momento de aplicar el protocolo se recomienda un corte de tejido adecuado, respetar las temperaturas y realizar una buena digestión con proteasa de los tejidos ya que este es el paso clave para obtener una hibridación exitosa.
- Para mejorar la aplicación de la técnica FISH en el que se utilizan sondas de locus específico, se podrían desarrollar de manera constante nuevas sondas que detecten genes candidatos que estén involucrados en el desarrollo y progresión del tumor, para de esta manera poder aplicar a otros tipos de tumores sólidos.

CAPITULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Abbott Molecular,inc, (2000).Illinois. www.abbottmolecular.com.

Abdalla,D., Hamza, M., Kandil A., Younes L. y Sorrou A. (2009). MYCN gene amplification and DNA ploidy in peripheral neuroblastic tumors. *J Clin Oncol*, 27, 221.

ACS. (2012). *American Cancer Society*. Extraído el 3 de Marzo de 2012, desde <http://www.cancer.org>.

Advani, A. (2010). *Adult Acute Lymphocytic Leukemia: Biology and Treatment*. Cleveland:Springer.

Almeida. C, Barry. S. (2011). *Cancer: Basic Science and Clinical Aspects*. Oxford: Jhon Wiley and Sons.

Altman D., Bland J. (1994). Statistics notes: diagnostic tests 3: receiver operating characteristic plots. *BMJ*, 309,188.

Barbouti,A., Stankiewicz, P., Nusbaum,C., Cuomo,C., Cook,A., Höglund,M., Johansson,B., Hagemeijer,A., Park,S., Mitelman,F., Lupski,J., y Fioretos,T. (2004). The breakpoint region of the most common isochromosome i(17q) in human neoplasia is characterized by a complex genomic architecture with large palindormic low-copy repeats. *The American Journal of Human Genetics*, 4, 1-10.

Belaud-Rotureau, M., Parrens, M., Dubus, P., Turmo, M., Lacroute, G., Taine, L., Vago, P., De Mascarel, A., y Merlio, J. (2002). Interphase FISH analysis on histologic sections of fixed tissues for t(11;14) (q13;q32) detection in mantle cell lymphoma and t(8;14)(q24;q32) in Burkitt'slymphoma. *Ann Pathol*, 2, 145-9.

- Berková A., Dundr P., Povýšil C., Melčáková Š., y Tvrdlík D.(2008). A comparison of RT-PCR and FISH techniques in molecular diagnosis of ewing's sarcoma in paraffin-embedded tissue. Čes.-slov. Patol., 3, 67–70.
- Bernstein, M., Kovar, H., Paulussen, M., Randall, R., Schuck, A., Teot, L., y Jueyens, H. (2006). Ewing Sarcoma family of tumors: current management. The oncologist, 11,503-519.
- Bishop, R. (2010). Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance. Bioscience Horizons , 1, 85-95.
- Blancato, J., Haddad, B. (2000). Fluorescence in situ Hybridization. En M. Hong Fong, Molecular Cytogenetics.(pp.142-154). Washington D.C: Maral Dekker.
- Bleyer, A., Barr, R. (2007). Cancer in adolescents and young adults.Berlin: Springer.
- Bown, N. (2001). Neuroblastoma Tumour Genetics: Clinical and Biological aspects. JClin Pathol, 54,897-910.
- Calasanz,M., Odero, M., Martín–Subero,I., Zuhairi,I., Lahortiga, I.,Valgañón, M.,y Vizmanos, J. (2000). Técnicas de citogenética molecular:aplicaciones en el diagnóstico e investigación del cáncer. Rev. Esp. patol., 33, 357-369.
- CancerQuest. (2008). Extraído el 20 de Febrero de 2012, desde <http://www.cancerquest.org/index.cfm?lang=spanish&page=556>.
- Carroll. W, Finlay. J. (2010). Cancer in Children and Adolescents.Ontario: Jones& Bartlett learning.
- Castillo, R., Brenes, I. (2007). Sarcoma de ewing extraesqueletico en paciente femenina de 48 años. Revista medica de costa rica y centroamerica, 578, 3-7.

Cockwell,A., Gibbons,B., Moore,I., y Crolla, J. (2000). An analploid suprenumerary marker chromosome derived from chromosome 3 ascertained in a fetus with multiple malformations. *J med Genet, 37*, 807-810.

Coleman, W., Tsongalis, G. (2002). *Molecular Basis of Human Cancer*.Nueva Jersey: Humana Press.

Coppola, D. (2010). *Mechanisms of Oncogenesis: An update on tumorigenesis*. Nueva York: Springer.

Crisan, D. (2010). *Hematopathology: Genomic mechanisms of neoplastic diseases*.Nueva York: Springer.

Cuadros, M., Villegas, R. (2008). *HER2 en la selección de candidatas a tratamiento con Trastuzumab*. Sevilla: Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía.

Cueva, A., Yépez. J. (2009). *Epidemiología del cáncer en Quito 2003-2005*.Quito: aheditorial.

Dagnino, G., Rocco, E. (2009). *Coopetition Strategy: Theory, Experiments and Cases*.USA: Routledge.

Echevarría, J. (2008). Importancia de la detección temprana del cáncer. *Rev.Med.Hered,19*, 135-137.

Erkizan, H., Uversky, V., y Toretsky, J. (2010). Oncogenic Partnerships:EWS-FL1 protein interactions initiate key pathways of Ewing's Sarcoma. *Clinical Cancer Res, 16*,4077-4083.

Falini, B., Martelli, M. (2009). Anaplastic large cell lymphoma: changes in the World Health Organization classification and perspectives for targeted therapy. *Haematol, 94*, 897-900

- Figuroa, F. (2003). Linfomas No Hodgkin. Estado actual. *Gac Méd Méx*, *139*, 8139-8147.
- Fletcher, J. (2002). Cytogenetics of Solid Tumors. En C. Cooper, *Translocations in Solid Tumors*.(pp. 1-10). Texas: Eureka.
- Gang, W., Schulz, A. (2007). *Molecular Biology of Human Cancers: An advanced student's textbook*.Dordrecht: Springer.
- González N., Leonel A., Aristizábal B., y Beatriz H. (2010). Evaluación de tres métodos moleculares para el rastreo e identificación de HER2/neu. *Medicina UPB*, *29*,17-40.
- González, L., Ávila, A., y Echeverri, C. (2007). Cáncer de mama: HER2/neu, métodos diagnósticos y consideraciones clínicas. *Rev Colomb Cancerol*, *11*, 40-57.
- Greenland,C., Dastugue,N., Touriol,C., Lamant,L., Delsol,G., y Brousset,P. (2001). Anaplastic large cell lymphoma with the t(2;5)(p23;q35) NPM/ALK chromosomal translocation and duplication of the short arm of the non-translocated chromosome 2 involving the full length of the ALK gene. *J Clin Pathol*, *54*, 152–154.
- Halperin.E, Constine, L.,Tarbell, N.,y Kun,L. (2010). *Pediatric Radiation Oncology*. Filadelfia: Williams& Wilkins.
- Haschek, W. (2009). *Fundamentals of Toxicologic Pathology*. Londres: Academic Press.
- Hecht, J., Aster, J. (2000). Molecular Biology of Burkitt's Lymphoma. *J Clin Oncol*, *18*, 3707-3721.
- Heymann, D. (2009). *Bone Cancer: Progression and Therapeutic Approaches*.Oxford: Academic Press.
- Hospital Solón Espinosa Ayala.(2011). *Protocolo técnica de FISH*.Quito: SOLCA.

- Hurria, A. (2010). *Practical Geriatric Oncology*. USA: Cambridge University Press.
- Iwamoto, Y. (2007). Diagnosis and Treatment of Ewing's Sarcoma. *Jpn J Clin Oncol*, 37,79–89.
- Jeison, M., Ash, S., Halevy-Berko, G., Mardoukh, J., Luria, D., Avigad, S., Feinberg-Gorenshtein, G., Goshen, Y., Hertzal, G., Kapelushnik, J., Ben, A., Attias, D., Steinberg, R., Stein, J., Stark, B., y Yaniv, I. (2010). 2p24 Gain region Harboring MYCN Gene compared with MYCN amplified and non amplified neuroblastoma. *AJP*, 176, 2616-2625.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M., Ferlay, J., Ward, E., y Forman, D. (2010). Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61, 69-90.
- Keagle, M., Gersen, S. (2005). *The Principles of Clinical Cytogenetics*. Nueva Jersey: Humana Press.
- Khosravi, P., Pérez, G. (2006). Linfoma B difuso de células grandes. *Med Clin*, 127, 17-21.
- King, W., Proffitt, J., Morrison, L., Piper, J., Lane, D., y Seelig, S. (2000). The role of fluorescence *in situ* hybridization technologies in molecular diagnostics and disease management. *Mol Diagn.*, 5, 309-19.
- Kirkham, N., Shepherd, N. (2007). *Progress in Pathology*. UK: Cambridge university press.
- Largo, C. (2007). *Caracterización genética y genómica del mieloma múltiple*. Tesis Dr. Univ. Autónoma de Madrid, Fac. Bio.Mol. Madrid: Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas.
- Li, H., Li, G., He, X., Liu, W., Zhang, J., Yang, W. (2004). Detection of ALK gene translocation by fluorescence *in situ* hybridization in paraffin-

embedded anaplastic large cell lymphoma tissue and its significance. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi, 5, 470-3.

Lozano, M. (2007). *Sarcoma de Ewing:Nuevas Aproximaciones terapeuticas y búsqueda de dianas biológicas del oncogén EWS/FLI-1*. Tesis Dr. Univ. Autónoma de Barcelona, Fac. Medicina. Barcelona: George Town University Medical Center.

Manzitti,J., Mansilla, M. (2010). Cuál es su diagnóstico? Descripción del caso presentado en número anterior: Retinoblastoma. Arch.Argent.Pediatr.,108 , 255-257.

Mateo, S. (2007). *Sarcoma de Ewing nuevas aproximaciones terapéuticas y búsqueda de dianas biológicas del oncogén EWS/FL-1*. Tesis Dr. Univ Autonoma de Barcelona. Fac. Med. Georgetown: Georgetown university medical center.

Matsui,H.,Shinjyo,T.,y Inaba,T. (2005). Structure of the human Bim gene and its transcriptional regulation in Baf-3, interleukin-3-dependent hematopietic cells. Molecular Biology Reports, 32, 79-85.

Medeiros,L., Elenitoba-Johnson,K. (2007). Anaplastic Large Cell Lymphoma. American Society for Clinical Pathology, 127, 707-722.

Ministerio de salud. (2010). *Guía Clínica linfoma y tumores sólidos en personas menores de 15 años*. Santiago: Minsal.

Mitelman, F., Hein, S. (2009). Cancer cytogenetics.USA:Wiley-Blackwell.

Mohamed,A., Kamel A., Kayed, H., Meguid, N., y Hussein, H. (2009). Clinical study:XIST gene and pattern of X-inactivation in children with ring -X Turner syndrome. Ind Medica,13.

Moon, Y., Kim, M., y Park, G. (2008). Burkitt Lymphoma with Dual Translocation of Chromosome 14: A Novel Chromosomal Abnormality of t(8;14),t(14;15). nn Clin Lab Sci, 1,75-79.

- Murthy, S., Demetrick, D. (2005). New Approaches to Fluorescence In Situ Hybridization. En D. Taatjes, B. Mossman, *Cell and imaging techniques: Methods and protocols* (pp. 237-259). Alberta: Human Press.
- Naeim, F., Rao, N., y Grody, W. (2008). *Hematopathology: Morphology, Immunophenotype, Cytogenetics, and Molecular approaches*. USA: Academic Press.
- Nagata, Y. (2004). PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell*, 6, 117-127.
- NCI. (2010). *Instituto Nacional del Cáncer*. Extraído el 25 de Enero de 2012, desde <http://www.cancer.gov>.
- Nishio, J., Iwasaki, H., Nabeshima, K., Ishiguro, M., Isayama, T., y Naito, M. (2010). Establishment of a new human pleomorphic malignant fibrous histiocytoma cell line, FU-MFH-2 molecular cytogenetic characterization by multicolor fluorescence in situ hybridization and comparative genomic hybridization. *Journal of experimental & Clinical Cancer Research*, 29, 1-10.
- Oleas, G. (2008). *Aplicación de la técnica de hibridación por fluorescencia in situ (FISH) para el diagnóstico de la translocación BCR/ABL*. Tesis. Univ. Escuela Politécnica del Ejército. Fac. Biotecnología. Sangolquí.
- Papaioannou, G., McHugh, K. (2005). Neuroblastoma in childhood: Review and Radiological findings. *Cancer Imaging*, 5, 116-127.
- Pérez, J., Rodrigo Ramírez, R., Carpio, D., Carrasco, C., y Pérez, A. (2000). Linfoma Tiroideo. Comunicación de un caso. *Rev. Med. Chile*, 108, 783-786.

Shin, H., Thorson, P., Gu, J., y Katz, R. (2003). Detection of a subset of CD30+ anaplastic large cell lymphoma by interphase fluorescence in situ hybridization. *Diagn Cytopathol.*,2, 61-6.

Queiroga, E., Gualco,G.,Weiss,L., Dittmer, D., Araujo,I., Klumb, C., Harrington,W., y Bacchi,C. (2008). Burkitt Lymphoma in Brazil Is Characterized by Geographically Distinct Clinicopathologic Features. *Am J Clin Pathol*,130, 946-956.

Qian,X., Jin,L., Shearer,B., Ketterling,R., Jalal,S., y Lloyd,R. (2005). Molecular diagnosis of Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor in formalin-fixed paraffin-embedded tissues by RT-PCR and fluorescence in situ hybridization. *Diagn Mol Pathol...*, 14, 23-28.

Quintela, M. (2005). *Impacto pronóstico de las células tumorales residuales aisladas en cáncer de mama de alto riesgo. Tesis Dr.* Univ. Universidad Complutense de Madrid. Fac.Medicina.Madrid.

Ruiz de Adana Pérez, R. (2009). Eficacia de una prueba diagnóstica: parámetros utilizados en el estudio de un test. *JANO*, 1.736, 30-32.

Saladrigas, M. (2001). Genomic Imprinting. *Panace*,2, 57-72.

Sartelet ,H., Grossi, L., Pasquier, D., Combaret, V., Bouvier, R., Ranchère, D., Plantaz, D., Munzer, M., Philip, T., Birembaut, P., Zahm, J.,Bergeron, C., Gaillard, D., y Pasquier, B. (2002). Detection of N-myc amplification by FISH in immature areas of fixed neuroblastomas: more efficient than Southern blot/PCR. *J Pathol*,1, 83-91.

Schneider,K. (2011). *Counseling about cancer: Strategies for genetic counseling.* Nueva Jersey: John Wiley and Sons.

Schwarzacher, T., Heslop-Harrison, P. (2000). Practical in situ Hybridization. Norwich: BIOS Scientific Publishers Ltd.

Stein, H., Foss, H-D., Durkop, H., Marafioti, T., Delsol, G., Pulford, K., Pileri, S., y Falini, B. (2000). CD301 anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features. The American Society of Hematology, 96, 3681-3695.

Su, J., Yang, Y., Ma, X., You, J., DU, J., Liu, J., y Zheng, J. (2011). Detection of human epidermal growth factor receptor 2 gene in invasive breast cancer by fluorescence in situ hybridization and research of its association with tumor characteristics. Beijing Da Xue Xue Bao, 2, 199-203.

Sui, W., Ou, M., Chen J., Wan, Y., Peng, H., Qi, M., Huang, H., y Dai, Y. (2009). Comparison of immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH) assessment for Her-2 status in breast cancer. World Journal of Surgical Oncology, 7, 83.

Sudoyo, A., Hardi, F. (2011). Cytogenetics in solid tumors: Lessons from de Philadelphia Chromosome. Acta Med Indones-Indones J Intern Med, 43, 68-72.

Tojo, M. (2009). *Valor de la técnica FISH para la detección de translocaciones en linfomas no Hodgkin*. Tesis Dr. Univ. Santiago de Compostela. Fac. Anatomía Patológica y Ciencias Forenses. Santiago.

Tojo, M., Perez-Becerra, R., Vazquez-Boquete, A., García-Rivero, A., García-Caballero, T., Forteza, J., y Fraga, M. (2008). Looking for Ferns: Optimization of Digestion Pretreatment in Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Technique on Paraffin-embedded Tissues. Diagn Mol Pathol, 17, 59-63.

Tomlinson.D, Kline. N. (2009). *Pediatric Oncology Nursing: Avanced Clinical Handbook*.Berlin: Springer.

Valenzuela,B., Dean,A., y Alamillos,F. (2010). Burkitt's lymphoma: A child's case presenting in the maxilla. Clinical and radiological aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 3*, 479-482.

Volgestein, B., Kinzler, K. (2002). *The Genetic Basis Of Human Cancer*. Baltimore: Mc Graw Hill Professional.

Weinstein, J., Katzenstein, H., y Cohn, S. (2003). Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma. *the oncologist, 8*, 278-292.

Yamaguchi, U., Hasegawa, T., Morimoto, Y., Tateishi, U., Endo, M., Nakatani, F., Kawai, A., Chuman, H., Beppu, Y., Endo, M., Kurotaki, H., y Furuta, K. (2005). A practical approach to the clinical diagnosis of Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumour and other small round cell tumours sharing EWS rearrangement using new fluorescence in situ hybridisation probes for EWSR1 on formalin fixed, paraffin wax embedded tissue. *J Clin Pathol., 58*, 1051–1056.