

DIAGNÓSTICO  
MOLECULAR



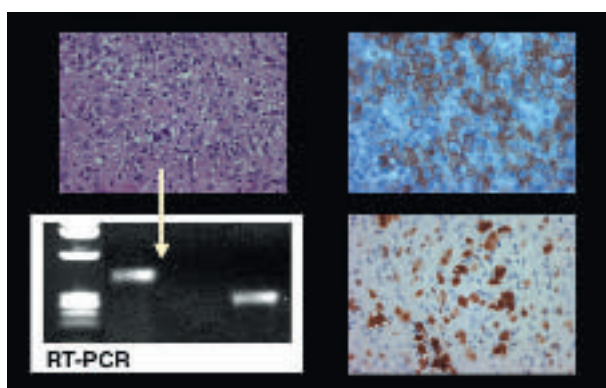
*CM20*

**E**l CNIO incluye en sus actividades un **servicio de diagnóstico molecular**, cuyo principal objetivo es la rápida identificación del espectro patogénico de mutaciones y otras alteraciones implicadas en el desarrollo y la progresión tumoral. Se persigue mejorar el diagnóstico de los tumores, proporcionando asimismo información con valor pronóstico o que contribuya a la aplicación de la terapia más adecuada y eficaz, sirviendo de referencia y apoyo a los servicios clínicos de los hospitales.

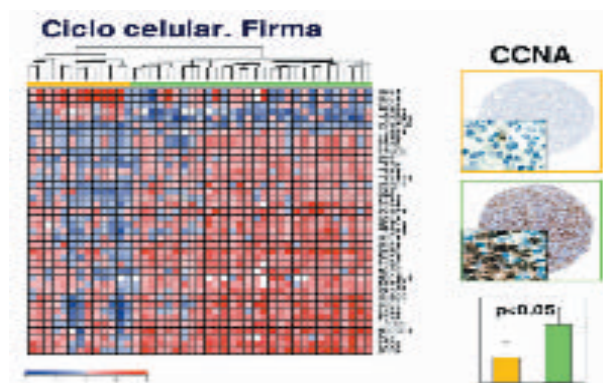
## Nuevas tecnologías al servicio de la investigación y la clínica

La secuenciación completa del genoma humano ha supuesto un cambio trascendental en la manera de entender, investigar y abordar el diagnóstico y el tratamiento del cáncer.

En este contexto el desarrollo de la **genómica**, la **proteómica**, la **bioinformática** y las **técnicas moleculares** han supuesto un impulso tecnológico determinante en la investigación del cáncer, que ya está teniendo importantes consecuencias clínicas en cuanto al diagnóstico, pronóstico y tratamiento de los pacientes. La disponibilidad y el buen uso de estas tecnologías deben ser un incentivo fundamental para la investigación de transferencia, gracias al esfuerzo común y continuo intercambio de información y resultados entre laboratorio y la clínica.



Patología Molecular en el diagnóstico t(2;5) en linfoma Anaplásico T CD30+



Identificación de genes asociados con ciclo celular

La aplicación de estas tecnologías en proyectos de excelencia ha permitido que España forme parte del grupo de élite en investigación oncológica europea

## I. Genómica y cáncer

En este contexto tecnológico, una de las concreciones más esperanzadoras es la de los denominados microarrays de expresión génica.

Estos microarrays permiten determinar variaciones en los niveles de expresión de miles de genes de forma simultánea y reproducible. Los análisis de expresión mediante microarrays de expresión constituyen actualmente una herramienta estándar para la identificación de la huella genética de las diversas formas de cáncer, permitiendo un diagnóstico preciso y una estimación del riesgo de fallo con las diversas terapias existentes. Adicionalmente, permiten identificar dianas terapéuticas potenciales y conducir a estudios experimentales basados en la firma molecular de los tumores.

### 1.1. Análisis de expresión génica

El CNIO ha sido pionero en España en el empleo de microarrays de expresión para la subclasificación de pacientes de diversos tipos de cáncer. Desde el año 2001 se han venido analizando más de 1.000 muestras anuales pertenecientes a una variedad de proyectos de investigación en que participaban sus investigadores.

Con la garantía de la amplia experiencia de su **Unidad de Genómica**, el CNIO ofrece servicios de Análisis de Expresión Génica mediante microarrays de tecnología Agilent, a investigadores españoles pertenecientes a entidades sin ánimo de lucro. Se pueden encontrar detalles sobre este servicio en el enlace "Servicios a la Comunidad" de la página web principal del CNIO, o en el enlace específico siguiente: <http://www.cnio.es/es/programas/expresion-genica/index.asp>

Este tipo de microarray está siendo usado en diversos proyectos cooperativos, permitiendo avanzar en la determinación del perfil de expresión o huella genética de distintos tipos de cáncer; así como de huellas de sensibilidad o resistencia a tratamientos determinados.

Los estudios relativos al perfil de expresión de los diferentes tumores incluyen el carcinoma de mama, endometrio, colon, páncreas, pulmón, melanoma, GIST, linfomas B y T, leucemia mieloide crónica y linfocítica crónica B.

Respecto a huellas moleculares relacionadas con resistencia o sensibilidad al tratamiento, los estudios que se han realizado o están en marcha son:

- Yondelis en sarcomas
- $\alpha$ -IFN en linfoma T cutáneo
- $\alpha$ -IFN en leucemia mieloide crónica
- Aplidina en leucemias agudas

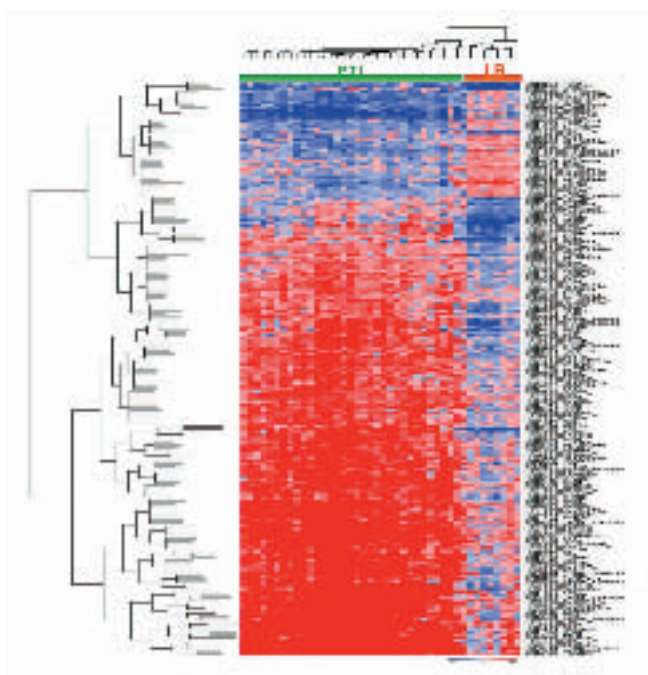
- Imatinib en leucemia mieloide crónica
- Taxol + gemcitabina en carcinoma de mama
- Letrozol en carcinoma de mama
- Taxol + adriamicina + gemcitabina en carcinoma de mama

## 1.2. Polimorfismos (SNPs)

El ADN de los seres humanos presenta variaciones (polimorfismos) que constituyen la base genética de nuestra individualidad. La forma más común de polimorfismo es la variación de una única base en la secuencia de ADN, llamada SNP (Single Nucleotide Polymorphism), cuya frecuencia y distribución en el genoma (1 SNP cada 1.000 bases) y su fácil manejo los han convertido en potentes herramientas para localizar genes o regiones genómicas que pudieran ser responsables de algún tipo de enfermedad o del incremento de la susceptibilidad de ciertos individuos a padecerla.

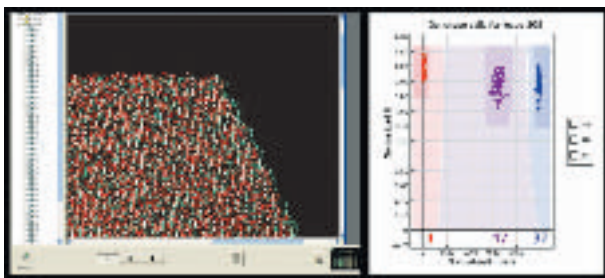
Desde hace tiempo, la tecnología disponible permite analizar cientos o miles de SNPs a la vez, identificar genes y alelos de baja penetrancia e ir configurando poco a poco lo que sería el perfil genético de riesgo de algunas enfermedades multifactoriales.

El CNIO es uno de los tres nodos que configuran el **Centro Nacional de Genotipado** (CEGEN) financiado por la Fundación Genoma España, cuyo objetivo es desarrollar una plataforma de genotipado para abordar la investigación del cáncer desde esta perspectiva.: (<http://cegen.bioinfo.cnio.es>)



Perfil de expresión de genes diferencialmente expresados en diferentes subtipos de linfomas T

Gracias a la plataforma de alto rendimiento disponible en el CNIO (Illumina) que permite el genotipado masivo de miles de SNPs, se han desarrollado varios proyectos entre los que destaca el análisis de SNPs de genes relacionados con diferentes procesos tumorales, tales como apoptosis, ciclo celular, reparación y metabolización entre otros. Con estos datos se han llevado a cabo amplios estudios de susceptibilidad y de interacción entre genes que han permitido la identificación de SNPs involucrados en cáncer. Por otro lado, la identificación de variantes farmacogenéticas involucradas en el metabolismo de fármacos antitumorales, está siendo investigada para su aplicación en la práctica clínica. El análisis de SNPs que puedan predecir una respuesta adversa de los pacientes a un tratamiento su-



Genotipaje masivo de SNPs utilizando la plataforma de Illumina

pondrá una mejora incalculable en el tratamiento del cáncer. En la actualidad, este tipo de pruebas farmacogenéticas se están realizando para el tratamiento de las leucemias infantiles.

### 1.3. Microarrays de Tejidos (TMAs)

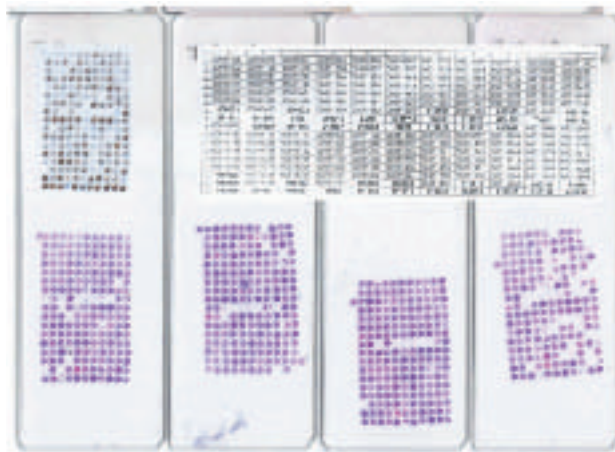
Constituyen un método sencillo de análisis de expresión que se fundamenta en la realización de “biopsias” cilíndricas de tejidos tumorales embebidos en parafina, preservando el resto del tejido para estudios futuros.

Con los TMA se pueden analizar grandes series de tumores y validar los resultados obtenidos con otras técnicas como los cDNA, oligonucleotido microarrays, así como de la hibridación genómica comparada (CGH).

El éxito de esta tecnología, por otra parte ya consolidada, viene dado por ser una herramienta robusta que permite monitorizar la expresión de múltiples muestras tumorales en un único experimento, garantizando la homogeneidad de las técnicas entre las muestras y un considerable ahorro de tiempo y reactivos, siendo aplicable en los Microarrays de tejidos (TMAs) cualquier técnica, tanto histológica, inmunohistoquímica así como de hibridación “in situ”.



Preparación de una matriz tisular

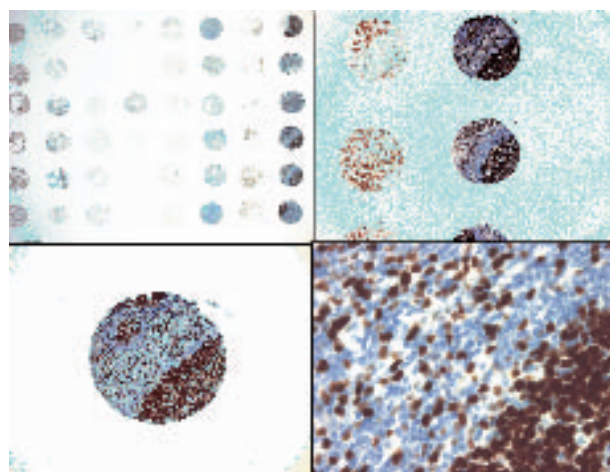


Microarrays de Tejido. Muestra de 245 pacientes

Por otra parte esta tecnología se beneficia del elevado nº anticuerpos disponibles y que pueden ser analizados en cada uno de los TMAs. En la actualidad contamos con un banco de mas de 400 anticuerpos que se actualizan e incrementan mensualmente, poniendo a punto, nuevos marcadores de interés pronóstico y predictivo de interés para la comunidad científica.

Fruto de la colaboración con distintos centros y grupos de investigación en proyectos de clasificación molecular ha permitido, hasta el momento, el análisis de más de 26.000 muestras incluidas en los más de 190 TMA que se han producido en el CNIO hasta el 2006.

Entre los estudios cooperativos se incluyen procesos linfoproliferativos, fases de progresión del melanoma cutáneo, y diversos estudios de carcinoma de mama, endometrio, colon, próstata y pulmón entre otros.



Microarrays de Tejido (TMAs) inmunoteñido con un anticuerpo monoclonal

#### 1.4. Microarrays de Hibridación Genómica Comparada: (CGH arrays)

Desde un punto de vista genómico-cromosómico el formato del microarray se ha adaptado para la detección de polimorfismos puntuales (SNPs) y para la detección de variaciones en la dosificación o número de copias del genoma mediante arrays de Hibridación Genómica Comparada (CGH array).

Los CGH arrays son herramientas de análisis genómico de escaneado global que responden a preguntas esenciales. Básicamente se emplean para detectar la presencia de ganancias (duplicación o amplificación) o pérdidas (delección o nulisomía) de segmentos del genoma. El material de partida es ADN genómico, por lo que es una técnica que permite emplear material incluido en parafina. La aplicación en el campo de la oncología incluye la detección de nuevas amplificaciones genómicas asociadas a tumores humanos y murinos, la definición en detalle de regiones comúnmente amplificadas (amplicones), la detección de delecciones asociadas a tumores.

Actualmente hay en el mercado diferentes plataformas de CGH array disponibles con diferentes grados de resolución y cobertura de los genomas murino y humano. El CNIO se ha especializado en la producción de plataformas genómicas específicas así como en el asesoramiento del uso y aplicaciones de las herramientas producidas por otras empresas de Biotecnología.

### 2. Proteómica y cáncer

La Unidad de Proteómica del CNIO dispone de un equipamiento completo para el análisis proteómico en distintos tipos de muestras biológicas. Permite, por tanto, el análisis de expresión proteica diferencial en muestras tumorales frente a muestras normales. El equipamiento incluye sistemas de electroforesis bidimensional, así como el necesario para realizar la técnica conocida como DIGE (*Differential In Gel Electrophoresis*), que permite cuantificar de manera muy precisa pequeñas diferencias en la expresión de proteínas entre muestras pareadas. Esta técnica es equivalente, aunque se realiza sobre proteínas y con ciertas limitaciones que le son propias, al análisis de expresión génica diferencial realizado con los microarrays de ADNc.

El CNIO cuenta también con el equipamiento necesario para la determinación de modificaciones post-transduccionales en las proteínas asociadas a determinados estados patológicos. Los proyectos en curso en el CNIO incluyen estudios de expresión

diferencial de proteínas en cáncer colorectal y de identificación de proteínas diferencialmente expresadas en líneas celulares tratadas o resistentes a diversos fármacos.

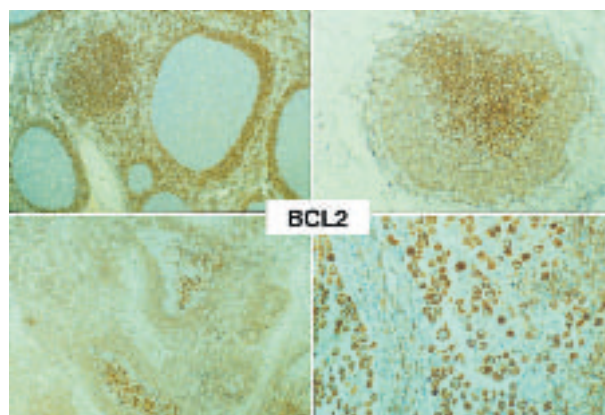
### 3. Bioinformática

Cualquier progreso en genómica, proteómica y otros campos biomédicos requiere un sólido apoyo de la bioinformática, ya que es necesario procesar y manejar de un modo eficiente la abundante información que estas técnicas masivas generan. Durante los últimos años se han realizado grandes avances en el desarrollo de las herramientas web para el análisis masivo de datos de expresión génica. El paquete integrado GEPAS, constituye a día de hoy el más completo disponible en la red.

También se han creado otras herramientas para minería de datos (FatiGo), estudio de polimorfismos *in silico* (SNPGO), diseño de siRNA (pequeño RNA de interferencia que permite inhibir y diseccionar la función de cada gen y estudiar su influencia en la célula viva) y CGH *in silico*. Con el fin de facilitar a la comunidad científica española e internacional el acceso a estas herramientas de bioinformática, se ha creado una página web (<http://bioin-fo.cnio.es/>) en la que se han integrado todas ellas.

### Unidad de Diagnóstico Molecular

Las tradicionales técnicas de diagnóstico histopatológico, basadas en la evaluación microscópica de las lesiones con la ayuda de técnicas de inmunohistoquímica, están siendo complementadas por nuevas herramientas de diagnóstico molecular; imprescindibles para la correcta evaluación y diagnóstico en numerosos tipos de cáncer (linfomas y leucemias, sarcomas infantiles, cáncer familiar, cáncer pulmonar, etc.).



Aplicación de la inmunohistoquímica (BCL2) al diagnóstico

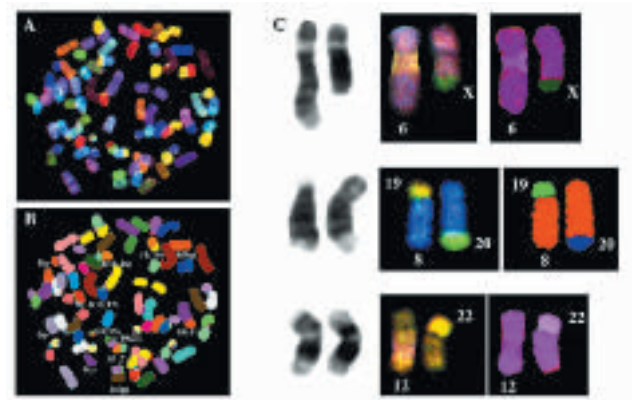
## I. Diagnóstico molecular

La función del diagnóstico molecular es la determinación de cambios en la secuencia o en la expresión de genes críticos en cáncer; mediante técnicas de biología molecular como son PCR, PCR cuantitativa y secuenciación. Estas técnicas de biología molecular se caracterizan por una alta sensibilidad lo que permite realizar un diagnóstico preciso incluso antes de que el cáncer se manifieste clínicamente o determinar la presencia de enfermedad mínima residual en pacientes en remisión clínica. La sección tiene por objeto también el análisis mutacional de receptores de superficie y oncogenes, útil para ayudar en el diagnóstico y, en algunos casos, para predecir la respuesta de los tumores a drogas usadas actualmente en los protocolos de quimioterapia.

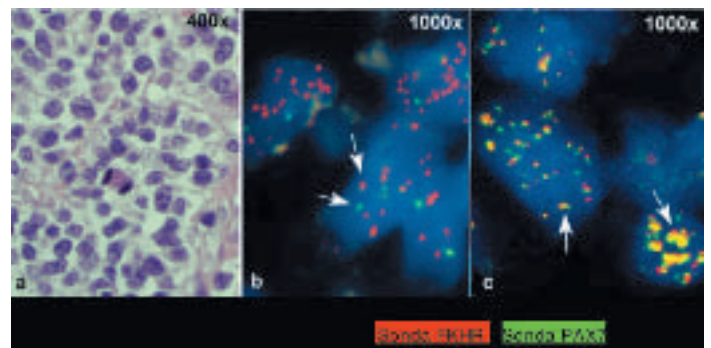
También se incorporan en la rutina diagnóstica otras determinaciones moleculares que constituyen factores predictivos de respuesta terapéutica y condicionan el pronóstico en muchos casos (cáncer de mama, de pulmón, linfomas y leucemias,...).

En el CNIO se han puesto a punto y optimizado numerosas herramientas de diagnóstico molecular; consideradas imprescindibles en el estudio de diferentes neoplasias:

- Determinación de clonalidad linfoide e identificación de reordenamientos génicos en los genes de las inmunoglobulinas y del receptor de células T mediante PCR en leucemias y linfomas.
- Determinación mediante RT-PCR cuantitativa de varias translocaciones encontradas en diferentes tipos de leucemias y linfomas (BCR-ABL, AML1-ETO, PML-RARA, INV(16), BCL2-IGH,). El carácter cuantitativo de estas técnicas permite monitorizar la respuesta al tratamiento



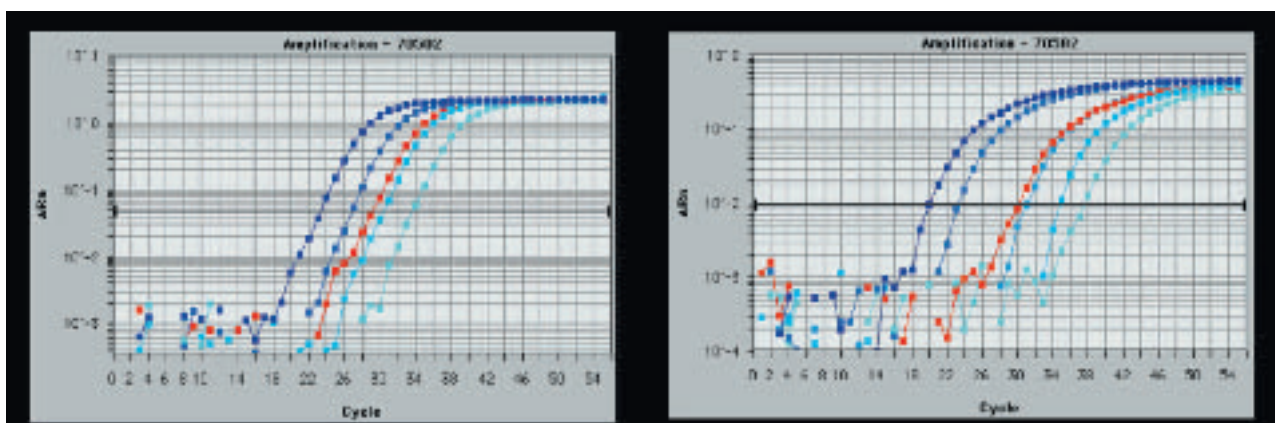
Identificación de alteraciones citogenéticas. Imágenes de la técnica SKY



Imágenes de la técnica FISH aplicada al diagnóstico de sarcomas infantiles

mediante el análisis de la expresión de genes precisos a lo largo del tratamiento.

- Identificación de mutaciones desconocidas mediante secuenciación directa de los genes KIT, EGFR, PDGFRA, y BCR-ABL. La identificación de mutaciones es útil para ayudar en el diagnóstico y, en algunos casos, para predecir la respuesta de los tumores a drogas usadas actualmente en los protocolos de quimioterapia.



PCR a tiempo real para detectar *abl* (imagen izquierda) y *bcr-abl* (imagen derecha)

- Identificación de mutaciones previamente caracterizadas mediante PCR, análisis de restricción o PCR específica de alelo en los genes FLT3, JAK2, y BCR-ABL en cánceres hematológicos.
- Identificación de inestabilidad de microsatélites, fenómeno muy frecuente en cáncer colorrectal.

## Citogenética

La función de la sección de citogenética es el análisis de cromosomas en metafase e interfase como apoyo en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de tumores. Para ello se cuenta con personal altamente formado y con gran experiencia en el estudio de cariotipos tanto convencionales como espectrales, y técnicas de hibridación in situ con fluorescencia (FISH). En el Grupo de Citogenética Molecular, además de las sondas empleadas en los estudios diagnósticos, se desarrollan constantemente nuevas sondas que detectan posibles genes candidatos implicados en el desarrollo y progresión tumoral.

- Identificación de amplificación génica de Her2/NEU mediante FISH.
- Identificación mediante FISH de translocaciones cromosómicas en linfomas y leucemias (Bcl2, Bcl1, NPM/ALK, API2/MALT1, Bcl6,...).
- Identificación mediante FISH de translocaciones cromosómicas en sarcomas (EWS, PAX3, PAX7, t(X;18),...).

## Certificado de calidad

Por otra parte, el uso diagnóstico de técnicas moleculares precisa la implantación de programas que aseguren la calidad de los procesos de diagnóstico molecular en todas sus fases: preanalítica, analítica y post-analítica (informe). Los programas, específicos para cada procedimiento, garantizan la calidad en la identificación del paciente, obtención, preservación y transporte de la muestra, procesamiento molecular de la misma e informe diagnóstico.

El CNIO participa en el programa patrocinado por la Sociedad Española de Anatomía Patológica de Garantía de Calidad en Inmunohistoquímica. La participación incluye distintas actividades tales como la coordinación, actuación como laboratorio central y evaluación de resultados. El CNIO participa en las

tareas organizativas y de coordinación de los tres módulos iniciales, Patología Quirúrgica, Patología Mamaria y evaluación de HER2.

Finalmente, hay que destacar que los laboratorios y unidades tecnológicas implicados en procesos diagnósticos del CNIO disponen, desde 2001, del **Certificado de Calidad según la Norma UNE-EN-ISO 9001:2000**.

En la actualidad estas actividades están también en fase de implantación de la **Norma UNE-EN-ISO 15189:2003** "Laboratorios clínicos: Requisitos particulares para la calidad y la competencia", que es específica para los laboratorios clínicos. La acreditación por la norma UNE-EN ISO 15189:2003, además de cumplir los requisitos de gestión de la calidad (certificación), quiere asegurar la competencia técnica del laboratorio clínico, haciendo hincapié en la competencia técnica del personal y la disponibilidad de todos los recursos técnicos necesarios para producir datos y resultados fidedignos.

## Segundas opiniones

La disponibilidad de toda esta tecnología de diagnóstico molecular ha permitido que el CNIO realice una importante actividad diagnóstica como centro de referencia, orientada fundamentalmente a la obtención de segundas opiniones en casos clínicos y estudios genéticos de cáncer familiar; mediante los acuerdos de colaboración con numerosos centros clínicos de todo el territorio nacional.

Esta actividad beneficia tanto a los pacientes, que de este modo pueden acceder a una segunda opinión sobre el diagnóstico recibido, como al patólogo u oncólogo remitente, quien dispone de un eficiente sistema de control sobre su propia actividad y acceso a técnicas diagnósticas no disponibles en muchos centros hospitalarios. Cabe señalar que la revisión de diagnósticos y segundas opiniones en patología es una actividad actualmente incluida en la Cartera de Servicios de Sistema Nacional de Salud.

La demanda de segundas opiniones diagnósticas o la realización de técnicas moleculares concretas se ha incrementado sustancialmente desde 2001. En el primer año que se ofreció este servicio, el número de consultas fue de 623. Cinco años después, este tipo de estudios se han triplicado, alcanzando un total de 1935 en 2005 y una estimación similar para 2006.