

	PROTOCOLO DE TRABAJO UNIDAD DE CITOGENÉTICA	PT UCG-01/02
	<i>Título- Catálogo de Servicios (Manual de muestras primarias)</i> ANEXO I – CATÁLOGO DE SERVICIOS	
Elaborado por: Sandra Rodríguez-Perales / Jefa Unidad		Fecha: marzo 2021
Revisado / Aprobado por: XXXX / Dtr. Programa Genética del Cáncer Humano		Fecha: marzo 2021

Determinación del cariotipo

Indicación	Descripción	Tipo 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.</p> <p>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 bandeo cromosómico: un tipo de tinción que produce un listado o bandeo 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 bandeo 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

	PROTOCOLO DE TRABAJO UNIDAD DE CITOGENÉTICA	PT UCG-01/02
	Título- Catálogo de Servicios (Manual de muestras primarias) ANEXO I – CATÁLOGO DE SERVICIOS	

Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)

Indicación	Descripción	Tipo muestra	Cantidad (*)	t respuesta
La técnica de hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia (FISH) 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.	Para cada sonda: Determinación de la presencia, disposición y cuantificación del gen o genes en cuestión. 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 la sonda de FISH, hibridación a 37°C, lavados y tinción. Una vez realizado el experimento, se analizará el estado del gen interrogado: deleciónado, reordenado, translocado, amplificado. Este análisis se realizará en microscopio de fluorescencia con los filtros adecuados.	Material fijado en Carnoy	Sedimento celular con 10.000 cels.	3 días
		Material incluido en parafina	<u>Bloques</u> 60% de células tumorales <u>Secciones</u> – 5 secciones de 5 µm de espesor c/u. Región tumoral marcada.	7 días

En concreto, emplearemos la técnica de FISH centrada en diversos genes que pueden estar alterados en diversos tipos de tumores según la siguiente lista:

FISH de alteraciones HEMATOLÓGICAS	
Patología	FISH
LMA	<input type="checkbox"/> t(8;21), <i>RUNX1T1/RUNX1</i>
	<input type="checkbox"/> t(15;17), <i>PML/RARA</i>
	<input type="checkbox"/> 11q23, <i>MLL(KMT2A)</i>
	<input type="checkbox"/> inv(16), <i>MYH11/CBFB</i>
	<input type="checkbox"/> inv(3)-t(3;3), <i>RPN1/MECOM(EVI1)</i>
	<input type="checkbox"/> t(9;22), <i>BCR/ABL1</i>

	PROTOCOLO DE TRABAJO UNIDAD DE CITOGENÉTICA	PT UCG-01/02
	<i>Título- Catálogo de Servicios (Manual de muestras primarias)</i> ANEXO I – CATÁLOGO DE SERVICIOS	

LLA-B adulto	<input type="checkbox"/> t(9;22), <i>BCR/ABL1</i>
	<input type="checkbox"/> 11q23, <i>MLL(KMT2A)</i>
	<input type="checkbox"/> 14q32, <i>IGH</i>
LLA-B infantil	<input type="checkbox"/> 14q32, <i>IGH</i>
	<input type="checkbox"/> 11q23, <i>MLL(KMT2A)</i>
	<input type="checkbox"/> t(12;21)(p13;q22), <i>ETV6/RUNX1</i>
	<input type="checkbox"/> t(9;22), <i>BCR/ABL1</i>
Mieloma múltiple	<input type="checkbox"/> 17p-, <i>TP53</i>
	<input type="checkbox"/> Pérdida 1p, ganancia 1q
	<input type="checkbox"/> 14q32, <i>IGH</i>
	***Si <i>IGH</i> reordenado:
	<input type="checkbox"/> t(11;14), <i>CCND1/IGH</i>
	<input type="checkbox"/> t(14;16)(q32;q23) <i>IGH/MAF</i>
	<input type="checkbox"/> t(14;20)(q32;q12) <i>IGH/MAFB</i>
LLC	<input type="checkbox"/> trisomía 12 deleciones de 13q(<i>D13S319</i>), 17p(<i>TP53</i>) y 11q(<i>ATM</i>)

FISH de alteraciones en TUMORES SÓLIDOS	
<input type="checkbox"/> Amplificación <i>HER2/NEU</i>	<input type="checkbox"/> Co-delección 1p/19q
REORDENAMIENTOS	
<input type="checkbox"/> <i>ETV6</i>	<input type="checkbox"/> <i>EWSR1</i>
<input type="checkbox"/> <i>ALK (2p23)</i>	<input type="checkbox"/> <i>FKHR (FOXO1A)</i>
<input type="checkbox"/> <i>BCL1 (11q13)</i>	<input type="checkbox"/> <i>FUS (ó CHOP)</i>
<input type="checkbox"/> <i>BCL2 (18q21)</i>	<input type="checkbox"/> <i>PDGFB</i>
<input type="checkbox"/> <i>BCL6 (3q27)</i>	<input type="checkbox"/> <i>NMYC</i>
<input type="checkbox"/> <i>IgH (14q32)</i>	<input type="checkbox"/> <i>SYT</i>
<input type="checkbox"/> <i>MALT1 (18q21)</i>	<input type="checkbox"/> <i>MDM2</i>
<input type="checkbox"/> <i>PLAG1</i>	<input type="checkbox"/> <i>MALM2</i>
<input type="checkbox"/> <i>FGFR1, FGFR2 ó FGFR3</i>	<input type="checkbox"/> <i>CDK4</i>
<input type="checkbox"/> <i>MYB</i>	<input type="checkbox"/> <i>USP6</i>
<input type="checkbox"/> <i>NUT</i>	<input type="checkbox"/> <i>CYC</i>
<input type="checkbox"/> <i>BCOR</i>	<input type="checkbox"/> <i>ETV6</i>
<input type="checkbox"/> <i>PTEN</i>	<input type="checkbox"/> <i>TFE3</i>
<input type="checkbox"/> <i>PAX3</i>	<input type="checkbox"/> <i>MET</i>
<input type="checkbox"/> <i>BRAF</i>	<input type="checkbox"/> <i>CDKN2A</i>
	<input type="checkbox"/> Otras sondas (indicar):

	PROTOCOLO DE TRABAJO UNIDAD DE CITOGENÉTICA	PT UCG-01/02
	<i>Título- Catálogo de Servicios (Manual de muestras primarias)</i> ANEXO I – CATÁLOGO DE SERVICIOS	

Separación (enriquecimiento) de células plasmáticas CD138+				
Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad (*)	T respuesta
<p>El antígeno CD138, también conocido como sindecán-1, se expresa principalmente en células plasmáticas normales y malignas de la médula ósea. Además, se encuentra en un subconjunto de células plasmáticas en sangre periférica y ciertos tejidos linfoides. El antígeno CD138 no se expresa en células B vírgenes, células B del centro germinal, células B de memoria, ni en células T o monocitos.</p> <p>Dado que el estudio directo de las células plasmáticas se ve obstaculizado por su baja frecuencia, el enriquecimiento previo de las células plasmáticas utilizando un anticuerpo contra CD138 (asociado por ejem a MicroBeads) permite un análisis celular más preciso, p. ejem. por FISH.</p>	<p>Para la separación de las células CD138+ se utilizarán Microbeads con la que se desarrollarán ensayos de selección positiva de las plasmáticas de PBMC, médula ósea, recolecciones de leucocitaféresis y suspensiones unicelulares de tejidos linfoides.</p>	<p>Sangre periférica</p> <p>Aspirado de médula ósea</p>	<p>5 ml</p> <p>2 ml</p>	<p>7 días</p>

	PROTOCOLO DE TRABAJO UNIDAD DE CITOGENÉTICA	PT UCG-01/02
	<i>Título- Catálogo de Servicios (Manual de muestras primarias)</i> ANEXO I – CATÁLOGO DE SERVICIOS	

Estudio de fragilidad (DEB)				
Indicación	Descripción	Tipo muestra	Cantidad (*)	t respuesta
<p>El estudio de fragilidad cromosómica es una prueba para la evaluación de la inestabilidad cromosómica. El síndrome más común diagnosticado mediante esta prueba, es la Anemia de Fanconi (FA). FA se caracteriza por insuficiencia medular a temprana edad, el aumento del riesgo de cáncer y anormalidades físicas. Los individuos con FA son clínicamente heterogéneos y hasta un 25% de los pacientes con FA conocido presentan pocas o ninguna de las características.</p> <p>La prueba de sensibilidad a DEB se considera como estándar de oro ya que permite analizar aberraciones cromosómicas espontáneas e inducidas por este agente.</p>	<p>A partir de cultivos de linfocitos de sangre periférica expuestos a DEB, se analiza la fragilidad cromosómica identificando rupturas cromatídicas y cromosómicas, presencia de fragmentos céntricos y acéntricos, figuras radiales, translocaciones, anillos, etc.</p> <p>Luego de la exposición de las células a 0,1 µg/ml DEB. Se observa el incremento de las anomalías cromosómicas pos-tratamiento con el agente clastogénico.</p> <p>El número de células que se analizan varía entre 100 y 300 por individuo y por tratamiento. Así mismo se analiza en paralelo una muestra de un individuo sano, ya que las condiciones del cultivo o el agente al que se exponen las células pueden variar. Las diferencias de la frecuencia de aberraciones cromosómica de un paciente con FA son diez veces más que las presentes en un individuo sin FA.</p>	<p>Sangre periférica o médula ósea en tubo con heparina de litio.</p> <p>Es imprescindible el envío de muestra control pareada en sexo y edad (envío lunes/martes).</p>	<p>5 ml</p>	<p>15 días</p> <p>1 mes</p>

	PROTOCOLO DE TRABAJO UNIDAD DE CITOGENÉTICA	PT UCG-01/02
	<i>Título- Catálogo de Servicios (Manual de muestras primarias)</i> ANEXO I – CATÁLOGO DE SERVICIOS	

Array CGH				
Indicación	Descripción	Tipo muestra	Cantidad (*)	t respuesta
<p>La hibridación genómica comparativa o CGH (por sus siglas en inglés Comparative Genomic Hybridization) es un método de citogenética molecular para analizar las variaciones en el número de copias (CNV) en relación con el nivel de ploidía del ADN de una muestra en comparación con una muestra de referencia, esto sin la necesidad de realizar un cultivo celular. El objetivo de esta técnica es comparar de manera rápida y eficiente dos muestras de ADN genómico derivado de dos organismos diferentes, que a menudo se relacionan pues se sospecha que tienen diferencias ya sea en la ganancia o pérdida de cromosomas completos o regiones subcromosomales (una porción del cromosoma). Esta técnica originalmente se desarrolló para evaluar las diferencias entre los complementos cromosómicos de un tumor sólido y el tejido normal y tiene una resolución mejorada de 5-10 megabases en comparación con las técnicas tradicionales de análisis citogenéticos de banda como giemsa y FISH, las cuales están limitadas por la resolución del microscopio utilizado.</p>	<p>Su fundamento técnico implica el aislamiento de ADN de las dos fuentes a comparar, comúnmente la referencia y una muestra, el etiquetado independiente de cada muestra de ADN con diferentes fluoróforos (moléculas fluorescentes) de distintos colores (generalmente rojo y verde), la desnaturalización del ADN para volverlo monocatenario y la hibridación de las dos muestras resultantes en una proporción de 1:1 para una propagación normal de cromosomas en metafase, a los cuales las muestras de ADN marcadas se unirán en su locus de origen. A continuación, las señales fluorescentes de colores se comparan con el uso de un microscopio de fluorescencia y un software, esto a la longitud de onda de cada cromosoma para identificar las diferencias cromosómicas entre las dos muestras.</p>	ADN	<p>500ng (aCGH 8x60k)</p> <p>1ug (aCGH 4x180K)</p>	15 días

	PROTOCOLO DE TRABAJO UNIDAD DE CITOGENÉTICA	PT UCG-01/02
	<i>Título- Catálogo de Servicios (Manual de muestras primarias)</i> ANEXO I – CATÁLOGO DE SERVICIOS	

Cariotipo espectral multicolor (SKY)				
Indicación	Descripción	Tipo 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