

“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)”.

Sully E. Márquez A. ¹

¹ Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de Ciencias de la vida. Carrera de Biotecnología. Sangolquí-Ecuador. E-mail: sullym44@hotmail.com

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.

PALABRAS CLAVE: Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), Rearreglo cromosómico, tumor sólido.

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.

KEY WORDS: Fluorescence *in situ* hybridization (FISH), chromosome rearrangement, solid tumor.

INTRODUCCIÓN

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. (Almeida & Barry, 2011).

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 arreglos 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). Esta técnica 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).

El presente proyecto pretende aplicar la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) para la identificación de rearrreglos cromosómicos en tejidos en congelación y parafinados de individuos con diferentes tumores sólidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras

Se realizó un estudio descriptivo de tipo prospectivo; se evaluaron 20 muestras de pacientes con diagnóstico de diferentes tipos de tumores sólidos. Las biopsias provenían de 13 mujeres y 7 hombres, con un promedio de edad de 31 años y un

rango entre 1 y 68 años. El corte de cada muestra de tejido tanto parafinado como congelado en una placa silinizada fue proporcionado por el laboratorio de Patología del Hospital Solón Espinosa Ayala (SOLCA).

Hibridación in situ con fluorescencia (FISH)

Los protocolos utilizados en el presente trabajo tanto para tejidos congelados y tejidos embebidos en parafina fueron proporcionados por el Laboratorio de Genética del Hospital Solón Espinosa Ayala (SOLCA), en el que se utilizaron diferentes sondas para cada uno de los tumores.

Tejidos embebidos en parafina

Desparafinización de las placas

Se realizó la desparafinización utilizando el reactivo Hemo-De[®] durante 15 minutos y 10 minutos. 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.

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 durante 20 minutos (Abbott Molecular, inc, 2000), se las sumergió en solución de pretratamiento durante 30 minutos a una temperatura de 80°C. Se colocaron las placas en solución de proteasa a 37°C.

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).

Denaturación e Hibridación

El ADN blanco en la placa se denaturó a una temperatura alta utilizando formamida a 73°C durante 5 minutos. Se colocaron las placas durante 1 minuto en etanol 70%, 1 minuto en etanol 85% y 1 minuto en etanol 100%. Una vez denaturado, se colocaron 10 µl de sonda según el rearrreglo cromosómico específico a identificar en el área de interés. Se colocaron en cámara húmeda a 80°C por 10 minutos y luego a 37°C por 18 horas.

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, con 0.4X SSC/0.3% NP40 a 72°C y 2X SSC/0.3% NP40 a temperatura ambiente.

Contratinción y visualización

Para la contratinción se utilizó DAPI (4'-6-diamino-2-fenilindol) que permitió la visualización de las señales de hibridación en el microscopio de fluorescencia.

Tejidos en congelación

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.

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.

Fijación de la muestra

Para la fijación de la muestra se utilizó formalina a una concentración establecida previamente.

Denaturación e hibridación

El ADN blanco en la placa se denaturó a una temperatura alta utilizando formamida al 70% a 73°C. Una vez denaturado el ADN blanco, 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. Luego se colocaron 10µl de sonda según el rearrreglo cromosómico específico a identificar en el área de interés. Se dejaron en cámara húmeda a 80°C durante 10 minutos y a 37°C por 18 horas.

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, con 0.4X SSC/0.3% NP40 a 72°C y 2X SSC/0.1% NP40 a temperatura ambiente.

Contratinción y visualización

Para la contratinción se utilizó DAPI (4'-6-diamino-2-fenilindol) que permitió la

visualización de las señales de hibridación en el microscopio de fluorescencia.

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 contemplados en este proyecto, 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. 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.

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).

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. 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).

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). 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). 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).

Análisis y procesamiento de datos

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, tomando como prueba de oro a la histopatología 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, utilizando los software estadísticos Infostat v 2.0 y Epidat v 3.1.

RESULTADOS

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

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.

Sarcoma de Ewing

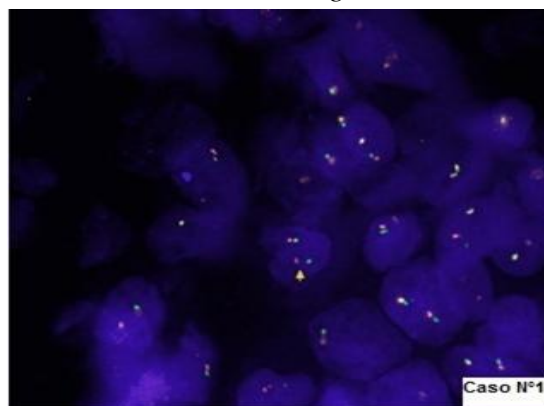


Figura 3.1. Fotografía de núcleos en interfase de una muestra de fémur con translocación 22q12 positiva en sarcoma de Ewing (TOC). La fotografía fue obtenida mediante el programa Cytovision v 7.2 mediante el microscopio de fluorescencia en 100X (SOLCA, 2011).

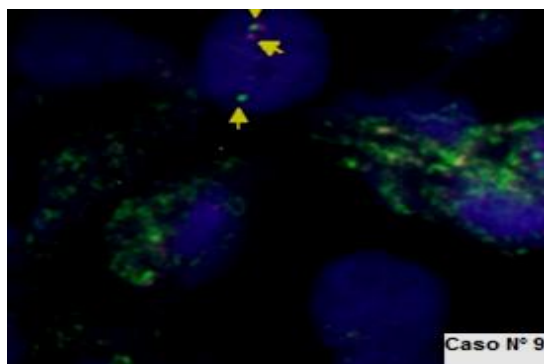


Figura 3.2. Fotografía de núcleos en interfase de una muestra de origen retroperitoneal con translocación 22q12 positiva en sarcoma de Ewing (FFPE). La fotografía fue obtenida mediante el programa Cytovision v 7.2 mediante el microscopio de fluorescencia en 100X (SOLCA, 2011).

Linfoma de Burkitt

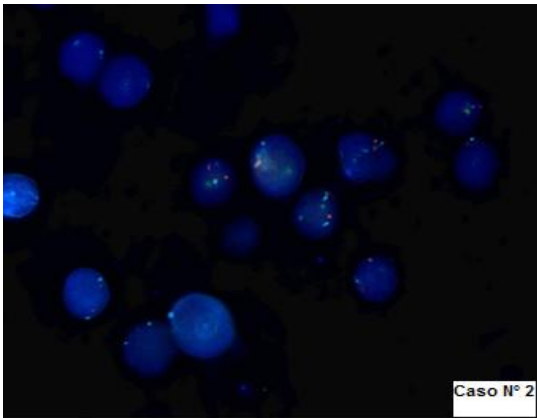


Figura 3.3. Fotografía de núcleos en interfase de una muestra de ganglio inguinal con translocación 8q14 negativa en linfoma de Burkitt (FFPE). La fotografía fue obtenida mediante el programa Cytovision v 7.2 mediante el microscopio de fluorescencia en 100X (SOLCA, 2011).

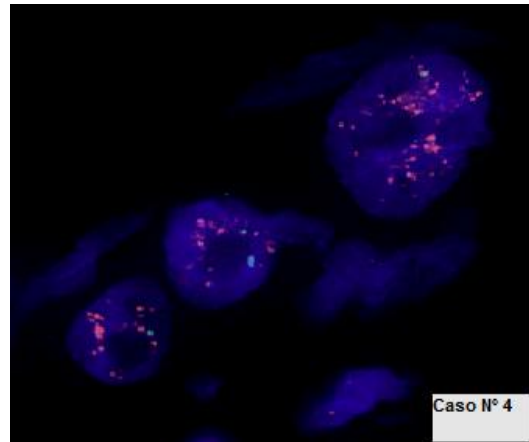


Figura 3.5. Fotografía de núcleos en interfase de una muestra de mama con amplificación positiva para el gen *HER2/neu* en cáncer de Mama (FFPE). La fotografía fue obtenida mediante el programa Cytovision v 7.2 mediante el microscopio de fluorescencia en 100X (SOLCA, 2011).

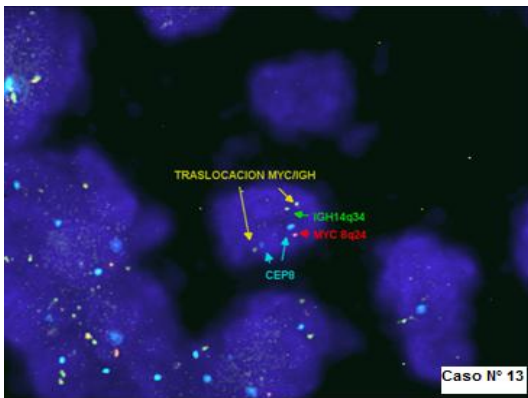


Figura 3.4. Fotografía de núcleos en interfase de una muestra de ganglio con translocación 8q14 positiva en linfoma de Burkitt (TOC). La fotografía fue obtenida mediante el programa Cytovision v 7.2 mediante el microscopio de fluorescencia en 100X (SOLCA, 2011).

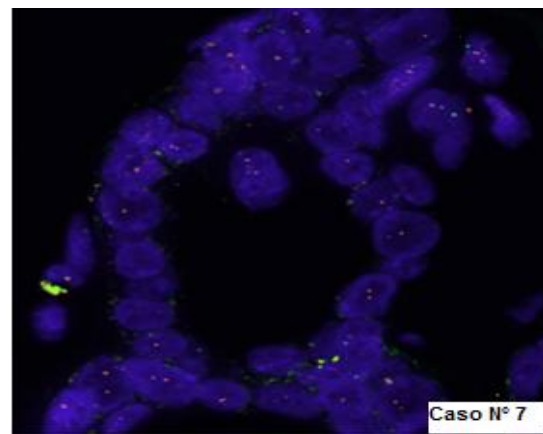


Figura 3.6. Fotografía de núcleos en interfase de una muestra de mama con amplificación negativa para el gen *HER2/neu* en cáncer de Mama (FFPE). La fotografía fue obtenida mediante el programa Cytovision v 7.2 mediante el microscopio de fluorescencia en 100X (SOLCA, 2011).

Cáncer de Mama

Neuroblastoma

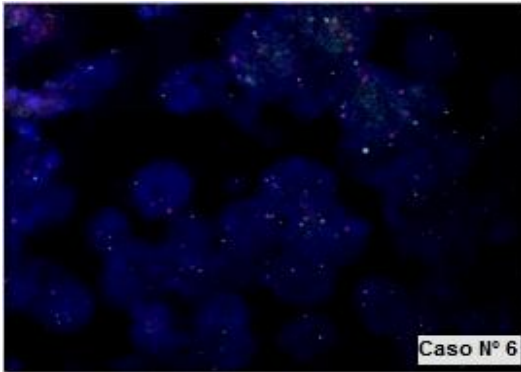


Figura 3.7. Fotografía de núcleos en interfase de una muestra de origen retroperitoneal con amplificación negativa del gen *N-MYC* en neuroblastoma (FFPE). La fotografía fue obtenida mediante el programa Cytovision v 7.2 mediante el microscopio de fluorescencia en 100X (SOLCA, 2011).

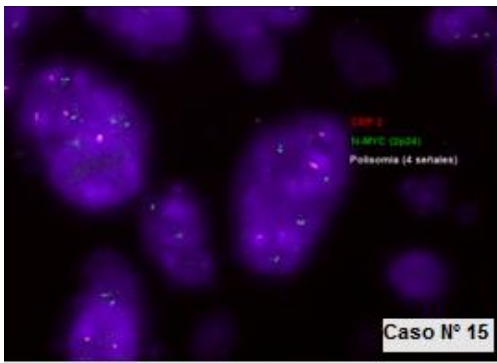


Figura 3.8. Fotografía de núcleos en interfase de una muestra de origen retroperitoneal con amplificación negativa del gen *N-MYC* en neuroblastoma (TOC). La fotografía fue obtenida mediante el programa Cytovision v 7.2 mediante el microscopio de fluorescencia en 100X (SOLCA, 2011).

Otros tumores sólidos

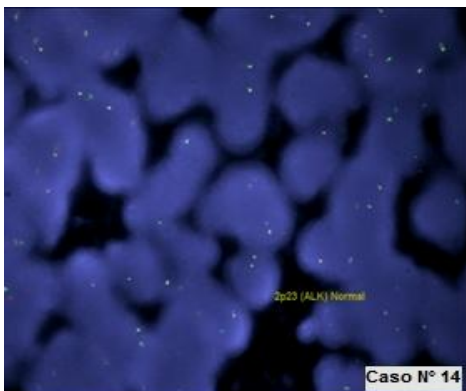


Figura 3.9. Fotografía de núcleos en interfase de una muestra de ganglio retroperitoneal con translocación 2p23 ALK negativa en linfoma No Hodgking de células pequeñas (TOC). La fotografía fue obtenida mediante el programa Cytovision v 7.2 mediante el microscopio de fluorescencia en 100X (SOLCA, 2011).

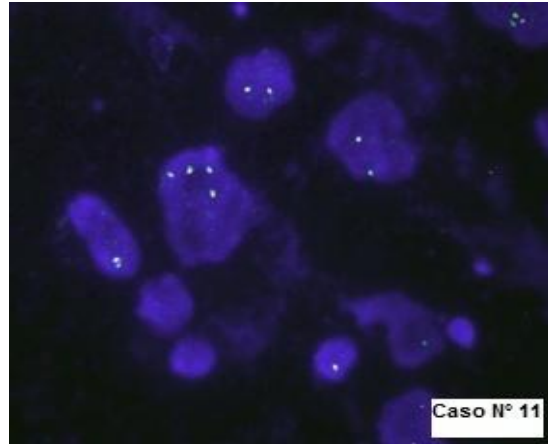


Figura 3.10. Fotografía de núcleos en interfase de una muestra retroocular con translocación 2p23 ALK negativa, correspondiente a un caso de retinoblastoma (TOC). La fotografía fue obtenida mediante el programa Cytovision v 7.2 mediante el microscopio de fluorescencia en 100X (SOLCA, 2011).

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 rearrreglo en estudio y doce muestras (60%) fueron negativas para el rearrreglo en estudio. Dentro de los rearrreglos 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*).

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)

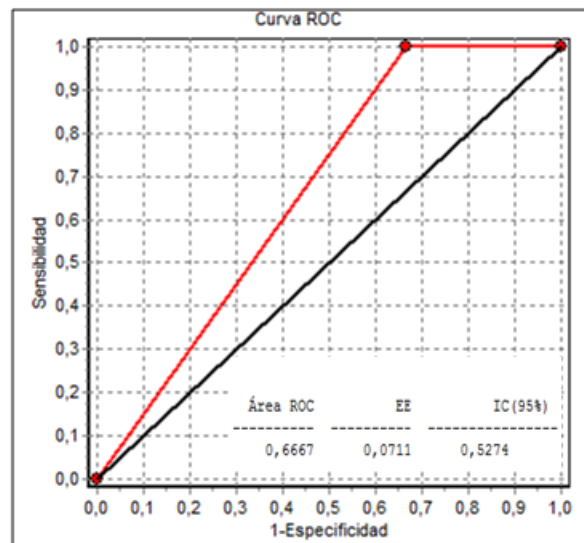


Figura 3.11. Curva de ROC de FISH vs. Histopatología (*gold standard*), obtenido mediante el software estadístico EPIDAT v3.1 (2012).

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 Mutifocal	+	+
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	+	+

+: Positivo; - : Negativo

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).

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

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

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

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.

Figueroa (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 discriminatoria 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 discriminatoria 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-FLI* 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 cardiotoxicos 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 neuroblasticos 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 minutos, 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 anormalidad 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 anormalidades 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).

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 discriminatoria 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.

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>.

- 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.
- 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's lymphoma. *Ann Pathol*, 2, 145-9.
- Berková A., Dundr P., Povýšil C., Melčáková Š., y Tvrđík 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.
- Calasanz,M., Odero, M., Martín-Subero,I., Zuhair,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.
- 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.
- Figueroa, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

Manzitti, J., Mansilla, M. (2010). Cuál es su diagnóstico? Descripción del caso presentado en número anterior: Retinoblastoma.

Arch. Argent. Pediatr., 108, 255-257.

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.

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). Ann 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.

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.

Ruiz de Adana Pérez, R. (2009). Eficacia de una prueba diagnóstica: parámetros utilizados en el estudio de un test. JANO, 1736, 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.

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 the 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., Garcí'a-Rivero, A., Garcí'a-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.

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.

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

