



**CATÁLOGO DE SERVICIOS  
PRUEBAS DE APOYO AL DIAGNÓSTICO**

**CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES ONCOLÓGICAS**

Melchor Fernández Almagro, 3, 28929 MADRID  
Tlf. +34 912246900; [www.cnio.es](http://www.cnio.es)

## ÍNDICE

<b>Unidad de Diagnóstico Molecular</b>	<b>3</b>
<b>Segundas Opiniones en Patología Diagnóstica</b>	<b>12</b>
<b>Genética Humana</b>	<b>16</b>
<b>Unidad de Genotipado Humano</b>	<b>25</b>
<b>Unidad de Citogenética</b>	<b>27</b>

# UNIDAD DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR

## CATÁLOGO DE SERVICIOS (Manual de muestras primarias)

Elaborado por:  
Luis Lombardía/ Jefe de Unidad  
Fecha: Febrero 2010

Revisado /Aprobado por:  
Miguel Á.Piris / Dtr. Progrm. Patología Molecular  
Fecha: Febrero2010

## ÍNDICE

- Translocación t(9;22) o gen de fusión *BCR-ABL*
- Translocación t(14;18) o gen de fusión *BCL2-IGH*
- Translocación t(8;21) o gen de fusión *AML1- ETO*
- Translocación t(15;17) o gen de fusión *PML-RARA*
- Inversión 16 o gen de fusión *MYH11-CBFB*
- Determinación de la inestabilidad génica o detección de microsatélites (MSI)
- Determinación de la mutación en el GEN *JAK2*
- Mutaciones en el gen de fusión *BCR-ABL*
- Mutaciones en el gen *EGFR*
- Mutación en el gen *GATA1*
- Mutación en el gen *KRAS*
- Mutación en el gen *BRAF*
- Mutaciones en el gen *FLT3*
- Mutación en el oncogen *KIT*
- Mutación en el oncogen *PDGFRA*
- Mutaciones en el gen *TNFRSF6 (FAS o CD95)*
- Mutaciones en el gen *NPM1*
- Mutación en el oncogen *PI3K*
- Reordenamientos del gen *IGH*
- Reordenamientos de los genes *TCR gamma* y *TCR beta*
- Reordenamientos del gen *IGK*

### Translocación t(9;22) o gen de fusión BCR-ABL

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad (*)	t respuesta
La translocación t(9;22) o cromosoma de Filadelfia está presente en prácticamente todos los casos de leucemia mieloide crónica (95%) y su presencia tiene importancia diagnóstica. Esta translocación también se encuentra presente en algunos casos de leucemia linfocítica aguda tipo pre-B, estando asociada con enfermedad agresiva y mal pronóstico. Técnica útil para el diagnóstico de leucemia mieloide crónica y determinación de enfermedad mínima residual después del tratamiento. <i>Indicación</i>	Determinación de la presencia y cuantificación de los niveles de expresión de las variantes p190 y/o p210 del gen de fusión <i>BCR-ABL</i> o <i>Translocación t(9;22)</i> mediante PCR cuantitativa a tiempo real	Sangre periférica	5 ml	15 días
		Aspirado de médula ósea	2ml	
		RNA	5 µg	

### Translocación t(14;18) o gen de fusión BCL2-IGH

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad (*)	t respuesta
La translocación t(14;18) está asociada con linfoma folicular aunque también se encuentra presente en algunos casos de linfomas B de células grandes. Su presencia tiene importancia diagnóstica en linfoma folicular. Técnica útil para determinación de enfermedad mínima residual después del tratamiento. El tamaño de la secuencia de fusión amplificada normalmente se utiliza para demostrar la identidad clonal entre muestras pre y post tratamiento de un mismo paciente.	Determinación de la presencia, tamaño y cuantificación de la expresión de las variantes MBR y mcr del gen de fusión <i>BCL2-IGH</i> o translocación t(14;18) mediante PCR cuantitativa a tiempo real. El 60% de los casos presenta el punto de corte MBR (major breakpoint region) y el 5-10% el punto de corte mcr (minor cluster region).	Sangre periférica	5 ml	15 días
		Aspirado de médula ósea	2ml	
		Tejido parafinado	<u>Bloques</u> 60% de células tumorales. <u>Secciones</u> – 5 secciones de 5 µm de espesor c/u <i>Mayor cantidad posible</i>	
		Tejido congelado		
		DNA genómico	5 µg	

### Translocación t(8;21) o gen de fusión AML1-ETO

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad (*)	t respuesta
La translocación t(8;21) es una de las alteraciones cromosómicas más frecuentes en leucemias agudas, especialmente en el subtipo M2. Indica un pronóstico bueno. Técnica útil para diagnóstico y determinación de enfermedad mínima residual después de tratamiento	Determinación de la presencia del gen de fusión <i>AML1-ETO</i> , o translocación t(8;21)(q22;q22) mediante PCR cuantitativa a tiempo real	Sangre periférica	5 ml	15 días
		Aspirado de médula ósea	2ml	
		RNA	5 µg	

### Translocación t(15;17) o gen de fusión PML-RARA

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad (*)	t respuesta
La translocación t(15;17) especialmente asociada con leucemia promielocítica aguda (M3). Su presencia indica un pronóstico bueno. Técnica útil para diagnóstico y determinación de enfermedad mínima residual después del tratamiento	Determinación de la presencia y cuantificación de las variantes bcr1, bcr2 y bcr3 del gen de fusión PML-RARA o translocación t(15;17) (q22;q11.2-q12) mediante PCR cuantitativa a tiempo real	Sangre periférica	5 ml	15 días
		Aspirado de médula ósea	2ml	
		RNA	5 µg	

### Inversión 16 o gen de fusión MYH11-CBFB

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad (*)	t respuesta
La inversión inv(16) es característica de leucemias agudas del subtipo M4Eo. Indica un pronóstico bueno. Técnica útil para la determinación de enfermedad mínima residual después del tratamiento.	Determinación de la presencia y cuantificación de los niveles de expresión de las variantes A, D y E de la inversión en el cromosoma 16, inv(16)(p13q22) mediante PCR cuantitativa a tiempo real	Sangre periférica	5 ml	15 días
		Aspirado de médula ósea	2ml	
		RNA	5 µg	

### Determinación de la inestabilidad génica o detección de microsatélites (MSI)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad (*)	t respuesta
La existencia de inestabilidad génica o de microsatélites en cáncer de colon, endometrio y gástrico representa factor de predicción de la eficacia terapéutica de la quimioterapia coadyuvante con fluorouracilo	Determinación de inestabilidad de microsatélites mediante los marcadores BAT25, BAT26, D5S346, D17S250, D2S123 recomendados por el Instituto Nacional de Cáncer Americano (National Cancer Institute, NCI), y los marcadores monomórficos adicionales NR21, NR22 y NR24. La técnica se realiza mediante PCR fluorescente múltiple y electroforesis capilar	Sangre periférica	5 ml	15 días
		Aspirado de médula ósea	2ml	
		Tejido parafinado	<i>Bloques</i> 60% de células tumorales. <i>Secciones</i> – 5 secciones de 5 µm de espesor c/u <i>Mayor cantidad posible</i>	
		Tejido congelado		
		DNA genómico	5 µg	

### Mutación en el gen JAK2

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad (*)	t respuesta
La determinación de mutaciones en el dominio auto inhibitorio JH2 de la kinasa JAK2 esta indicado en pacientes con sospecha de síndromes mieloproliferativos crónicos (Policitemia Vera, Metaplasia Mieloide, y/o Trombocitemia esencial). En estudios retrospectivos se ha mostrado que los pacientes con mutaciones tienen significativamente una mayor frecuencia de complicaciones (fibrosis secundaria, hemorragias y trombocitosis) y que necesitan más frecuentemente tratamiento citoreductor que los pacientes con el gen JAK2 silvestre.	Determinación de la existencia de mutaciones en los exones 12 y/o 14 del gen JAK2 mediante PCR o secuenciación	Sangre periférica	5 ml	20 días
		Aspirado de médula ósea	2ml	
		DNA genómico	5 µg	

### Mutación en el gen de fusión BCR- ABL

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad (*)	t respuesta
La presencia de mutaciones en el dominio kinasa del gen de fusión BCR-ABL está asociada con resistencia al tratamiento con Imatinib. Prueba indicada en pacientes que no responden o que recaen después del tratamiento con Imatinib	Determinación de la existencia de mutaciones en el dominio tirosina kinasa del gen BCR-ABL mediante PCR y secuenciación	Sangre periférica	5 ml	20 días
		Aspirado de médula ósea	2ml	
		DNA genómico	5 µg	

### Mutación en el gen EGFR

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad (*)	t respuesta
La existencia de mutaciones en el gen EGFR está asociada con una sensibilidad al tratamiento con inhibidores tirosina kinasa (Gefitinib, Iresa) en pacientes con carcinoma de pulmón de célula no pequeña (NSCLC) quimioresistentes. La detección de mutaciones en este gen es un factor de predicción de la eficacia terapéutica y permite la detección de candidatos al tratamiento con Gefitinib	Determinación de la existencia de mutaciones en los exones 18,19, 20 y 21 del gen EGFR mediante PCR y secuenciación	Tejido parafinado	<u>Bloques</u> 60% de células tumorales. <u>Secciones</u> – 5 secciones de 5 µm de espesor c/u	20 días
		Tejido congelado	Mayor cantidad posible	
		DNA genómico	5 µg	

### Mutación en el gen GATA1

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad (*)	t respuesta
La presencia de mutaciones somáticas en el gen <i>GATA1</i> permite detectar un mayor riesgo de desarrollar una leucemia megacarioblástica aguda (DE-AML M7) en recién nacidos con Síndrome de Down	Determinación de la existencia de mutaciones en los exones 1y 2 del gen <i>GATA1</i> mediante PCR y secuenciación	Tejido parafinado	<u>Bloques</u> 60% de células tumorales. <u>Secciones</u> – 5 secciones de 5 µm de espesor c/u	20 días
		Tejido congelado	Mayor cantidad posible	
		DNA genómico	5 µg	

### Mutación en el gen KRAS

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad (*)	t respuesta
La presencia de mutaciones en el gen <i>KRAS</i> , mutuamente excluyentes de mutaciones en el gen <i>EGFR</i> , permite predecir una resistencia a los tratamientos anti- <i>EGFR</i> (Cetuximab y panitumumab) en pacientes con cáncer colorrectal metastático refractario a la quimioterapia	Determinación de la existencia de mutaciones en el exón 2 del gen <i>KRAS</i> mediante PCR y secuenciación.	Tejido parafinado	<u>Bloques</u> 60% de células tumorales. <u>Secciones</u> – 5 secciones de 5 µm de espesor c/u	20 días
		Tejido congelado	Mayor cantidad posible	
		DNA genómico	5 µg	

### Mutación en el gen BRAF

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad (*)	t respuesta
Las mutaciones en el gen <i>BRAF</i> han sido descritas como mutuamente excluyentes de las mutaciones en el gen <i>KRAS</i> . Su detección podría justificarse para predecir una eventual resistencia a los tratamientos de pacientes con cáncer colorrectal metastático en caso de no detectarse mutaciones en el gen <i>KRAS</i> .	Determinación de la existencia de mutaciones en el exón 15 del gen <i>BRAF</i> mediante PCR y secuenciación	Tejido parafinado	<u>Bloques</u> 60% de células tumorales. <u>Secciones</u> – 5 secciones de 5 µm de espesor c/u	20 días
		Tejido congelado	Mayor cantidad posible	
		DNA genómico	5 µg	

### Mutaciones en el gen FLT3

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad (*)	t respuesta
La presencia de mutaciones que activan de forma constitutiva al gen <i>FLT3</i> en leucemias agudas es un indicativo de mal pronóstico	Determinación de la presencia de duplicaciones internas (ITD) y de la mutación D835 en el gen <i>FLT3</i> mediante PCR marcado con fluorescencia, corte con enzima de restricción y electroforesis capilar	Sangre periférica	5 ml	15 días
		Aspirado de médula ósea	2ml	
		Tejido parafinado	<u>Bloques</u> 60% de células tumorales. <u>Secciones</u> – 5 secciones de 5 µm de espesor c/u Mayor cantidad posible	
		Tejido congelado		
		DNA genómico	5 µg	

### Mutación del oncogen KIT

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad (*)	t respuesta
La existencia de mutaciones en el oncogen <i>KIT</i> está asociada a la presencia de tumores gastrointestinales, leucemia mieloide aguda y mastocitosis. Las mutaciones en los dominios extracelular y auto inhibitorio están asociadas con una respuesta buena al tratamiento con Imatinib. Por el contrario, las mutaciones en los dominios kinasa están asociadas con resistencia al tratamiento con Imatinib.	Determinación de la existencia de mutaciones en los exones 9 (dominio extracelular), 11 (dominio yuxtamembrana auto inhibitorio), 13 (dominio kinasa 1) y 17 (dominio kinasa 2) del oncogen <i>KIT</i> mediante PCR y secuenciación	Tejido parafinado	<u>Bloques</u> 60% de células tumorales. <u>Secciones</u> – 5 secciones de 5 µm de espesor c/u	20 días
		Tejido congelado	Mayor cantidad posible	
		DNA genómico	5 µg	

### Mutación del oncogen PDGFRA

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad (*)	t respuesta
La existencia de mutaciones en el oncogen <i>PDGFRA</i> está asociada con la presencia de tumores gastrointestinales (GISTs) patomorfológicamente malignos o de alto riesgo, y son mutuamente excluyentes de la mutaciones en el encogen <i>KIT</i> . Las mutaciones en los exones 12 y 18 están asociadas con GISTs de origen gástrico y de morfología epitelioide. Las mutaciones en el exón 14 están asociadas con GISTs en niños y adultos jóvenes. Tumores con la mutación D842V (exon 18) no responden al tratamiento con Imatinib	Determinación de la existencia de mutaciones en los exones 12 (dominio yuxtamembrana), 14 (dominio kinasa 1) y 18 (dominio kinasa 2) del oncogen <i>PDGFRA</i> mediante PCR y secuenciación	Tejido parafinado	<u>Bloques</u> 60% de células tumorales. <u>Secciones</u> – 5 secciones de 5 µm de espesor c/u	20 días
		Tejido congelado	Mayor cantidad posible	
		DNA genómico	5 µg	

### Mutaciones en el gen TNFRSF6 (FAS o CD95)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad (*)	t respuesta
La existencia de mutaciones en el gen TNFRSF6 ((ya sea del dominio extracelular o intracelular de CD95) esta asociada a 90% de los casos de síndrome linfoproliferativo autoinmune (SLPA) de tipo 1A, una enfermedad crónica que se hereda de forma autosómica dominante y afecta a niños de 2 a 60 meses. Se ha demostrado además que la presencia de mutaciones en este gen son compatibles con una supervivencia a largo término. Finalmente se ha señalado el hallazgo de déficits de apoptosis mediada por Fas en ausencia de mutaciones del gen Fas como rasgo familiar predisponente al padecimiento de enfermedades autoinmunes y cáncer (Ramenghi U, et al. 2000).	Determinación de la existencia de mutaciones en los exones 1 a 9 del gen TNFRSF6 mediante PCR y secuenciación bi-direccional	Tejido parafinado	<u>Bloques</u> 60% de células tumorales. <u>Secciones</u> – 5 secciones de 5 µm de espesor c/u	20 días
		Tejido congelado	Mayor cantidad posible	
		DNA genómico	5 µg	

### Mutaciones en el gen NPM1

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad (*)	t respuesta
Las mutaciones en el gen de la nucleofosmina (NPM1) han sido detectadas en alrededor del 50% de los adultos con Leucemia Myeloide Aguda (LMA) y cariotipo normal. Su presencia asociada a la ausencia de mutaciones (duplicaciones internas en tándem) en el gen FLT3 pronostica una evolución favorable es esos pacientes.	Determinación de la presencia de mutaciones en el exón 12 del gen NPM1 mediante PCR y secuenciación.	Sangre periférica	5 ml	15 días
		Aspirado de médula ósea	2ml	
		DNA genómico	5 µg	

### Mutación del oncogen PI3K

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad (*)	t respuesta
Las mutaciones en el oncogen PI3K han sido observadas en un número importante de tipos de cáncer, incluyendo los gastro-intestinales y los de pulmón y mama. La presencia de mutaciones en PI3K es útil para predecir la respuesta a terapia de los pacientes.	Determinación de la existencia de mutaciones en los exones 9 y 20 del gen PI3K mediante PCR y secuenciación.	Tejido parafinado	<u>Bloques</u> 60% de células tumorales. <u>Secciones</u> – 5 secciones de 5 µm de espesor c/u	20 días
		Tejido congelado	Mayor cantidad posible	
		DNA genómico	5 µg	

### Reordenamientos IGH

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad (*)	t respuesta
La presencia de reordenamientos clonales del gen <i>IGH</i> es sugestiva de la presencia de un linfoma de células B. Técnica útil como apoyo al diagnóstico histopatológico	Determinación de la presencia de clonalidad en las regiones FR1, FR2, FR3 y DH-JH del gen <i>IGH</i> mediante PCR marcado con fluorescencia y electroforesis capilar	Sangre periférica	5 ml	10 días
		Aspirado de médula ósea	2ml	
		Tejido parafinado	<u>Bloques</u> 60% de células tumorales. <u>Secciones</u> – 5 secciones de 5 µm de espesor c/u Mayor cantidad posible	
		Tejido congelado	Mayor cantidad posible	
		DNA genómico	5 µg	

### Reordenamientos TCR beta/gamma

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad (*)	t respuesta
La presencia de reordenamientos clonales de los genes <i>TCR</i> es sugestiva de la presencia de un linfoma de células T. Técnica útil como apoyo al diagnóstico histopatológico	Determinación de la presencia de clonalidad en los gen <i>TCR</i> beta y gamma mediante PCR marcado con fluorescencia y electroforesis capilar	Sangre periférica	5 ml	10 días
		Aspirado de médula ósea	2ml	
		Tejido parafinado	<u>Bloques</u> 60% de células tumorales. <u>Secciones</u> – 5 secciones de 5 µm de espesor c/u Mayor cantidad posible	
		Tejido congelado	Mayor cantidad posible	
		DNA genómico	5 µg	

### Reordenamientos IGK

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad (*)	t respuesta
La presencia de reordenamientos clonales de los genes <i>TCR</i> es sugestiva de la presencia de un linfoma de células T. Técnica útil como apoyo al diagnóstico histopatológico	Determinación de la presencia de clonalidad en los gen <i>TCR</i> beta y gamma mediante PCR marcado con fluorescencia y electroforesis capilar	Sangre periférica	5 ml	10 días
		Aspirado de médula ósea	2ml	
		Tejido parafinado	<u>Bloques</u> 60% de células tumorales. <u>Secciones</u> – 5 secciones de 5 µm de espesor c/u Mayor cantidad posible	
		Tejido congelado	Mayor cantidad posible	
		DNA genómico	5 µg	

(\*) Las cantidades indicadas son cantidades óptimas.

- En sangre periférica para pacientes en tratamiento cuyo número de células sea bajo y para estudios de enfermedad residual se requieren como cantidad óptima 10 ml
- Para estudios de inestabilidad de microsátélites (MSI) además de tejido tumoral se requieren 3 ml de sangre periférica o tejido normal del mismo paciente

### **Condiciones de envío de las muestras**

La calidad y la exactitud de los resultados de las pruebas de laboratorio dependen altamente de la extracción apropiada, manejo y transporte de las muestras. En caso de no estar disponible, un sistema de recogida y transporte apropiado se puede proporcionar al Servicio que así lo requiera.

Las muestras deben ir acompañadas por una copia impresa del volante de petición debidamente cumplimentado, y enviadas a:

Unidad de Diagnóstico Molecular - Laboratorio 306A - Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas - Melchor Fernández Almagro, 3 - E 28029 Madrid

Las muestras deben enviarse en contenedores adecuados que aseguren su integridad durante el transporte. El envío de muestras para diagnóstico debe cumplir el sistema de triple contenedor: La muestra debe incluirse en un contenedor primario que debe ser hermético y a prueba de rotura. Debe rotularse correctamente, señalando el tipo de muestra, la procedencia anatómica si es preciso, el nombre y apellidos del paciente, su número de identificación, y la fecha y hora de la toma. No deben incluirse elementos punzantes o cortantes (p. ej. Aguja, etc). El contenedor primario debe ir envuelto en un protector físico adecuado a las condiciones de envío específicas del tipo de muestra (papel de burbujas en el caso de envíos a temperatura ambiente, bolsa de plástico para envíos en nieve carbónica). El contenedor primario debe incluirse en un contenedor secundario que podrá ser de cartón, plástico, etc., el cual debe rotularse correctamente con los datos del peticionario (remitente) y del destinatario (CNIO).

Se debe incluir el formulario de petición y el resto de la información que se considere necesaria. En el formulario de petición deben aparecer todos los datos necesarios para la identificación de la muestra y acompañada de información completa sobre el paciente, el espécimen y los estudios que se desean.

Las muestras serán inspeccionadas a su llegada para comprobar su adecuación a los requisitos especificados en este documento. El Servicio de Diagnóstico Molecular contactará al remitente, bien para corregir las deficiencias de información o en su caso descartar la muestra y solicitar una nueva. Las causas más comunes de rechazo de muestras son las siguientes:

- Paciente sin identificar (Nombre/ Nº de Identificación)
- Muestra inapropiada para el estudio requerido.
- Día y hora de extracción de muestra no especificada.
- Origen de la muestra sin especificar.
- Volante de petición ilegible o incorrectamente cumplimentado.
- Muestras de tejido fresco / fijado congeladas.
- Muestras no enviadas en las condiciones requeridas.
- Rotura de tubos / contenedores.
- Contaminación externa evidente.
- Sangre periférica coagulada.
- Volumen insuficiente. Si no hay suficiente para varias peticiones se pedirá al clínico que especifique la prioridad de las mismas.



# SEGUNDAS OPINIONES EN PATOLOGÍA DIAGNÓSTICA

## CATÁLOGO DE SERVICIOS (Manual de muestras primarias)

Elaborado por:  
Santiago Montes/Patólogo  
Lydia Sánchez / Jefa Unidad IHQ  
Fecha: Febrero 2010

Revisado /Aprobado por:  
Miguel A. Piris / Dtr. Progrm Patología Molecular  
Fecha: Febrero 2010

## ÍNDICE

- Revisión diagnóstica: emisión de segunda opinión diagnóstica en patología linfoide
- Revisión diagnóstica: evaluación morfológica, inmunohistoquímica y citogenética de casos de patología no hematolinfoide

### *Incluyen:*

- . Pruebas de Inmunihistoquímica
- . Estudios moleculares (Laboratorio linfomas y UDM)
- . Estudios de citogenética (Unidad citogenética)

Nombre	Descripción	Composición	Tipo de muestra	t respuesta
<p>DIAGNÓSTICO: REVISIÓN DIAGNÓSTICA (1)</p>	<p>1) <b>Emisión de segunda opinión diagnóstica en patología hematolinfoide.</b> Se realizan estudio de inmunohistoquímica, hibridación in situ, citogenética (FISH) y moleculares (reordenamientos de IgH, TCR, bcl2) que complementan el estudio anatomopatológico. <u>Ver detalle (*)</u></p> <p>2) <b>Evaluación de casos de patología no hematolinfoide que precisan estudio inmunohistoquímico y/o molecular específico.</b> <u>Ver detalle**</u></p>	<p><b>*Paneles de IHQ:</b> Linfoide básico, Linfoma B de bajo grado, Linfoma de tipo MALT, Linfoma B Difuso de Célula Grande, Linfoma de Burkitt, Linfoma de Hodgkin, Linfoma T.</p> <p><b>*Estudio citogenético (FISH):</b> bcl2, bcl6, c-myc, MALT1, ciclinaD1, ALK, p53.</p> <p><b>**Paneles de IHQ:</b> Panel de carcinoma de mama, Panel de inestabilidad de microsatélites, Tumores de origen desconocido, Diagnóstico Diferencial Mesotelioma/Carcinoma, Panel de Sarcoma, <b>Determinaciones aisladas:</b> HHV8, PTEN, INI1, HerpesVirus, TFE3.</p> <p><b>**Hibridación in situ cromogénica (CISH):</b> Amplificación de Her2neu y EGFR.</p> <p><b>**Estudio citogenético (FISH):</b> Sarcoma Sinovial (SYT), Sarcoma de Ewing (EWS), Liposarcoma Mixoide (FUSH-CHOP).</p> <p><b>**Estudio Molecular:</b> secuenciación de EGFR, c-kit, PDGFRA, kras, BRAF, inestabilidad de microsatelites (PCR). Se utiliza la técnica de microdissección láser para optimizar el rendimiento de la muestra.</p>	<p><i>Tejido fijado en formol e incluido en parafina, extendidos, citospines, citologicos fijados en etanol, formol o deshidratados, muestras de sangre periferica o aspirados MO en EDTA</i></p>	<p>1-2 semanas</p>

## INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) (2)

Nombre	Descripción
HIBRIDACION IN SITU	Hibridacion in situ de muestras parafinadas con sondas para EBV-EBER, kappa y lambda (VisionBiosystems).
HIBRIDACION IN SITU CROMOGÉNICA (CISH)	Hibridacion in situ cromogénica (CISH) para detectar amplificaciones de Her2neu y EGFR.
INMUNOHISTOQUIMICA	Determinaciones de Inmunohistoquímica de interés diagnóstico. Estudio de Inmunohistoquímica mediante procesamiento automatizado (Autostainer EnVision FLEX, Bond MAX Vision Bio System)

## PANELES DE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

Nombre	Descripción
Panel de Linfoide	H-E, CD20, CD3, CD30, Bcl2, Bcl6, CD10, CICLINAD1, Ki67, KAPPA, LAMBDA
Panel de Linfoma B de bajo grado	HE, CD20, CD3, CD43, Bcl2, Bcl6, CD10, CD23, CD5, CICLINA D1, IgD, Ki67, MNDA, P53, GCET1, KAPPA, LAMBDA.
Panel de Linfoma B difuso de célula grande	HE, CD20, CD3, GCET1, CD10, BCL6, MUM1, FOXP1, KI67, P53, CICLINAD1.
Panel de Linfoma Burkitt / DLBCL	HE, CD20, CD10, BCL6, BCL2, KI67, TCL1, CD44, GCET1, MUM1, P53, TDT.
Panel de Linfoma de Hodgkin	HE, CD20, CD3, PAX5, CD30, CD15, EBV-LMP1, ALK, BCL2, EMA, OCT2, PD1, CD57, P53.
Panel de Linfoma MALT	HE, CD20, CD3, CD43, BCL2, BCL6, CD10, GCET1, MNDA, CD23, CD5, CICLINAD1, CD79A, AE1/AE3, H PYLORI, KI 67, KAPPA, LAMBDA.
Panel de Linfoma T	HE, CD20, CD3, CD43, CD30, CD4, CD8, CD2, CD5, CD7, CD56, TCRBF1. ALK, PD1, TIA1, PERFORINA, GRANZIMAB, KI67.
Panel de Linfoma T Cutáneo	HE, CD20, CD3, CD30, CD4, CD8, CD56, FOXP3, TCRBF1, GRANZIMAB, PERFORINA, TIA1, BCL2, KI67.
Panel de Sarcoma	HE, VIMENTINA, ACTINA MUSCULO LISO, CALDESMON, C-KIT, CD31, CD34, CD21, CD23, CD99, CD56, BCL2, S-100, HMB45, MELAN A, DESMINA, MYOD1, MYF4, P53, TFE3
Panel de Tumores de origen desconocido	HE, CALRETININA, WT1, CD30, CD56, c-kit, 34BE12, CK13, CK19, CK20, CK5/6, CK7, MAMOGLOBINA, MOC-31, TTF1, SURFACTANTE, VIMENTINA, CDX2, CA-IX, S-100.
Panel de Moléculas de Adhesión	HE, BETA CATENINA, E-CADHERINA, G-CATENINA, KI67.
Panel de Ciclo Celular	HE, CICLINAA, CICLINAB1, CICLINA E, CICLINAD3, CICLINAD1.
Panel de Proteínas reparadoras	HE, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2.
Panel de mama	HE, E-CADHERINA, R-ESTROGENOS, R-PROGESTERONA, Ki67, P53, CISH HER2NEU.
Panel de Carcinoma VS Mesotelioma	HE, Antígeno epitelial ( Ber-Ep4 ), Calretinina, CD15, CEA policlonal, CK20, CK 5/6, CK7, CK AE1/AE3, EMA, MOC-31, TTF-1, WT1.

**LABORATORIO DE LINFOMAS<sup>(3)</sup>**

Nombre	Descripción
Reordenamiento IGH CDRII Reordenamiento IGH CDRIII Reordenamiento TCR GAMMA I Reordenamiento TCR GAMMA II Reordenamiento TCR BETA I Reordenamiento TCR BETA II Reordenamiento TCR DELTA	Estudio molecular del estado de reordenamiento de la región variable de IgH (CDR2, CDR3) y de las distintas cadenas del receptor de células T (Gamma1, Gamma2, Beta1, Beta2, Delta). Son ensayos de clonalidad asociados a una prueba de revisión diagnóstica hematolinfóide. Se basan en la técnica de PCR utilizando primers estandarizados (PCR Biomed).
Reordenamiento IGK Reordenamiento IGL Reordenamiento IGK	Estudio molecular del estado de reordenamiento de la cadena ligera kappa, deleción de kappa y gamma. Son ensayos de clonalidad asociados a una prueba de revisión diagnóstica hematolinfóide. Se basan en la técnica de PCR utilizando primers estandarizados (PCR Biomed).
BLC2 (t14:18)	Estudio molecular del estado de reordenamiento del gen BCL2. Son ensayos asociados a una prueba de revisión diagnóstica hematolinfóide. Se basan en la técnica de PCR utilizando primers estandarizados (PCR Biomed) frente a las tres regiones de rotura más frecuentes (MBR, mcr, 3'MBR).

*Las segundas opiniones se rigen por el protocolo desarrollado por la Sociedad Americana de Patólogos Clínicos (ASCP) en el año 2000 (Am J Clin Pathol. 2000 Sep;114(3):329-35). El uso de estudios inmunohistoquímicos, citogenéticos y moleculares en los distintos tipos de neoplasia evaluados se basa en recomendaciones generales de práctica clínica recogidas en guías como la NCCN Practice Guidelines in Oncology (v1.2010) ([http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/f\\_guidelines.asp](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp)). Las condiciones utilizadas para la detección de reordenamientos siguen las recomendaciones del consorcio Biomed2 (van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. Leukemia 2003;17:2257-2317)*

- (1) Las distintas Unidades realizan la técnica, chequean la validez del resultado y en el caso de Citogenética y Diagnóstico Molecular generan un informe parcial. La sección de Patología Molecular Diagnóstica genera un informe síntesis, conteniendo todos los resultados.*
- (2) La Unidad de Histología/Inmunohistoquímica realiza la técnica y chequea la validez del resultado. El grupo de Patología Molecular Diagnóstica valida definitivamente el resultado y genera un informe (IHQ ampliado) con detalles técnicos y comentarios.*
- (3) Laboratorio de Linfomas realiza el análisis y genera un resultado que se valida técnicamente. El grupo de Patología Molecular Diagnóstica valida definitivamente el resultado y lo adjunta al informe de DIAGNÓSTICO previo.*

# GENÉTICA HUMANA

## CATÁLOGO DE SERVICIOS (Manual de muestras primarias)

Elaborado por:  
Mercedes Robledo / Jefe de Unidad Cáncer Endocrino  
Miguel Urioste / Especialista en Genética Humana  
Fecha: Febrero 2010

Revisado /Aprobado por:  
Javier Benítez / Dtr. Progrm de Genética Humana  
Fecha: Febrero 2010

### ÍNDICE

Identificación mutaciones en gen AIP	Identificación mutaciones en gen TP53
Identificación mutaciones en gen APC	Identificación mutaciones en gen PTEN
Identificación mutaciones en gen BRCA1	Identificación mutaciones en gen PRKAR1A
Identificación mutaciones en gen BRCA2	Identificación mutaciones en gen RET (MEN 2)
Identificación mutaciones recurrentes en genes BRCA1 y BRCA2	Identificación mutaciones en gen RET (estudio completo)
Identificación mutaciones en gen CDH1	Identificación mutaciones en gen SDHAF2
Identificación mutaciones en gen CDK2A (p16)	Identificación mutaciones en gen TMEM127
Identificación V600E en gen BRAF	Identificación mutaciones en gen SDHB
Identificación mutaciones en gen FH	Identificación mutaciones en gen SDHC
Identificación mutaciones en gen FCLN	Identificación mutaciones en gen SDHD
Identificación mutaciones en gen HRPT2	Identificación mutaciones en gen MET
Identificación mutaciones en gen MEN1	Identificación mutaciones en gen SH2D1A
Identificación mutaciones en gen MSH2	Identificación mutaciones en gen STK11
Identificación mutaciones en gen MLH1	Identificación mutaciones en gen VHL
Identificación mutaciones en gen MSH6	MLPA de MSH2 y MLH1
Inestabilidad de microsatélites*	MLPA de MSH6 y PMS2
Identificación mutaciones recurrentes en gen MYH	MLPA de BRCA1 y BRCA2
Identificación mutaciones en gen MYH (estudio completo)	Estudio de haplotipos (previo acuerdo con el Programa de Genética Humana)

**Identificación de mutaciones en el gen AIP(OMIM#605555)**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de Adenoma Hipofisario Familiar (OMIM:# 600634)	Secuenciación directa y MLPA	Sangre periférica	10 ml	30 días (secuenciación) y 30 días (MLPA)

**Identificación de mutaciones en el gen APC (OMIM#611731)**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha clínica de Poliposis Adenomatosa Familiar (OMIM#611731), síndrome de Gardner (OMIM#611731), o síndrome de Turcot (OMIM#276300)	Secuenciación directa y MLPA	Sangre periférica	10 ml	60 días (secuenciación) y 30 días (MLPA)

**Identificación de mutaciones en el gen BRCA1 (OMIM#113705)**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario (OMIM#604370)	DHPLC, secuenciación directa	Sangre periférica	10 ml	90 días (DHPL y secuenciación)

**Identificación de mutaciones en el gen BRCA2 (OMIM#600185)**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario (OMIM#604370).	DHPLC, secuenciación directa	Sangre periférica	10 ml	90 días (DHPL y secuenciación)

**Identificación de mutaciones recurrentes en los genes BRCA1 y BRCA2**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de cáncer de mama y ovario familiar	DHPLC, y secuenciación directa	Sangre periférica	10 ml	30 días

**Identificación de mutaciones en el gen CDH1 (OMIM#192090)**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de síndrome de cáncer gástrico difuso familiar (OMIM#137215).	Secuenciación directa	Sangre periférica	10 ml	60 días

**Identificación de mutaciones en el gen CDK2A (p16) (OMIM#600160)**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de melanoma familiar	Secuenciación directa	Sangre periférica	10 ml	30 días

**Identificación de la mutación V600E en el gen BRAF (OMIM#164757)**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Forma esporádica de cáncer de colon con inestabilidad de microsatélites	Secuenciación directa	Tumor parafinado	<u>Bloques</u> 60% de células tumorales <u>Secciones</u> – 5 secciones de 5 µm de espesor c/u	30 días

**Identificación de mutaciones en el gen FH (OMIM#136850)**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha clínica de Leiomiomatosis y Cáncer Renal familiar (OMIM#605839).	Secuenciación directa y MLPA	Sangre periférica	10 ml	30 días (secuenciación) y 30 días (MLPA)

**Identificación de mutaciones en el gen FLCN (OMIM#607273)**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha del síndrome de Birt-Hogg-Dubè (OMIM#135150).	Secuenciación directa	Sangre periférica	10 ml	30 días

**Identificación de mutaciones en el gen HRPT2 (OMIM#607393)**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha clínica de Carcinoma Paratiroideo familiar o Hiperparatiroidismo primario familiar (OMIM#145001).	Secuenciación directa	Sangre periférica	10 ml	60 días

**Identificación de mutaciones en el gen MEN1 (OMIM#131100)**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha clínica de Neoplasia Endocrina Múltiple tipo I (OMIM#131100).	Secuenciación directa y MLPA	Sangre periférica	10 ml	30 días (secuenciación) y 30 días (MLPA)

**Identificación de mutaciones en el gen MSH2 (OMIM#609309)**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de síndrome de Lynch o Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (HNPCC) (OMIM#120435).	Secuenciación directa y MLPA	Sangre periférica	10 ml	60 días (secuenciación)

**Identificación de mutaciones en el gen MLH1 (OMIM#120436)**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de síndrome de Lynch o Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (HNPCC) (OMIM#120435).	Secuenciación directa y MLPA	Sangre periférica	10 ml	60 días (secuenciación)

**Identificación de mutaciones en el gen MSH6 (OMIM#600678)**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de síndrome de Lynch o Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (HNPCC) (OMIM#120435).	Secuenciación directa y MLPA	Sangre periférica	10 ml	60 días (secuenciación)

**Inestabilidad de microsatélites\***

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha clínica de síndrome de Lynch o Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (HNPCC).	Análisis de fragmentos. (*)Es aconsejable acompañar esta prueba de el análisis inmunohistoquímico de la expresión de las proteínas del sistema de reparación de ADN (Mlh1, Msh2, y Msh6)	Tumor parafinado	<u>Bloques</u> 60% de células tumorales <u>Secciones</u> – 5 secciones de 5 µm de espesor c/u	30 días (inestabilidad de microsatélites más análisis inmunohistoquímico)

**Identificación de mutaciones en el gen MYH (estudio completo) (OMIM#604933)**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha clínica de Poliposis Atenuada Asociada a MYH o de herencia autosómica recesiva (OMIM#608456)	Secuenciación directa	Sangre periférica	10 ml	30 días

**Identificación de mutaciones recurrentes en el gen MYH (OMIM#604933)**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha clínica de Poliposis Atenuada Asociada a MYH o de herencia autosómica recesiva (OMIM#608456)	Secuenciación directa de mutaciones recurrentes	Sangre periférica	10 ml	30 días

**Identificación de mutaciones en el gen TP53 (OMIM#191170)**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de síndrome de Li-Fraumeni (OMIM#151623).	Secuenciación directa y MLPA	Sangre periférica	10 ml	30 días (secuenciación) y 30 días (MLPA)

**Identificación de mutaciones en el gen PTEN (OMIM#601728)**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha clínica de síndrome de Cowden (OMIM#158350), de síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba (OMIM#153480), de síndrome de Proteus (OMIM#176920), de Proteus-like, o de síndrome de Macrocefalia y Autismo (OMIM#605309).	Secuenciación directa y MLPA	Sangre periférica	10 ml	30 días (secuenciación) y 30 días (MLPA)

**Identificación de mutaciones en el gen PRKAR1A (OMIM#188830)**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de complejo de Carney (OMIM#160980)	Secuenciación directa y MLPA	Sangre periférica	10 ml	30 días (secuenciación) y 30 días (MLPA)

**Identificación de mutaciones en el gen RET (estudio completo) (OMIM#164761)**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 2 (OMIM#171400).	Secuenciación directa	Sangre periférica	10 ml	30 días

**Identificación de mutaciones en el gen RET (exones 8, 10, 11, 13-16) (OMIM#164761)**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 2 (OMIM#171400).	Secuenciación directa	Sangre periférica	10 ml	30 días

**Identificación de mutaciones en el gen SDHB (OMIM#185470)**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de Feocromocitoma y/o Paraganglioma familiar (OMIM#168000).	Secuenciación directa y MLPA	Sangre periférica	10 ml	30 días (secuenciación) y 30 días (MLPA)

**Identificación de mutaciones en el gen SDHC (OMIM#602413)**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de Feocromocitoma y/o Paraganglioma familiar (OMIM#168000).	Secuenciación directa y MLPA	Sangre periférica	10 ml	30 días (secuenciación) y 30 días (MLPA)

**Identificación de mutaciones en el gen SDHD (OMIM#602690)**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de Feocromocitoma y/o Paraganglioma familiar (OMIM#168000).	Secuenciación directa	Sangre periférica	10 ml	30 días (secuenciación) y 30 días (MLPA)

**Identificación de mutaciones en el gen SDHAF2 (OMIM\*613019)**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de Feocromocitoma y/o Paraganglioma familiar (OMIM#168000).	Secuenciación directa	Sangre periférica	10 ml	30 días (secuenciación) y 30 días (MLPA)

**Identificación de mutaciones en el gen TMEM127**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de Feocromocitoma y/o Paraganglioma familiar (OMIM#168000).	Secuenciación directa	Sangre periférica	10 ml	30 días (secuenciación) y 30 días (MLPA)

**Identificación de mutaciones en el gen MET (OMIM#164860)**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha clínica de Cáncer Renal Papilar familiar (OMIM#605074)	Secuenciación directa	Sangre periférica	10 ml	30 días

**Identificación de mutaciones en el gen SH2D1A (OMIM#300490)**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de enfermedad de Duncan o trastorno linfoproliferativo ligado al cromosoma X (OMIM#308240).	Secuenciación directa	Sangre periférica	10 ml	30 días

**Identificación de mutaciones en el gen STK11 (OMIM#602216)**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de síndrome de Peutz-Jeghers (OMIM#175200).	Secuenciación directa y MLPA	Sangre periférica	10 ml	30 días (secuenciación) y 30 días (MLPA)

**Identificación de mutaciones en el gen VHL (OMIM#608537)**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de síndrome de Von Hippel-Lindau (OMIM#168000).	Secuenciación directa y MLPA	Sangre periférica	10 ml	30 días (secuenciación) y 30 días (MLPA)

**MLPA de MSH2/MLH1**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de síndrome de Lynch o Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (HNPCC) (OMIM#120435).	MLPA	Sangre periférica	10 ml	30 días (MLPA)

**MLPA de MSH6/PMS2**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de síndrome de Lynch o Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (HNPCC) (OMIM#120435).	MLPA	Sangre periférica	10 ml	30 días (MLPA)

**MLPA de BRCA1y BRCA2**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de cáncer de mama y ovario familiar (OMIM#604370)	MLPA	Sangre periférica	10 ml	30 días

(\* Las cantidades indicadas son cantidades óptimas.

- En sangre periférica para pacientes en tratamiento cuyo número de células sea bajo y para estudios de enfermedad residual se requieren como cantidad óptima 10 ml
- Para estudios de inestabilidad de microsatélites (MSI) además de tejido tumoral se requieren 3 ml de sangre periférica o tejido normal del mismo paciente

**Descripción de las técnicas empleadas****Secuenciación**

La secuenciación consiste en una lectura automática de nucleótidos contenidos en un fragmento de ADN amplificado por PCR. La interpretación del cromatograma de secuenciación del ADN de interés se realiza con ayuda de un programa informático adecuado y su traducción en la secuencia nucleotídica respectiva.

**DHPLC** (*Denaturing High Pressure Liquid Chromatography*).

Esta técnica permite identificar cambios en la secuencia de ADN (cambios puntuales, inserciones o deleciones), debido a que los heteroduplex y los homoduplex son retenidos de forma distinta en la columna hidrofóbica del sistema, y liberados a tiempos distintos en una concentración creciente de acetonitrilo. Los fragmentos de ADN pasan a través de un detector ultravioleta a medida que van saliendo de la columna, de manera que el software lo representa en forma de picos.

**MLPA** (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

Esta técnica permite la cuantificación de copias de un gen de interés mediante una hibridación de sondas específicas, un paso de ligación, una amplificación con primers marcados, una separación de acuerdo al tamaño de los fragmentos amplificados, y una normalización relativa a fragmentos control, representativos de otras partes del genoma diferentes al gen en estudio.

**Aclaraciones sobre la muestra necesaria para hacer los estudios y documentación requerida.**

1. Los análisis se llevan a cabo a partir de una muestra biológica perteneciente a un paciente afectado de la enfermedad en estudio, y no de un individuo sano. Una vez detectada la alteración molecular responsable de la enfermedad de la familia, se podrá ofrecer un estudio genético a cada uno de los miembros relacionados que quieran conocer su condición (sano o portador).
2. El estudio molecular no se comenzará hasta no tener una fotocopia del consentimiento firmado por el paciente, o en su defecto una confirmación por escrito indicando que el centro de origen es poseedor de tal consentimiento.
3. La muestra debe venir acompañada por un resumen de los datos clínicos del individuo candidato a estudio incluyendo árbol genealógico.
4. La muestra debe venir acompañada por la autorización pertinente del Centro de origen.
5. Las muestras se pueden enviar de lunes a viernes. Nuestro horario de recepción de muestras es de 8.00 a 18.00h.
6. Para estudios con RNA es imprescindible que la muestra llegue refrigerada y en el día.
7. Para estudios con DNA se necesitan 10-15 cc de sangre periférica con EDTA, y deberán recibirse en el laboratorio en las 24 horas siguientes a la extracción. La muestra de sangre debe venir bien a temperatura ambiente o bien refrigerada, pero NUNCA congelada.
8. En el estudio de inestabilidad de microsatélites, en relación al cáncer de colon no polipósico, se trabaja a partir del tumor donde se realizó el diagnóstico histopatológico.

**Especificaciones técnicas del estudio:**

1. Las variantes de significado desconocido (VSD) necesitan de estudios adicionales para poder asignarles un carácter patogénico y por tanto asociado a la enfermedad de un individuo, o bien un carácter polimórfico y por tanto sin relación con la enfermedad. Cuando detectemos una VSD, se contactará con la persona que ha enviado la muestra para analizar si es factible ampliar el estudio. Nuestra estrategia incluye estudio del tumor, o análisis de segregación en la familia, estudio de la variante en una población control entre otros. Dichos estudios no suponen un coste adicional para el centro de origen.
2. Una parte importante de los genes de susceptibilidad mayor al cáncer pueden estar afectados por grandes deleciones, detectadas por MLPA. La proporción de individuos portadores de este tipo de alteración es muy variable según los genes considerados. Cuando un gen se ve afectado por grandes deleciones en una proporción muy baja, su análisis no está contemplado de forma rutinaria en el *screening* que aplicamos. Si el Centro de origen quiere que se analicen las grandes deleciones en estos genes en particular, debe solicitar específicamente este estudio, con un coste adicional de 150 euros.

**Especificaciones sobre los tiempos de respuesta:**

1. El tiempo de respuesta se contabiliza en todos los casos desde el momento en el que tenemos resumen de la historia clínica, consentimiento firmado por el paciente, o en su defecto declaración del centro de origen de estar en posesión del mismo, y la autorización para realizar el estudio.
2. Para aquellos genes en los que se contempla el estudio rutinario de grandes deleciones, la tabla muestra dos tiempos de respuesta.
  - a) El primero corresponde al estudio por DHPLC y/o secuenciación, que permite analizar la mayor parte de las alteraciones que afectan a estos genes (mutaciones puntuales, pequeñas deleciones o inserciones, o cambios que afectan al proceso de splicing).
  - b) El segundo corresponde al estudio de grandes deleciones, que en todos los casos se realiza una vez que se ha terminado el estudio anterior.



# UNIDAD DE GENOTIPADO HUMANO

## CATÁLOGO DE SERVICIOS (Manual de muestras primarias)

Elaborado por:  
Anna González Neira/ Jefe de Unidad  
Fecha: Febrero 2010

Revisado /Aprobado por:  
Javier Benítez / Dtr. Progrm de Genética Humana  
Fecha: Febrero 2010

## ÍNDICE

- Análisis Singleplex genotipado de SNPs
- Análisis Multiplex genotipado de SNPs
- Análisis Multiplex de metilación

### Análisis singleplex genotipado de SNPs

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Análisis de único SNP por ensayo.	Ensayo de discriminación alélica mediante sondas Taqman (AB) y sondas Kaspar (KBioscience). Plataforma - ABI7900HT	Sangre periférica Saliva DNA	10-20 ng por muestra/SNP	1 ensayo/384 muestras: 4 días desde recepción de reactivos

### Análisis multiplex genotipado de SNPs

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Análisis de varios SNP por ensayo. Según la plataforma de 45 SNP a 1 millón de SNPs	Ensayo en plataformas Illumina Beadstation y BeadXpress. Ensayo multiplex GoldenGate e infinium Plataforma - Illumina BeadStation (768-1M) Illumina BeadXpress (45-384)	Sangre periférica Saliva DNA	250ng-500ng	1 ensayo /96 muestras: 1-3 semanas desde recepción de reactivos

### Análisis multiplex de metilación

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Análisis de un mínimo de 45 sitios CpG a 27000 por ensayo El servicio incluye conversión por bisulfito y purificación de la muestra	Permite medir cuantitativamente el estado de metilación de sitios en islas CpG Plataforma - Illumina BeadStation (768-27.000) Illumina BeadXpress (45-384)	DNA	750ng -1µgr	1 ensayo/ 96 muestras: 2-3 semanas desde recepción de reactivos

# UNIDAD DE CITOGENÉTICA

## CATÁLOGO DE SERVICIOS (Manual de muestras primarias)

Elaborado por:  
**Juan Cruz Cigudosa/ Jefe de Unidad**  
Fecha: Febrero 2010

Revisado /Aprobado por:  
**Javier Benítez / Dtr. Progrm de Genética Humana**  
Fecha: Febrero 2010

## ÍNDICE

- Determinación del cariotipo
- Hibridación *in situ* por Fluorescencia (FISH)
- Cariotipo espectral multicolor (SKY)

### Determinación del cariotipo

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
<p>La determinación del cariotipo consiste en el análisis del estado de la dotación cromosómica de una muestra. La gran mayoría de los procesos tumorales presentan alteraciones cromosómicas (marcadores cromosómicos) que pueden tener relación específica con el diagnóstico o con el pronóstico de los procesos neoplásicos. Así por ejemplo, para elaborar un diagnóstico hematológico de leucemia aguda, las herramientas incluyen siempre la realización de un cariotipo a partir de células de médula ósea obtenida mediante aspiración o biopsia.</p> <p>La determinación del cariotipo es una prueba de diagnóstico general, sin sesgos, en la que se estudian todos los cromosomas y se determina si hay o no alteraciones. Si las hay, se describe qué tipo de aberraciones se observan y sus posibles implicaciones en el diagnóstico y el pronóstico. Con todo ello, se redacta un informe facultativo.</p>	<p>Para estudiar el cariotipo necesitamos células vivas en cultivo. A estas células se les bloquea la división celular mediante una sustancia tóxica (Colcemid, derivada de la colchicina) que detiene la mitosis en la fase de metafase. En esta fase, los cromosomas son visibles al microscopio y se utiliza esta circunstancia para estudiarlos. Para la identificación de los cromosomas se emplean técnicas de bandedo cromosómico: un tipo de tinción que produce un listado o bandedo que es específico para cada cromosoma. De esta manera se pueden identificar, de forma más o menos unívoca cada cromosoma y determinar, en su caso, la existencia de posibles alteraciones cromosómicas. La técnica de bandedo empleada será inicialmente la denominada de bandas GTG</p>	Sangre periférica	5 ml	15 días
		Aspirado de médula ósea	2 ml	15 días
		Biopsia de Tejido sólido	20 millones de células	1 mes

### Cariotipo espectral multicolor (SKY)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
<p>El cariotipo espectral (SKY) es una técnica de citogenética molecular desarrollada recientemente, y de momento sólo se utilizan en el campo de la investigación.</p> <p>El SKY es un tipo de cariotipo realizado mediante hibridación in situ con 24 sondas en el que el material procedente de cada cromosoma queda identificado por un color específico. Por tanto, es una forma de realizar un cariotipo, pero teñido no con bandas G sino con colores, de forma que podamos clasificar las alteraciones de forma unívoca. Sus indicaciones más frecuentes son: identificación de marcadores de origen desconocido y caracterización de translocaciones</p>	<p>Su fundamento técnico es consiste en marcar el ADN de cada cromosoma con uno o varios fluorocromos, de manera que el espectro de emisión de cada cromosoma sea único y diferenciable de los demás. Esta técnica, por tanto, pinta a cada cromosoma de un color. Con el "cocktail" de 24 sondas de pintado cromosómico obtenido tras el marcaje, se hibrida sobre los cromosomas de las metafases del tumor, el cromosoma anómalo aparecerá no uniforme, sino con los colores de los cromosomas que intervienen en la translocación</p>	Material fijado en Carnoy	Sedimento celular con 10.000 cels	30 días

**Hibridación in situ con fluorescencia (FISH)**

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
<p>La técnica de hibridación <i>in situ con fluorescencia (FISH)</i> permite la localización de secuencias de ADN específicas sobre preparaciones cromosómicas, extensiones celulares y cortes de tejido. Los tipos de sondas aplicados de forma rutinaria son sondas centroméricas (marcan la región centromérica de los cromosomas), sondas para painting (marcan todo el cromosoma) y sondas de secuencia única (marcan un locus específico). Con esta técnica y las sondas apropiadas se pueden detectar muchas alteraciones cromosómicas sobre los propios cromosomas, o en núcleos celulares.</p> <p>En concreto, emplearemos la técnica de FISH centrada en diversos genes que pueden estar alterados en diversos tipos de tumores según la siguiente lista:</p> <p><u>Deleciones, Ganancias y Amplificaciones Translocaciones</u> 17p (p53) , 7q, 5q, 13q, 11q23 (ATM), Trisomía 12, Amplificación HER2/NEU</p> <p><u>Reordenamientos:</u> cMYC (8q34), MALT (18q21), IgH (14q32), CCND1 (11q13), BCL2 (18q21), MLL (11q24), ALK (2p23)</p> <p><u>Translocaciones:</u> t(8;21)(q22;q22),inv(16)(p13;q22), (15;17)(q22;q21) t(9;22)(q34;q11)</p> <p><u>Diagnósticos completos :</u> LLC (LSI13q, 11q, 17p y CEP12) Una vez analizado el estado del gen estudiado, se emitirá el informe genético por un facultativo</p>	<p>Para cada sonda:</p> <p>Determinación de la presencia, disposición y cuantificación del gen o genes en cuestión.</p> <p>Ante la sospecha de implicación de un gen se realizará la técnica de FISH siguiendo el protocolo estandarizado que incluye: deshidratación de la muestra, desnaturalización simultánea de la muestra y las sondas de FISH, hibridación a 37°C, lavados y tinción.</p> <p>Una vez realizado el experimento, se analizará el estado del gen interrogado: delecionado, reordenado, translocado, amplificado. Este análisis se realizará en microscopio de fluorescencia con los filtros adecuados</p>	<p>Material fijado en Carnoy</p>	<p>Sedimento celular con 10.000 cels</p>	<p>30 días</p>