

Patología molecular

Técnicas de citogenética molecular: aplicaciones en el diagnóstico e investigación del cáncer

M.J. Calasanz, M.D. Odero, I. Martín-Subero, I. Zudaire, I. Lahortiga, M. Valgañón,
J.L. Vizmanos y J. Novo

Departamento de Genética, Universidad de Navarra, Pamplona.

INTRODUCCIÓN

El análisis citogenético de las células tumorales ha revelado alteraciones cromosómicas clonales en más de 30.000 neoplasias humanas (1). Hoy sabemos que la presencia de determinadas alteraciones cromosómicas aporta una información importante con valor diagnóstico y pronóstico en neoplasias hematológicas y tumores sólidos (2,3). El conocimiento de la alteración cromosómica asociada a un determinado diagnóstico permite hacer un seguimiento de la evolución de la enfermedad, valorar la respuesta al tratamiento y detectar y cuantificar la enfermedad mínima residual. Cada vez en más protocolos clínicos, especialmente en neoplasias hematológicas y sarcomas, las decisiones terapéuticas están basadas, entre otros parámetros, en el análisis genético de las células neoplásicas (4).

Desde la observación en los años sesenta por Nowell y Hungerford (5) de la aparición de un pequeño cromosoma, al que denominaron Philadelphia (Ph), en pacientes con leucemia mieloide crónica, y la posterior descripción en los setenta por Caspersson (6) de técnicas de bandeado cromosómico, el análisis citogenético ha sido en los últimos 30 años una de las áreas de la genética que

se ha desarrollado con más rapidez (Tabla 1). Proporciona información muy valiosa, no sólo clínica sino también básica, en la investigación del cáncer. La descripción de alteraciones cromosómicas asociadas específicamente a un tipo de cáncer y su posterior seguimiento ha permitido conocer la significación clínica de muchos marcadores citogenéticos y, más importante todavía, se ha constituido como un paso previo a la detección y localización de los genes implicados en la génesis tumoral.

En neoplasias hematológicas, debido a la facilidad de obtener metafases de calidad a partir de cultivos de la médula ósea, el análisis citogenético convencional se ha incorporado en los laboratorios de genética como una técnica de rutina, que complementa al diagnóstico morfológico e inmunofenotípico. Existe mucha información a partir de grandes series publicadas y de la experiencia, no sólo de las alteraciones cromosómicas que se asocian específicamente a un determinado tipo de leucemia y linfoma (7) (Tablas 2 y 3) sino también de su valor pronóstico (8). Por ejemplo, la presencia en el cariotipo de un cromosoma Philadelphia $-t(9;22)-$ en un paciente diagnosticado de leucemia aguda linfoblástica confiere un pronóstico muy desfavorable. Esta observación lle-

Tabla 1. Algunas fechas de interés en el área de la citogenética.

1956	Tjio y Levan	Establecen el número de cromosomas del hombre en 46
1960	Nowell/Hungerford	Describen el cromosoma Philadelphia (Ph) en la leucemia mieloide crónica
1970	Caspersson y cols.	Describen las primeras técnicas de bandeado cromosómico
1971	Conferencia París	3ª conferencia de nomenclatura cromosómica, 1ª con bandas
1973	Rowley	Describe al cromosoma Ph como una t(9;22)
1975	Southern	Describe la técnica de <i>Southern-blot</i>
1981	Langer y cols.	Describen sondas no radiactivas para hibridación <i>in situ</i>
1981, 1984	Wake y cols.	Describen mejoras en el cultivo de tumores sólidos utilizando la disociación con colagenasa
1985	Mullis	Describe la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
1992	Kallioniemi y cols.	Describen la técnica de hibridación genómica comparada (CGH)
1992	Weber-Matthiesen y cols.	Describen la técnica de FICTION (<i>Fluorescence Immunophenotyping and Interphase Cytogenetics as a Tool for the Investigation of Neoplasms</i>)
1996	Schrök y cols.	Describen la técnica de cariotipo espectral (SKY-FISH)
1996	Speicher y cols.	Describen la técnica de multiplex-FISH (M-FISH)

varía a una actitud terapéutica distinta y más agresiva que si se detectara en el mismo diagnóstico una alteración cromosómica de buen pronóstico, como por ejemplo un cariotipo hiperdiploide de más de 50 cromosomas.

En los síndromes linfoproliferativos crónicos, debido a su bajo índice mitótico, la incidencia de anomalías citogenéticas depende en gran medida de las técnicas utilizadas para su detección (9). La información acerca de marcadores citogenéticos en los síndromes linfoproliferativos es menor (1), resultando una mayor proporción de cariotipos normales. Una de las formas de evitar esta dificultad es añadir al cultivo mitógenos (TPA, TNF, IL-2, PK, entre otros), que permiten detectar con mayor frecuencia cariotipos anómalos. No obstante, mediante el empleo de mitógenos también puede seleccionarse el crecimiento de la población celular no neoplásica. En el caso de los linfomas, el análisis citogenético convencional presenta más dificultades que en las leucemias: los cariotipos tienden a ser más complejos, el acceso al tejido implicado es más limitado y existen numerosos tipos histológicos con características clínicas distintas (10). Sin embargo, los estudios que han correlacionado los marcadores citogenéticos con el pronóstico sugieren que, al igual que en las leucemias, algunas alteraciones cromosómicas en linfomas tienen una significación pronóstica independiente (11).

En el caso de los tumores sólidos hay factores, fundamentalmente metodológicos, que han frenado la incorporación del análisis citogenético convencional a la rutina diagnóstica, que pudiera complementar al diagnóstico anatomopatológico. Entre los obstáculos técnicos para obtener metafases analizables a partir de muestras de tumor caben destacar, entre otros, la baja viabili-

dad celular debido a la necrosis de la muestra, la necesidad de disgregación enzimática de la muestra, la contaminación microbiana, la "contaminación" con células normales y, por último, debido al tiempo de manifestación clínica de la mayor parte de los tumores, la ocurrencia de alteraciones cromosómicas muy complejas y variables que hacen difícil determinar el cambio cromosómico primario asociado con un tipo de tumor (12) (Tabla 4).

Estos factores han llevado al desarrollo, en los últimos años, de métodos citogenéticos alternativos para identificar alteraciones cromosómicas. La incorporación de nuevas técnicas de citogenética molecular basadas en la hibridación *in situ* con fluorescencia, y la mayor coordinación y colaboración entre cirujanos, patólogos, oncólogos y genetistas han hecho que el análisis citogenético de tumores sólidos haya experimentado un enorme avance. En el penúltimo catálogo de alteraciones cromosómicas asociadas a neoplasias (1), un 27% de 22.076 alteraciones cromosómicas descritas corresponden a tumores sólidos y el resto a neoplasias hematológicas. Sólo cuatro años después el último catálogo recoge cerca de 100.000 alteraciones en más de 30.000 neoplasmas, de los que aproximadamente 21.000 son leucemias, 3000 linfomas y 8100 se refieren a tumores sólidos (13). Todas las alteraciones cromosómicas descritas en el cáncer pueden consultarse en la base de datos del Proyecto de Alteraciones Cromosómicas en Cáncer (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCAP>).

De forma paralela a la acumulación de datos puramente citogenéticos que implican cambios genéticos en el proceso tumoral, el desarrollo de las técnicas de genética molecular durante los años ochenta (Tabla 1) ha per-

Tabla 2. Alteraciones cromosómicas recurrentes en leucemias y genes implicados*.

	Alteración citogenética	Genes implicados
Mieloides		
LMC	t(9;22)(q34;q11)	<i>ABL-BCR</i>
LMC crisis blástica	t(9;22)(q34;q11), +8,+19,+Ph1,i(17q)	<i>ABL-BCR</i>
LANL-M2	t(8;21)(q22;q22)	<i>ETO-AML1</i>
LANL-M3	t(15;17)(q22;q11-12)	<i>PML-RARA</i>
LANL-M4Eo	inv(16)(p13q22) ó t(16;16)	<i>MYH11-CBFB</i>
LANL-M5	t(9;11)(p22;q23)	<i>AF10-MLL</i>
LANL	t(6;9)(p23;q34)	<i>DEK-CAN</i>
	t(3;3)(q21;q26)	<i>EVII</i>
	o inv(3)(q21q26)	
	+8,-7,-5,del(5q),del(20q),12p	
LANL-terapia	-7,del(7q),-5,del(5q)	
	t(11q23)	<i>MLL</i>
LMMC	t(5;12)(q33;p13)	<i>PDGFRB-TEL(ETV6)</i>
SMD	-7,del(7q),-5,del(5q), +8,del(11q),del(20q), del(11q),del(12p)	
Linfoides		
LAL preB	t(1;19)(q23;p13)	<i>PBX1-E2A</i>
	t(5;14)(q31;q32)	<i>IL3-IGH</i>
	t(12;21)(p13;q22)	<i>TEL-AML1</i>
LAL B(Sig+)	t(8;14)(q24;q32)	<i>MYC-IGH</i>
	t(2;8)(p12;q24)	<i>IGK-MYC</i>
	t(8;22)(q24;q11)	<i>MYC-IGL</i>
LAL B o B-mieloide	t(9;22)(q34;q11)	<i>ABL-BCR</i>
	t(4;11)(q21;q23)	<i>AF4-MLL</i>
LAL T	t(1;14)(p32;q11)	<i>TALI/SCL-TCRA</i>
	t(1;7)(p34;q34)	<i>LCK-TCRB</i>
	t(8;14)(q24;q11)	<i>MYC-TCRA</i>
	t(7;9)(q35;q34)	<i>TCRB-TAL2</i>
	t(7;9)(q34;q34.3)	<i>TCRB-TANI</i>
	t(7;10)(q35;q24)	<i>TCRB-HOX11</i>
	t(10;14)(q24;q11)	<i>HOX11-TCRA</i>
	t(11;14)(p13;q11)	<i>RBTN2/TIG2-TCRA/D</i>
	t(7;11)(q35;p13)	<i>TCRB-RBTN2/TIG2</i>
	t(11;14)(p15;q11)	<i>RBTN1/TIG1-TCRA/D</i>
	del(9p),t(9p)	
LLC-B	t(14;18)(q32;q21)	<i>IGH-BCL2</i>
	t(11;14)(q13;q32)	<i>BCL1-IGH</i>
	t(14;19)(q32;q13)	<i>IGH-BCL3</i>
	t(2;14)(p13;q32)	<i>BCL11A-IGH</i>
	+12,del(13q)	
	del(11)(q21q23)	
LLC-T	t(8;14)(q24;q11)	<i>MYC-TCRA</i>
	t(14;14)(q11q32)	<i>TCRA-TCL1</i>
	inv(14)(q11q32)	<i>TCRA-TCL1</i>
MM	t(11;14)(q13;q32)	<i>BCL1(Cyclin-D1)-IGH</i>
	t(4;14)(p16;q32)	<i>FGFR/MMSE-T3-IGH</i>
	t(14;16)(q32;q23)	<i>IGH-CMAF</i>
	t(6;14)(p25;q32)	<i>MUM1(IRF4)-IGH</i>
	t(1;14)(q21;q32)	<i>MUM2/3-IGH</i>
	1q, 13q,del(6q)	<i>TNF</i>
	del(7q)	<i>GPI70</i>

*La lista completa de alteraciones cromosómicas y genes implicados en leucemias puede ser consultada en <http://www.ncbi.nlm.gov/CCAP>

Tabla 3. Translocaciones cromosómicas recurrentes en linfomas no Hodgkin y genes implicados*.

	Alteración citogenética	Genes implicados
LNH-B		
Burkitt	t(8;14)(q24;q32)	<i>MYC-IGH</i>
	t(2;8)(p11;q24)	<i>IGK-MYC</i>
	t(8;22)(q24;q11)	<i>MYC-IGL</i>
Folicular	t(14;18)(q32;q21)	<i>IGH-BCL2</i>
	t(2;18)(p12;q21)	<i>IGK-BCL2</i>
	t(18;22)(q21;q11)	<i>BCL2-IGL</i>
	t(1;22)(q22;q11)	<i>FCGRIIB-IGL</i>
DCG	t(3;22)(q27;q32)	<i>BCL6-IGL</i>
	t(3;14)(q27;q32)	<i>BCL6-IGH</i>
	t(2;3)(p12;q27)	<i>IGK-BCL6</i>
	t(14;15)(q32;q11-q13)	<i>IGH-BCL8</i>
	t(10;14)(q24;q32)	<i>NFKB2(LYT10)-IGH</i>
	t(14;18)(q32;q21)	<i>IGH-BCL2</i>
	t(8;14)(q24;q32)	<i>MYC-IGH</i>
	t(6;14)(p21;q32)	<i>CyclinD3-IGH</i>
	t(1;14)(q21;q32)	<i>MUC1-IGH</i>
Manto	t(11;14)(q13;q32)	<i>BCL1(CyclinD1)-IGH</i>
Marginal Linfoplas-mocitoide	t(9;14)(p13;q32)	<i>PAX5-IGH</i>
Malt	t(11;18)(q21;q21)	<i>API2-MLT</i>
	t(1;14)(p22;q32)	<i>BCL10-IGH</i>
Linfocítico	t(14;19)(q32;q13)	<i>IGH-BCL3</i>
Esplénico	t(7;14)(q21;q32)	<i>CDK6-IGH</i>
Velloso	t(2;7)(p12;q21)	<i>IGK-CDK6</i>
Otros	t(11;14)(q23;q32)	<i>PAFAH2-IGH</i>
	t(11;14)(q23;q32)	<i>RCK-IGH</i>
	t(12;14)(q24;q32)	<i>BCL7A-IGH</i>
	t(12;22)(q24;q32)	<i>CyclinD2-IGL</i>
LNH T		
Anaplásico K1+ (T o B)	t(2;5)(p23;q35)	<i>ALK-NPM</i>
Variable	t(10q24)	<i>NFKB2(LYT10)</i>
	t(7;14)(q35;q11)	<i>TRCB-TRCA/D</i>
	t(7;14)(p15;q11)	<i>TCRG-TCRA/D</i>
	t(7;7)(p15;q11)	<i>TCRG</i>
	t(11;14)(p13;q11)	<i>RBTN2-TRCD</i>
	inv(14)(q11q32)	<i>TCRA-TCL1</i>

*La lista completa de alteraciones cromosómicas y genes implicados en los linfomas puede ser consultada en <http://www.ncbi.nlm.gov/CCAP>

Tabla 4. Algunas de las alteraciones cromosómicas recurrentes descritas en tumores sólidos*.

Alteraciones cromosómicas y genes implicados	
Benignos	
Adenoma de colon	+7,+8,+12,del(12q)
Lipoma	t(3;12)(q27;q14)(<i>LPP-HMGIC</i>),t(1;12).t(2;12),t(5;12),del(12q),del(13q)
Neuroepitelioma	t(11;22)(q24;q12)
Neurinoma	-22,-Y
Fibroma de ovario	+12
Leiomioma de útero	r(1),t(2;12),del(7q)(q21q31),t(12;14),+12,t(12q13),1p36,10q22,-13,-22,t(1;2),inv(X)(p22q13)
Glándulas salivales (T. mixto)	t(1;8),t(3;8)(p21;q12)(<i>CTNNB1-PLAG1</i>),t(6;8),t(8;13),del(8q),t(8;9),t(9;12),inv(12)(p13q13)
Adenoma renal	-Y,+7,+17
Malignos	
Liposarcoma mixoide	t(12;16)(q13;p11),(<i>DDIT3-FUS</i>)
Sarcoma sinovial	t(X;18)(p11;q11,genes <i>SYT-SSX1/2</i>)
Sarcoma de Ewing	t(11;22)(q24;q12)(<i>FLI- EWS</i>),t(21;22)(q22;q12)(<i>ERG- EWS</i>),t(1;16)(q11;q11),+8
Rabdomiosarcoma	t(2;13)(q35;q14)(<i>PAX3-FKHR</i>),t(1;13)(p36;q14)(<i>PAX7-FKHR</i>)
Condrosarcoma	-Y,t(9;22)(q22;q12)(<i>CSMF-EWS</i>)
Fibrosarcoma	-Y
Sarcoma de células claras	t(12;22)(q13,q12)(<i>ATF1-EWS</i>)
Vejiga (ADC)	+7,del(10p),i(5p),i(11p),del(11p),i(11q).13q14, LOH,3p,12q,mutacp53
Próstata (ADC)	del(10)q24,+7,-Y, ganancias:3q,7q,8q,Xq
Pulmón (SCLC)	del(3)(p14p23)(<i>FHIT</i>),+7,del(5q),13q(<i>RB</i>);LOH(3p),5q,6,9p,(p16),17q,17p(p53), <i>MYC,RAS</i>
Colon (ADC)	del(17p),-18,dmin,LOH18q(gen <i>DCC</i>),mutac gen APC, p53,12q,17q,+12,del(1p)
Riñón (ADC)	del(3p),t(3;5),t(3;8),i(5p),del(6q).t(X;1)(p11;q21)(<i>TFE31-PRCC</i>),-3,+7,+8,+10,-Y, inv(7)(p15q34)
Útero	+10,i(1q),del(6)(q21),1q21
Ovario	del(6q),del(3p),t(1;17),dmin,hsr.gen <i>AKT2,KRAS,BRCAl,OVC</i> ,+12,+7,+8
Tiroides	inv(10)(q11q21)(<i>RET</i>),t(7;10)(q35;q21)
Glomas	+8, fusiones teloméricas,-7,-10,-22,-X.Y,del(22)q11,del(9p), amplif.12q, inactivación de <i>p53,p16,RB,PTEN</i> . Sobreexpresión de <i>CDK4,EGFR,VEGF</i>
Melanoma	t(1;6),t(1;19),i(6p),+7,del(9p)(13),del(6q),1q11,del(1)(p11p22)
Mesotelioma	t,dup,del,inv(3)(p21p23)
Retinoblastoma	i(6p),del(13)(q14),1q,LOH13q
Neuroblastoma	del(1)(p32p36),t(1;17)(p36;q14),dmin.amplif <i>NMYC</i> , ganancias 1q21-q25
Testicular	i(12p)(10), amplif <i>KRAS</i>
Wilms	del(11)(p13),del(11)(p15),i(1q),t(1;16)(q10;q10),LOH 11p
Mama	-17,i(1q),t(1;16),del(1q),del(3p)(p12p14),del(6q).+7,+18,+20, del,t 1p, t(1q),t(7q), t(11q),dup(11q),dmin,hsr(8p),mutaciones <i>p53,BRCAl</i> ,amplificación de <i>HER2/neu</i> , amplificación 20q

*La lista completa de alteraciones cromosómicas y genes implicados en tumores sólidos puede ser consultada en <http://www.ncbi.nlm.gov/CCAP> y http://www.helsinki.fi/~lgl_www/CMG.html

mitido conocer los mecanismos patogénicos subyacentes. Hasta el momento se han identificado 1800 puntos de rotura en las alteraciones cromosómicas asociadas a neoplasias. Muchos de ellos ya han sido caracterizados molecularmente, lo que ha permitido la identificación de nuevos oncogenes y genes supresores de tumores (7, 14, 15). Existen bases de datos actualizadas que permiten consultar información detallada acerca de los aproxima-

damente 100 genes identificados hasta el momento en las 600 reordenaciones cromosómicas equilibradas asociados a neoplasias humanas: <http://www.ncbi.nlm.gov/CGAP>, <http://infobiogen.fi/services/chrom-cancer>

Así, cada día son más conocidas las alteraciones citogenéticas que causan la transformación neoplásica y los mecanismos moleculares subyacentes. En los linfomas, las translocaciones t(8;14), t(14;18) y t(11;14) asociadas

a linfomas de Burkitt, folicular y del manto, respectivamente, han permitido localizar y aislar los oncogenes implicados en estas enfermedades: *c-MYC* (16, 17), *BCL-2* (18, 19) y *BCL-1* (20). En estos casos el mecanismo molecular subyacente consiste en la activación de estos protooncogenes por yuxtaposición con secuencias reguladoras de un gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgH), provocando una sobreexpresión de la proteína codificada por el protooncogén (21).

La translocación t(9;22) asociada a leucemia mieloide crónica) permitió describir otro mecanismo molecular. En este caso se produce la activación oncogénica por la translocación del oncogén *ABL* con el oncogén *BCR*, formando un gen de fusión híbrido (*BCR-ABL*) (22) que codifica una proteína quimérica con potencial neoplásico. Este mecanismo es muy frecuente en numerosas translocaciones descritas en leucemias y sarcomas (23, 24).

La activación de un protooncogén puede darse no sólo por translocaciones cromosómicas sino también por amplificación génica, como en el caso de los genes *REL* y *c-MYC* (25) o *ERB-B2* (26).

Por último, otro tipo de alteración citogenética frecuente en neoplasias es la delección cromosómica que a nivel molecular puede ser un mecanismo de inactivación de genes supresores tumorales. Por ejemplo, delecciones del brazo corto del cromosoma 17 provocan la pérdida de un alelo del gen *TP53*, y si el otro alelo está mutado el gen se inactiva (27).

En resumen, el enorme avance en el conocimiento de las alteraciones cromosómicas descritas en el cáncer ha permitido no sólo conocer la importancia clínica de dichas alteraciones sino también caracterizar molecularmente muchas de ellas, identificando y clonando los genes implicados (13) (Tablas 2 a 4). El descubrimiento de nuevos genes que participan en la génesis y progresión tumoral permitirá conocer mejor la biología del tumor, y hará posible el diseño de nuevas estrategias terapéuticas y nuevos análisis moleculares para el correcto diagnóstico y monitorización de los pacientes.

TÉCNICAS DE ANÁLISIS GENÉTICO

De las técnicas citogenéticas que existen, tanto convencionales (cariotipo de bandas G) como de hibridación *in situ* con fluorescencia, sólo describiremos las características, ventajas y limitaciones de aquellas de citogenética molecular que se han incorporado como rutina diagnóstica (hibridación *in situ* con fluorescencia [FISH con-

vencional]), y de algunas de las que todavía son utilizadas como investigación: hibridación genómica comparada (CGH), cariotipo espectral (SKY-FISH), multiplex-FISH (M-FISH) y FICTION.

Citogenética molecular (hibridación *in situ* con fluorescencia)

Las técnicas de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) se basan en la hibridación de una sonda de ADN marcada con una sustancia fluorescente sobre su secuencia complementaria del genoma, bien en la metafase cromosómica o en el núcleo en interfase. Las técnicas de FISH vienen utilizándose desde los años ochenta (28), si bien no se han incorporado en todos los laboratorios como rutina. Su alta sensibilidad y especificidad y la rapidez de los ensayos han hecho de esta técnica una importante estrategia diagnóstica con numerosas aplicaciones (29). Por otra parte, otras técnicas derivadas de la FISH han progresado hasta tal punto que hoy es posible, como veremos más adelante, utilizar simultáneamente 24 sondas de pintado cromosómico, con lo cual se consigue identificar cada cromosoma por su color. Entre las técnicas derivadas de la FISH convencional cabe destacar la hibridación genómica comparada (CGH), de enorme utilidad en tumores sólidos, y el cariotipo multicolor (SKY-FISH y M-FISH). Todas ellas constituyen una nueva disciplina a la que se ha denominado citogenética molecular, que complementan pero nunca excluyen al análisis citogenético convencional (cariotipo de bandas G).

FISH convencional

Los dos componentes principales de la técnica de FISH convencional son la sonda de ADN marcada con fluorescencia y la secuencia diana en la muestra tumoral para la cual es específica. Es muy importante destacar que no es una técnica de búsqueda de nuevas alteraciones cromosómicas, sino que únicamente detecta aquello que buscamos, permaneciendo el resto del genoma oculto.

Podemos utilizar sondas de ADN de distintos tipos: centroméricas (marcan únicamente las zonas centroméricas); de pintado cromosómico (marcan todo un cromosoma) y de secuencias específicas de *locus* (marcan regiones cromosómicas de secuencia única) (Figs. 1 y 2).

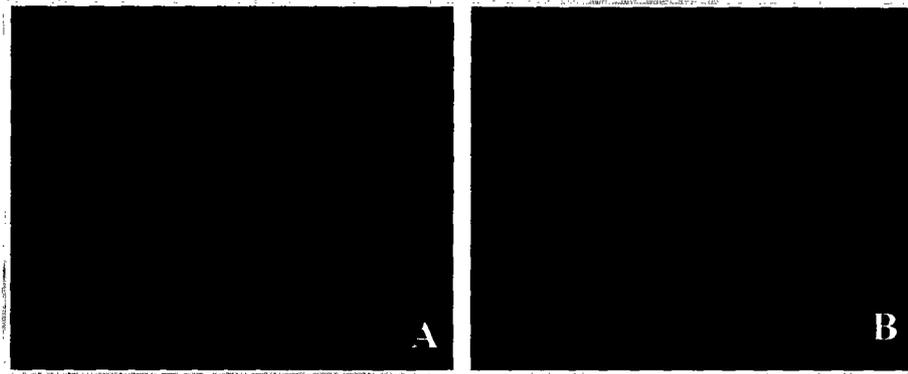


Figura 1. Imágenes de FISH en núcleos en interfase de pacientes con neoplasias hematológicas. La figura A muestra un ensayo de FISH con la sonda centromérica del cromosoma 12 (señales verdes) en un paciente con leucemia linfática crónica. Se observan núcleos normales (dos señales) y núcleos con trisomía 12 (tres señales). La figura B muestra un ensayo de FISH bicolor con sondas para el centrómero de los cromosomas X (señales verdes) e Y (señal roja) en un paciente con leucemia mieloide crónica después de un trasplante heterólogo de médula ósea. Se observa una célula con señales verdes (femenina) y dos células con una señal verde y otra roja (masculinas).

Esta técnica complementa perfectamente a la citogenética convencional en todas aquellas situaciones en que no ha sido posible realizar un cariotipo: al disponer de metafases de poca calidad, o no haber obtenido metafases, o bien en los casos en que las alteraciones cromosómicas asociadas a un diagnóstico son crípticas no visibles en el cariotipo, como el caso de la $t(12:21)$ en leucemia aguda linfoblástica infantil.

Ventajas

- No requiere células en división, ya que permite el análisis no sólo de metafases sino también de núcleos en interfase.
- Puesto que no es imprescindible analizar metafases, además de tejidos frescos permite emplear muestras congeladas y tejido incluido en parafina, lo que hace esta técnica muy útil en estudios retrospectivos de tumores sólidos.



Figura 2. Imagen de la amplificación del oncogén *ERB-B2* estudiada mediante FISH en un caso de cáncer de mama. El análisis se realizó sobre una sección de tejido incluido en parafina. Cada señal verde representa una copia del gen.

- Es una técnica rápida (24 horas) y en poco tiempo pueden ser analizadas un gran número de células.
- Tiene una sensibilidad y especificidad altas.
- Detecta anomalías cromosómicas numéricas y estructurales siempre que dispongamos de las sondas.
- Permite la identificación de cromosomas, de origen no determinado por el cariotipo, si se tiene alguna pista de qué cromosomas pueden estar implicados, ya que debe elegirse una o más sondas de ADN.
- Es muy útil para descartar alteraciones crípticas concretas o microdeleciones, no visibles en el cariotipo.
- Permite la monitorización: seguimiento de una terapia antitumoral, detección de enfermedad mínima residual, detección temprana de recaídas y cuantificación de células genéticamente alteradas.
- Es de gran utilidad en el análisis de trasplantes de médula ósea heterólogos. Se pueden utilizar sondas centroméricas de los cromosomas X e Y y analizar las señales de ambos cromosomas en un gran número de núcleos.
- Permite la detección de deleciones génicas y ampliaciones génicas.
- Por último es de gran utilidad en investigación genético-médica, ya que permite determinar la localización precisa de los puntos de rotura cromosómicos en tumores en la búsqueda de nuevos genes implicados en el cáncer, y detectar y localizar genes de interés ya conocidos.

Inconvenientes

- No es una técnica de *screening* (la sonda se elige en función de la anomalía cromosómica que queramos detectar).
- No suele emplearse, excepto en casos especiales como el comentado de los trasplantes, como técnica única sino complementaria al cariotipo, si éste no resulta informativo.
- Tiene un elevado coste económico, tanto en sondas de DNA como en analizadores de imagen.
- Su utilización depende de la disponibilidad de sondas de DNA.
- Debido a hibridaciones inespecíficas, es necesario calcular para cada sonda la tasa de falsos positivos y falsos negativos.
- No pueden detectarse muchas alteraciones simultáneamente.

CGH (hibridación genómica comparada)

Como ya se ha mencionado, uno de los mayores problemas a los que se enfrenta la citogenética convencional es la ausencia de metafases, y su gran ventaja reside en ser una técnica que permite analizar todo el genoma. La técnica de FISH convencional ha resuelto el primer problema, ya que permite analizar núcleos en interfase; pero en cambio su gran limitación es que no es una técnica de *screening*, como el cariotipo, ya que sólo detecta las alteraciones previamente seleccionadas. A principios de los noventa, y con especial aplicación en tumores sólidos, donde obtener metafases de calidad es a menudo complicado, se describió una nueva técnica de citogenética molecular: la hibridación genómica comparada (CGH) (30). Esta técnica emplea ADN del tumor y, además, no analiza metafases, obviando la necesidad de células en crecimiento.

Esta técnica derivada del FISH se basa en la hibridación competitiva de dos ADN (tumoral y control normal), marcados con distintos fluorocromos, sobre cromosomas normales (Fig. 3). En resumen: se marca el ADN del tumor con un fluorocromo verde y un ADN

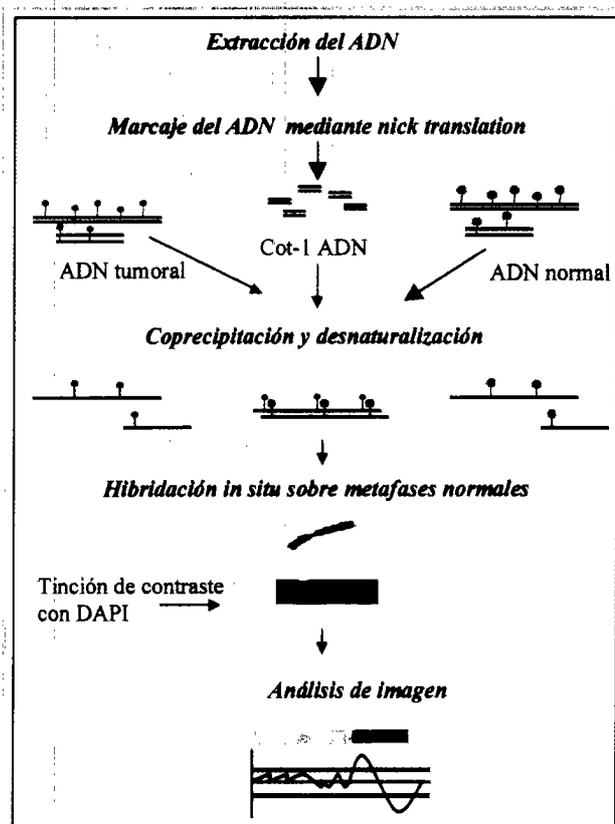


Figura 3. Representación de las etapas de la técnica de CGH.

normal (control) con un fluorocromo rojo. Ambos ADN se mezclan en cantidades equimolares y se realiza una hibridación *in situ* sobre cromosomas metafásicos normales. Ambos ADN compiten por hibridar en los mismos lugares cromosómicos. En condiciones normales (tumor sin alteraciones genéticas), como la cantidad de ADN marcado en rojo y verde es la misma, el resultado final son cromosomas amarillos (mezcla 1:1 de rojo y verde). En condiciones patológicas, si el tumor contiene alguna ganancia cromosómica, la cantidad de ADN

tumoral disponible para hibridar es mayor, y la hibridación de esa zona resultará en una mayor proporción de fluorocromo del tumor (verde). Al contrario, si el tumor contiene una deleción (pérdida) la región delecionada aparecerá en rojo, ya que habrá más cantidad de ADN normal (rojo) para hibridar en esa región cromosómica. La CGH permite, por tanto, la detección de ganancias y pérdidas de regiones cromosómicas en todo el genoma del tumor por la comparación de las intensidades de las señales de hibridación (Fig. 4).

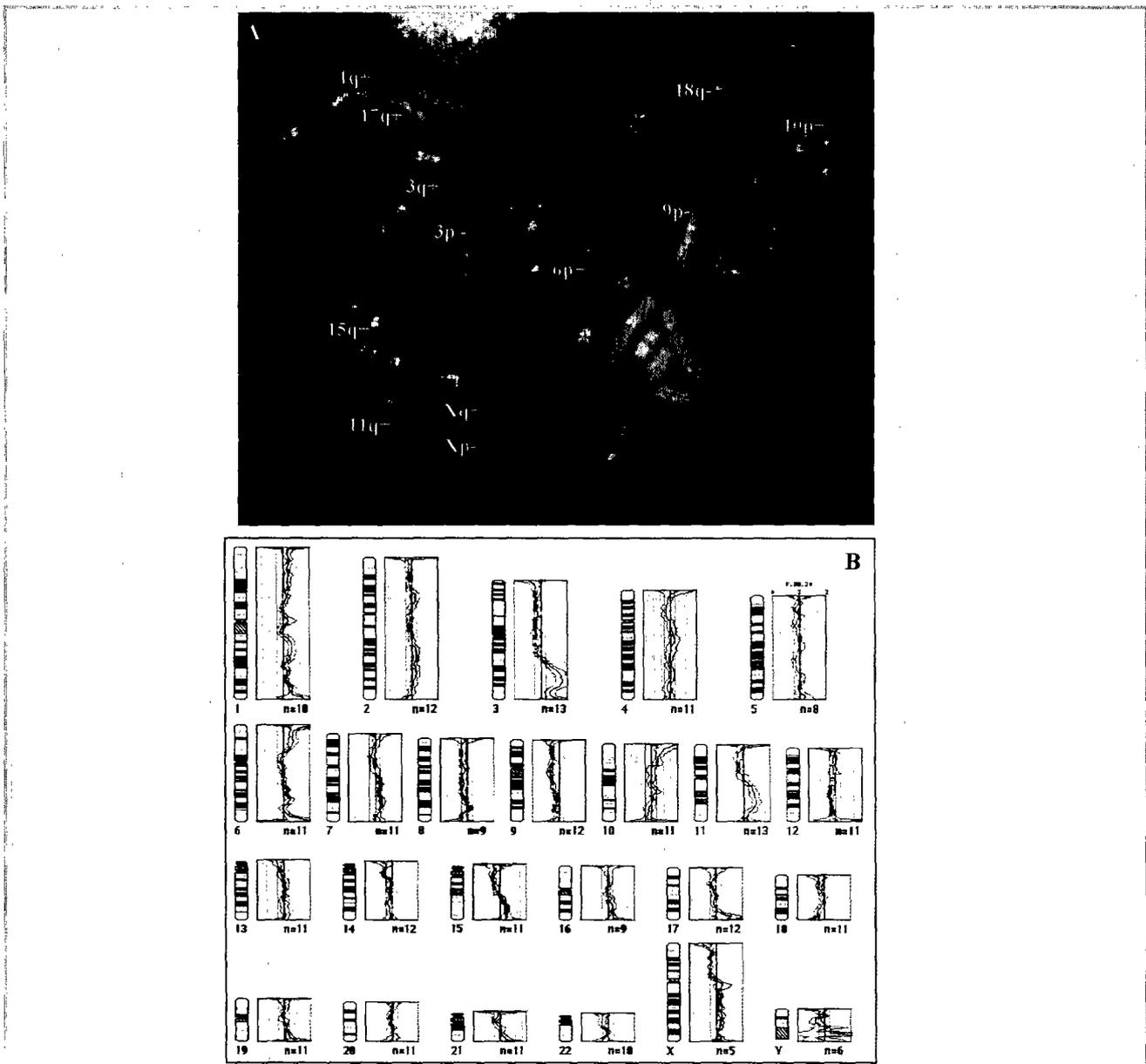


Figura 4. Análisis mediante CGH de una paciente con cáncer de mama. A) Imagen real de una de las metafases estudiadas. B) Análisis del cociente de intensidades. En este ejemplo se detectaron ganancias en 1q, 3q22-qter, 6p, 10p, 11q, 15q24-qter, 17q24-qter, Xq y pérdidas en 3p, 18q21-qter y Xp.

La CGH ha contribuido significativamente al conocimiento actual de las alteraciones genómicas en las neoplasias humanas. Además de definir patrones de ganancias y pérdidas específicas de tumor, proporciona información para la identificación de nuevos genes implicados en la oncogénesis. Actualmente esta técnica se utiliza sobre todo para detectar alteraciones cromosómicas en tumores sólidos, donde la obtención de metafases presenta muchas dificultades técnicas. En sólo ocho años desde su aparición se han publicado más de 3900 trabajos de CGH en tumores (31-35), de los que sólo 1/10 corresponden a leucemias y linfomas (36). En neoplasias hematológicas, la CGH está casi restringida a síndromes linfoproliferativos crónicos, ya que en ellos el índice mitótico de las células tumorales es generalmente muy bajo (37).

Todas las alteraciones cromosómicas, ganancias y pérdidas, descritas en el cáncer por CGH pueden consultarse en la base de datos actualizada de la Universidad de Helsinki (<http://www.helsinki.fi/~lgl/www/CMG.html>).

Ventajas

- Utiliza DNA tumoral, por tanto no requiere células en división (metafases tumorales).
- Es una técnica que permite analizar en un solo experimento todo el genoma celular.
- Puesto que analiza ADN tumoral, además de tejidos frescos permite emplear muestras congeladas o incluidas en parafina, lo que hace a esta técnica muy útil en estudios retrospectivos de tumores sólidos.
- Tiene aplicaciones diagnósticas y es especialmente útil en tumores sólidos.
- Contribuye en la investigación biomédica a la localización de nuevos oncogenes y genes supresores de tumores.

Inconvenientes

- La sensibilidad de esta técnica depende del porcentaje de células tumorales presentes en la muestra (debe ser >30%). En el caso de muestras incluidas en parafina es importante asegurarse de que el corte no esté "contaminado" con células no tumorales. Es muy conveniente utilizar microdissección.

- Sólo detecta alteraciones cromosómicas numéricas: ganancias (duplicaciones, amplificaciones) y pérdidas (deleciones).
- No detecta translocaciones ni otras alteraciones cromosómicas equilibradas.
- Tiene un elevado coste económico.
- Requiere un equipo informático sofisticado de tratamiento de imagen.
- Es imprescindible disponer de personal muy experimentado en la interpretación de los resultados.
- Es una técnica lenta por la complicación técnica (de siete a diez días).
- No detecta diferentes clones celulares, y proporciona un valor medio de ganancias y pérdidas.

Cariotipo multicolor (SKY-FISH y M-FISH)

El cariotipo espectral (SKY-FISH) (38) y el multi-FISH (M-FISH) (39) son técnicas de citogenética molecular desarrolladas recientemente, y de momento sólo se utilizan en el campo de la investigación. Su fundamento técnico es sencillo. En resumen: 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 marcado se hibrida sobre los cromosomas de las metafases del tumor; el cromosoma anómalo no aparecerá uniforme, sino con los colores de los cromosomas que intervienen en la translocación. 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.

El cariotipo multicolor ha mostrado ser muy útil en neoplasias hematológicas, donde no es difícil obtener metafases tumorales (Fig. 5). Se han podido caracterizar correctamente translocaciones complejas, y también detectar alteraciones cromosómicas crípticas en cariotipos aparentemente normales. Esto ha permitido identificar un gran número de nuevas alteraciones cromosómicas, lo que ha facilitado la búsqueda de nuevos genes implicados (40, 41). Su empleo en tumores sólidos está limitado por la necesidad de obtener metafases de calidad, aunque de todos los procedimientos expuestos es la

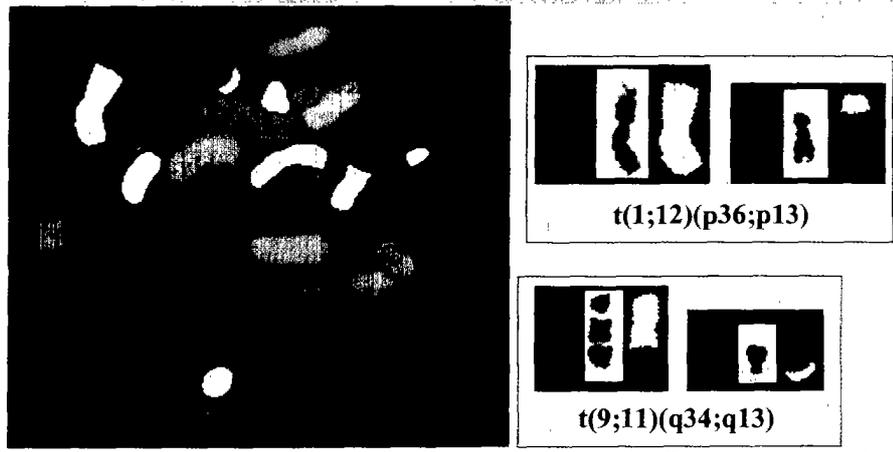


Figura 5. Análisis de SKY de un caso con síndrome mielodisplásico que presentó una $t(1;12)$ y $t(9;11)$.

única técnica que permite averiguar el origen de las múltiples alteraciones cromosómicas que habitualmente aparecen en los cariotipos de tumores sólidos. No obstante, las aplicaciones de esta técnica son crecientes (42, 43), y ya son cerca de 700 los casos de neoplasmas humanos analizados por SKY-FISH, de los cuales 410 son leucemias y linfomas y 146 tumores sólidos. La dirección <http://www.spectral-imaging.com> proporciona información técnica, un sumario de aplicaciones y una lista actualizada de publicaciones relevantes sobre el cariotipo espectral.

Las mejoras técnicas del cariotipo multicolor avanzan con gran rapidez, y ya se está optimizando el M-FISH con bandas multicolor (44).

Ventajas

- Igual que el cariotipo y la CGH, SKY-FISH y M-FISH son técnicas que permiten analizar todo el genoma.
- Debido a su enorme poder de resolución, estas técnicas son extraordinariamente útiles para determinar el origen de translocaciones complejas o crípticas que se escapan al análisis citogenético convencional con bandas G.
- Permiten la identificación de segmentos cromosómicos no identificados. Por ejemplo, marcadores como el 14q+ de linfomas o mieloma múltiple han podido ser identificados ahora como translocaciones y detectar qué cromosomas están implicados. Esto ha supuesto un gran avance en el conocimiento de los genes implicados en estas enfermedades (40, 41).

Inconvenientes

- Requieren cultivo de tejido fresco.
- Sólo analizan células en división (metafases).
- Necesitan personal experimentado tanto en la realización como en la interpretación de los resultados.
- La sensibilidad es similar a la del cariotipo, aunque la información es más concluyente.
- Permiten detectar alteraciones cromosómicas complejas, pero no detectan deleciones, inversiones o duplicaciones dentro de un cromosoma.
- Tienen un elevado coste económico.
- También requieren un equipo informático sofisticado, lo que hace que actualmente estas técnicas se utilicen, por el momento, en investigación.

FICTION

Otra de las técnicas de citogenética molecular, denominada FICTION (45) (*Fluorescence Immunophenotyping and Interphase Cytogenetics as a Tool for the Investigation of Neoplasms*), proporciona una nueva dimensión al análisis de FISH en núcleos interfásicos, ya que combina en un solo experimento el marcado inmunofenotípico fluorescente con la técnica de FISH. De esta forma, una determinada población celular tumoral puede ser seleccionada de acuerdo con un marcador inmunofenotípico, y se pueden estudiar alteraciones citogenéticas conocidas en relación al infiltrado de células normales.

Para la técnica de FICTION pueden utilizarse preparaciones de citocentrífuga, extensiones, improntas o cortes de criostato.

El fundamento técnico de este método es muy sencillo: primero se realiza la detección inmunofenotípica usando una cascada de tres anticuerpos secundarios marcados con un mismo fluorocromo para detectar la unión del anticuerpo primario. Seguidamente, se llevan a cabo dos fijaciones, una en metanol-ácido acético (3:1) y otra en paraformaldehído (1%) para que el marcado inmunofenotípico no se elimine con las condiciones agresoras de la hibridación. Después se realiza la técnica de FISH de manera convencional. La interpretación de los resultados se realiza con un microscopio de fluorescencia, seleccionando primero las células positivas y analizando las señales de hibridación que presentan en relación con las células negativas, cuyo patrón de señales debe ser normal (Fig. 6). Clásicamente, teniendo en cuenta los tres colores que pueden diferenciarse mediante un microscopio de fluorescencia convencional (azul, verde y rojo), tan sólo pueden analizarse un marcador inmunofenotípico y dos alteraciones genéticas, o viceversa. En las neoplasias hematológicas, donde los diferentes subtipos de leucemias y linfomas generalmente repre-

sentan distintos estadios de diferenciación "congelados" y hay marcadores inmunofenotípicos específicos para cada tipo celular, estos mismos marcadores son los que se utilizan para seleccionar las células tumorales. En cambio, en tumores sólidos la estrategia puede ser más limitada ya que es necesario disponer de marcadores tumorales fiables.

La principal aplicación de la técnica de FICTION es estudiar biopsias tumorales que tengan una baja concentración de células neoplásicas. Un ejemplo clásico es el linfoma de Hodgkin, en el cual el número de células malignas es muy bajo, lo que hace prácticamente imposible el análisis citogenético. Mediante FICTION estas células pueden ser seleccionadas utilizando anticuerpos anti-CD30, y sus alteraciones citogenéticas pueden estudiarse utilizando sondas específicas de FISH (46).

El futuro de la técnica de FICTION es esperanzador. El FICTION multicolor está siendo desarrollado en la actualidad para aumentar el número de sondas y anticuerpos aplicables en un solo experimento. También el FICTION en material incluido en parafina puede hacerse una realidad en un futuro próximo, abriendo las puertas a estudios retrospectivos que correlacionen el fenotipo y el genotipo de las células tumorales.

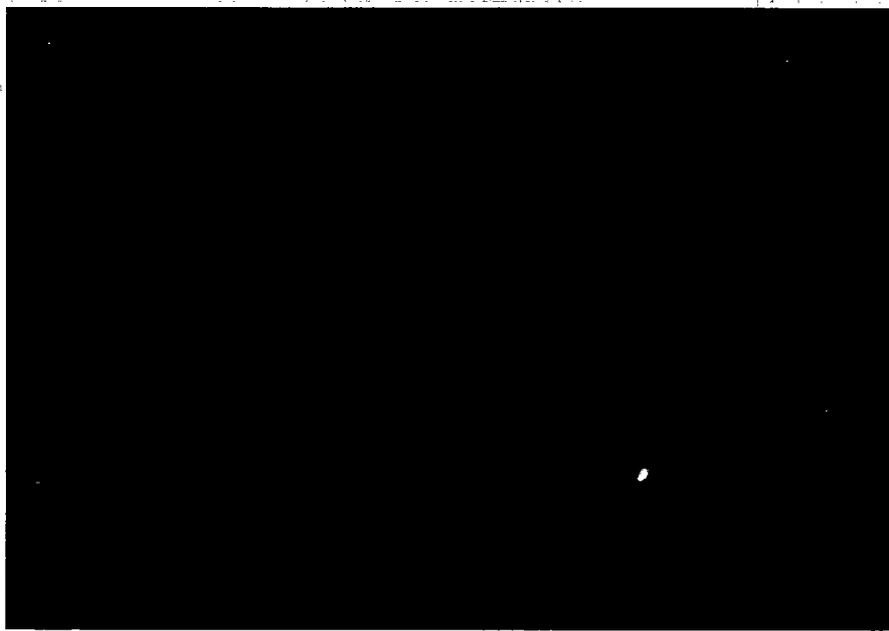


Figura 6. Experimento de FICTION tricolor en células de un paciente con linfoma de Hodgkin. El antígeno CD30 está marcado con un fluorocromo azul, el centrómero del cromosoma 2 en rojo y el gen *REL*, localizado en la banda cromosómica 2p13, en verde. La célula grande teñida de azul es una célula de Hodgkin CD30+, que contiene cuatro señales para el cromosoma 2 (tanto del centrómero como del gen *REL*), por lo tanto es una célula tetraploide. Las células pequeñas no teñidas de azul con dos señales rojas y dos verdes representan el infiltrado de células linfoides acompañante.

Tabla 5. Características de las técnicas de citogenética convencional y molecular.

	Cariotipo	FISH en interfase	CGH	SKY-FISH M-FISH	FICTION
Necesidad de cultivo	+	-	-	+	-
Método de <i>screening</i>	+	-	+	+	-
Analiza todo el genoma	+++	-	+	++	-
Material archivado	-	+	+	-	+
Detecta diferentes subclones	+	±	-	+	±
Detecta alteraciones desequilibradas	+	+	+	±	+
Detecta alteraciones equilibradas	++	+	-	+	+
Selecciona poblaciones celulares	-	-	-	-	+
Permite cuantificar la alteración	+	++	±	+	+++
Sensibilidad	+	++	±	±	+++
Precisión	±	++	±	+	++
Personal especializado	++	+	++	++	+
Tiempo de realización	++	±	+	++	+
Coste económico	-	+	++	+++	+

CONCLUSIONES

Vista la utilización, las ventajas y los inconvenientes de todos los análisis de citogenética molecular que pueden contribuir al diagnóstico y pronóstico del cáncer (Tabla 5), puede concluirse que actualmente las numerosas técnicas genéticas son complementarias y nunca excluyentes. Este hecho debe tenerse en cuenta para evitar redundancias y una utilización inadecuada de las mismas. Y en nuestra opinión, después de varios años de experiencia en el servicio de citogenética, consideramos muy importante que el resultado de cualquier análisis genético sea comentado entre el clínico y el genetista para evaluar el grado de concordancia clínico-genética. Sólo así, trabajando coordinados, poco a poco conocemos con más profundidad la significación clínica de las alteraciones genéticas del cáncer y los genes implicados. Todo ello contribuye al desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico más precisas y de nuevas terapias específicas, más eficaces y menos tóxicas para, en definitiva, mejorar la supervivencia de los pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

- Mitelman F. Catalog of chromosome aberrations in cancer. Wiley-Liss Inc., New York, NY, 1998.
- Rowley JD. *Cytogenetic analysis in leukemia and lymphoma: An introduction*. Semin Hematol 2000; 37(4): 315-319.
- Patel AS, Hawkins AL, Griffin CA. *Cytogenetics and cancer*. Curr Opin Oncol 2000; 12(1): 62-67.
- Lindblom A, Liljegren A. *Tumour markers in malignancies*. Br Med J 2000; 320(7232): 424-427.
- Nowell PC, Hungerford DA. *A minute chromosome in human granulocytic leukemia*. Science 1960; 132: 1497.
- Caspersson T, Zech L, Johansson C. *Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes*. Exp Cell Res 1970; 60: 315-319.
- Mitelman F, Mertens F, Johansson B. *A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia*. Nat Genet 1997; Spec No: 417-474.
- Grimwade D, Walker H, Oliver F y cols. *The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: Analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties*. Blood 1998; 92(7): 2322-2333.
- Roulston D, Le Beau MM. *Cytogenetic analysis of hematologic malignant diseases*. En: Barch M, Knutsen T, Spurbeck JL (Eds.). The AGT cytogenetics laboratory manual. 3ª ed. Lippincott-Raven, Philadelphia 1997; 325-350.
- Harris NL, Jaffe ES, Stein H y cols. *A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the International Lymphoma Study Group*. Blood 1994; 84(5): 1361-1392.
- Ong ST, Le Beau MM. *Chromosomal abnormalities and molecular genetics of non-Hodgkin's lymphoma*. Semin Oncol 1998; 25(4): 447-460.
- Thompson FH. *Cytogenetic methods and findings in human solid tumors*. En: Barch M, Knutsen T, Spurbeck JL (Eds.). The AGT cytogenetics laboratory manual. 3ª ed. Lippincott-Raven, Philadelphia 1997; 375-408.
- Mitelman F. *Recurrent chromosome aberrations in cancer*. Mutat Res 2000; 462(2-3): 247-253.
- Heim S, Mitelman F. *Cancer cytogenetics*. 2ª ed. Wiley-Liss Inc., New York 1995.
- Kirsch IR, Riedm T. *Integration of cytogenetic data with genome maps and available probes: Present status and future promise*. Semin Hematol 2000; 37(4): 420-428.
- Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM. *Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells*. Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79(24): 7824-7827.

17. Taub R, Kirsch I, Morton C y cols. *Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells*. Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79(24): 7837-7841.
18. Motokura T, Bloom T, Kim HG y cols. *A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene*. Nature 1991; 350(6318): 512-515.
19. Rosenberg CL, Wong E, Petty EM y cols. *PRAD1, a candidate BCL1 oncogene: Mapping and expression in centrocytic lymphoma*. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88(21): 9638-9642.
20. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce C.M. *Involvement of the BCL-2 gene in human follicular lymphoma*. Science 1985; 228(4706): 1440-1443.
21. Willis TG, Dyer MJ. *The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies*. Blood 2000; 96(3): 808-822.
22. Rowley JD. *The Philadelphia chromosome translocation. A paradigm for understanding leukemia*. Cancer 1990; 65(10): 2178-2184.
23. Rabbitts TH. *Chromosomal translocations in human cancer*. Nature 1994; 372(6502): 143-149.
24. Rabbitts TH. *The clinical significance of fusion oncogenes in cancer*. N Engl J Med 1998; 338(3): 192-194.
25. Rao PH, Houldsworth J, Dyomina K y cols. *Chromosomal and gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma*. Blood 1998; 92(1): 234-240.
26. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. *Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. Science 1987; 235(4785): 177-182.
27. Imamura J, Miyoshi I, Koeffler HP. *p53 in hematologic malignancies*. Blood 1994; 84(8): 2412-2421.
28. Langer PR, Waldrop AA, Ward DC. *Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes*. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78(11): 6633-6637.
29. Gozzetti A, Le Beau MM. *Fluorescence in situ hybridization: Uses and limitations*. Semin Hematol 2000; 37(4): 320-333.
30. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D y cols. *Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors*. Science 1992; 258(5083): 818-821.
31. Forozan F, Karhu R, Kononen J, Kallioniemi A, Kallioniemi OP. *Genome screening by comparative genomic hybridization*. Trends Genet 1997; 13(10): 405-409.
32. Knuutila S, Aalto Y, Autio K y cols. *DNA copy number losses in human neoplasms*. Am J Pathol 1999; 155(3): 683-694.
33. Knuutila S, Bjorkqvist AM, Autio K y cols. *DNA copy number amplifications in human neoplasms: Review of comparative genomic hybridization studies*. Am J Pathol 1998; 152(5): 1107-1123.
34. Zitzelsberger H, Lehmann L, Werner M, Bauchinger M. *Comparative genomic hybridisation for the analysis of chromosomal imbalances in solid tumours and haematological malignancies*. Histochem Cell Biol 1997; 108(4-5): 403-417.
35. Gebhart E, Liehr T. *Patterns of genomic imbalances in human solid tumors*. Int J Oncol 2000; 16(2): 383-399.
36. Lichter P, Joos S, Bentz M, Lampel S. *Comparative genomic hybridization: Uses and limitations*. Semin Hematol 2000; 37(4): 348-357.
37. Bentz M, Huck K, du Manoir S y cols. *Comparative genomic hybridization in chronic B-cell leukemias shows a high incidence of chromosomal gains and losses*. Blood 1995; 85(12): 3610-3618.
38. Schrock E, du Manoir S, Veldman T y cols. *Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes*. Science 1996; 273(5274): 494-497.
39. Speicher MR, Gwyn-Ballard S, Ward DC. *Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH*. Nat Genet 1996; 12(4): 368-375.
40. Rao PH, Cigudosa JC, Ning Y y cols. *Multicolor spectral karyotyping identifies new recurring breakpoints and translocations in multiple myeloma*. Blood 1998; 92(5): 1743-1748.
41. Sawyer JR, Lukacs JL, Munshi N y cols. *Identification of new non-random translocations in multiple myeloma with multicolor spectral karyotyping*. Blood 1998; 92(11): 4269-4278.
42. Schrock E, Padilla-Nash H. *Spectral karyotyping and multicolor fluorescence in situ hybridization reveal new tumor-specific chromosomal aberrations*. Semin Hematol 2000; 37(4): 334-347.
43. Veldman T, Vignon C, Schrock E, Rowley JD, Ried T. *Hidden chromosome abnormalities in haematological malignancies detected by multicolour spectral karyotyping*. Nat Genet 1997; 15(4): 406-410.
44. Muller S, Rocchi M, Ferguson-Smith MA, Wienberg J. *Toward a multicolor chromosome bar code for the entire human karyotype by fluorescence in situ hybridization*. Hum Genet 1997; 100(2): 271-278.
45. Weber-Matthiesen K, Winkemann M, Muller-Hermelink A, Schlegelberger B, Grote W. *Simultaneous fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics: A contribution to the characterization of tumor cells*. J Histochem Cytochem 1992; 40(2): 171-175.
46. Weber-Matthiesen K, Deerberg J, Poetsch M, Grote W, Schlegelberger B. *Numerical chromosome aberrations are present within the CD30+ Hodgkin and Reed-Sternberg cells in 100% of analyzed cases of Hodgkin's disease*. Blood 1995; 86(4): 1464-1468.

