

## La citogenética molecular en el año 2000

F. J. Novo Villaverde

*Departamento de Genética.  
Facultad de Ciencias. Universidad de Navarra*

Uno de los datos que suele sorprender a los alumnos de Genética es que el número correcto de cromosomas de la especie humana no se llegó a determinar con certeza hasta una fecha tan tardía como 1956, prácticamente tres años después de que Watson y Crick describiesen el modelo de la doble hélice para la estructura del ADN. Resulta todavía más llamativo que las técnicas de bandeo no se aplicasen al estudio de los cromosomas humanos hasta comienzos de los años 70, de manera que hubo que esperar a 1971 para que se estableciese en la Conferencia de París el primer consenso sobre la confección del cariotipo humano mediante bandas G, que hoy en día resulta tan familiar a cualquier estudiante o profesional biomédico.

En los 30 años transcurridos desde entonces, la citogenética ha avanzado de manera espectacular en buena medida gracias a la combinación de las técnicas citológicas convencionales con la tecnología del ADN recombinante que ha emergido en estos últimos decenios. Gracias a esta sinergia, hoy podemos complementar la citogenética convencional con técnicas enormemente potentes que nos permiten detectar alteraciones a nivel molecular, y que suelen agruparse bajo una nueva disciplina denominada citogenética molecular.

Sin duda, la citogenética onco-hematológica es uno de los campos que se ha beneficiado especialmente de estos avances. Buena muestra de ello es, por ejemplo, la concesión del premio Lasker (considerado por muchos como la antesala del Nobel) en 1998 a Peter Nowell, Janet Rowley y Alfred

Knudson por sus respectivas contribuciones a la genética del cáncer. Nowell fue el primero en describir el cromosoma Philadelphia en pacientes con leucemia mieloide crónica, en los años en los que todavía no se utilizaban técnicas de bandeo cromosómico. Posteriormente, la Dra. Rowley describió por primera vez una translocación asociada a una leucemia (la que afecta a los cromosomas 8 y 21 en la leucemia mieloblástica aguda) e identificó el cromosoma Philadelphia como una translocación entre los cromosomas 9 y 22. Desde entonces, la citogenética ha seguido identificando alteraciones cromosómicas recurrentes asociadas a determinados procesos hematológicos. Hoy en día, la citogenética molecular abre unas perspectivas diagnósticas nuevas, facilita la monitorización y proporciona una información valiosísima para determinar el pronóstico y orientar el tratamiento de numerosas neoplasias hematológicas, con un indudable beneficio para el paciente.

Desde su constitución alrededor de la persona de Don Álvaro del Amo, verdadero pionero de la genética humana en este país, el Departamento de Genética de esta Universidad ha trabajado para acercar los avances en esta disciplina a la práctica médica. Durante los últimos 10 años, bajo el impulso y la visión del profesor Arturo Gullón, este Departamento se ha especializado en el estudio de las alteraciones citogenéticas y moleculares de patologías hematológicas, con la meta clara de incorporar al diagnóstico las nuevas técnicas que constantemente surgen en un campo especialmente dinámico. Este esfuerzo nos ha llevado a familiari-

## EDITORIAL

zarnos con una tecnología compleja y exigente, pero enormemente gratificante y que -por otra parte- nos permite compaginar la actividad diagnóstica diaria con la innovación tecnológica y la investigación básica. Ilustraré lo que acabo de decir con algunos ejemplos.

La *hibridación in situ con sondas de ADN marcadas con un fluorocromo*, llamada «FISH», es el exponente más claro y mejor conocido de la nueva citogenética molecular. Esta técnica se hizo popular en los años 80 como método para el mapeo físico de secuencias de localización genómica desconocida. En citogenética constitucional y hematológica, la hibridación de sondas específicas sobre metafases de pacientes permite detectar alteraciones cromosómicas que no serían visibles por métodos citogenéticos convencionales. La lista de sondas que utilizamos en el laboratorio aumenta constantemente, y es de esperar que esta tendencia continúe a medida que el Proyecto Genoma Humano vaya desvelando la secuencia y posición de nuevos genes asociados con procesos patológicos.

Para determinados tipos de análisis en los que únicamente queremos determinar el número de copias de una determinada secuencia de DNA en una población celular concreta, la posibilidad de utilizar la técnica de *FISH sobre núcleos interfásicos* ha supuesto un notable avance, puesto que no es necesario obtener un cultivo de células de la médula ósea de un paciente para conseguir una buena preparación de cromosomas metafásicos. Esto acelera mucho el análisis y facilita la toma de decisiones en el entorno clínico, con el consiguiente beneficio para los pacientes. En el campo de las leucemias, esta modificación de la técnica es especialmente útil para detectar translocaciones conocidas, como por ejemplo la ya mencionada 9;22 de la leucemia mieloide crónica. Así, hoy podemos usar dos sondas distintas en una misma reacción de hibridación: una sonda marcada con un fluorocromo verde que va dirigida contra el gen BCR y otra sonda

marcada con un fluorocromo rojo y dirigida contra el gen ABL. Las células normales muestran dos señales para cada una de las sondas, correspondientes a las dos copias de cada gen que lleva nuestro genoma, mientras que las células portadoras de la translocación muestran una señal de cada sonda junto con una tercera señal de fusión, que aparece en un color diferente. Otro ejemplo de las posibilidades de esta tecnología es la reciente incorporación a nuestra lista de pruebas diagnósticas de la detección de *amplificación del oncogén HER2/neu* mediante FISH, gracias a la colaboración con el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Navarra. En esta aplicación concreta, conseguimos cuantificar el número de señales (y, por tanto, de copias genómicas de este oncogén) que aparecen en núcleos interfásicos en preparaciones histológicas obtenidas de bloques de parafina. Esta determinación complementa la información obtenida mediante inmunohistoquímica, y tiene un alto valor pronóstico en pacientes con cáncer de mama. El lector interesado puede acceder a la dirección <http://www.unav.es/genetica/gallery.html> y ver algunos ejemplos de las técnicas mencionadas.

En otras ocasiones, sospechamos que existe una alteración cromosómica críptica sin tener una idea muy clara de las regiones genómicas que pueden estar reordenadas. Ante esto, el citogenetista molecular tiene la posibilidad de pintar un cromosoma concreto mediante métodos moleculares, con determinadas mezclas de sondas fluorescentes que hibridan con todo un cromosoma y sólo con ese cromosoma (el método recibe el nombre de «*chromosome painting*»). Si existe alguna pequeña alteración cromosómica, el fragmento «pintado» aparece en una posición diferente a la habitual. La mayor sofisticación de esta técnica permite pintar cada uno de los cromosomas en un color distinto, con lo que en un sólo análisis se pueden detectar todas las alteraciones posibles incluso aunque no sean visibles por métodos con-

vencionales. Esta técnica es el llamado «SKY-FISH» (spectral karyotyping) y es quizás lo más novedoso en citogenética molecular, pero el equipo necesario para el análisis de imagen es muy costoso y por eso la técnica sólo se realiza con fines de investigación en los centros más avanzados. Nuestro Departamento trabaja en estrecha colaboración con el laboratorio de la Dra. Rowley para aplicar esta técnica a neoplasias hematológicas, y es de prever que en un futuro no muy lejano contemos con los medios materiales para poder llevarla a cabo en Pamplona.

Una de las variaciones tecnológicas más interesantes de los años 90 es la llamada *hibridación genómica comparativa* (abreviada como CGH), que permite comparar directamente dos genomas completos y detectar la existencia de regiones cromosómicas ausentes o amplificadas en uno de ellos respecto del otro. En la versión más habitual de esta técnica, ADN genómico de un sujeto normal se marca con un fluorocromo y ADN genómico de la muestra que queremos analizar se marca con otro fluorocromo distinto. Una mezcla equimolar de ambos se hibrida sobre una metafase normal y se cuantifica la intensidad de la señal obtenida con cada una de las sondas, utilizando métodos de análisis de imagen bastante sofisticados. Si ambos ADN son normales, el cociente de intensidades debe mantenerse en torno a 1, mientras que la presencia de regiones genómicas amplificadas o delecionadas en el ADN de la muestra se traducirá en un cociente de intensidades significativamente distinto de 1 en esa región. Esta técnica es especialmente útil para detectar alteraciones cromosómicas en tumores sólidos, habitualmente muy difíciles de estudiar por citogenética convencional. La implementación de esta técnica en el Departamento nos ha permitido ampliar nuestro campo de interés a los tumores sólidos, y actualmente la estamos aplicando a la identificación de alteraciones genómicas recurrentes en cáncer de mama, tumores intracraneales y otros tumores sólidos.

No quiero terminar sin citar nuestra más reciente adquisición al arsenal de técnicas citogenéticas moleculares: *FICTION*. Se trata de combinar multi-FISH (FISH para varios genes, utilizando varias sondas a la vez) con técnicas inmunocitológicas frente a determinados marcadores de membrana que permitan identificar un tipo celular en una mezcla compleja de células. Este es un problema frecuente en determinadas neoplasias hematológicas, en que queremos analizar los cambios cromosómicos en células tumorales que se encuentran mezcladas con células normales en médula ósea o sangre periférica. Gracias a la colaboración con el Departamento de Genética de la Universidad de Kiel, pionero en esta tecnología, esperamos poder analizar hasta ocho regiones genómicas distintas en una misma reacción.

Como ya he mencionado, todo lo dicho hasta ahora persigue un único fin: mejorar la calidad de los medios diagnósticos a disposición de los pacientes oncológicos, y facilitar la toma de decisiones terapéuticas mediante la obtención de información con valor pronóstico. Actualmente, el Departamento estudia alrededor de 1.500 muestras al año, procedentes de Hospitales de la Comunidad Navarra y de Comunidades Autónomas vecinas. Nuestra ilusión y nuestro reto es poner a disposición de todos ellos las tecnologías más avanzadas en esta parcela concreta, como parte del servicio que toda Universidad debe prestar a la sociedad en la que está inmersa y de la que nace.

Alguien dijo que detrás de una gran obra siempre hay una persona cansada. Creo que no exagero si digo que en este caso han sido muchas las personas que han empleado sus mejores energías a lo largo de muchos años. Es obvio que el alto grado de especialización que hemos alcanzado no se puede explicar solamente por la excelente preparación técnica del personal del laboratorio. Pienso que, por encima de todo, hay un equipo humano que durante años ha mostrado una ilusión inquebrantable y una calidad humana que constituyen un auténtico

