Lectura Especial-Edumed
Enero 2004

Aspectos Tecnicos de Citogenetica Convencional y Molecular en Leucemias Agudas

Part 1 of 3

Susana C. Raimondi, PhD
www.cure4kids.org

1

Lectura Especial-Edumed
Enero 2004

Citogenetica

Susana C. Raimondi, PhD
Directora, Laboratorio de Cytogeneticas
Departimiento de Patologia

2

Citogenetica

- Es el estudio de la genetica de las celulas.
- Las celulas contienen cromosomas.
- Los cromosomas contienen el material genetico del individuo.
- Pacientes con cancer tienen alteraciones cromosomicas.
- El resultado del estudio de cromosomas se llama: cariotipo (karyotype) y es la representacion grafica de los cromosomas.

3

Cariotipo

- Se obtiene medula osea del paciente y se transporta al laboratorio.
- Los biologos procesan el material para obtener un cariotipo.
- En el cariotipo los cromosomas se aparean de acuerdo a su tamaño y morfologia.

4

Anormalidades Cromosomicas

- Todas los cambios identificados se expresan con numeros y simbolos.
- El sistema es internacional.
- An international System for Human Cytogenetics Nomenclature (ISCN95)

5

Tecnica Directa para Medula Osea

- Colectar el aspirado de medula osea en un tubo que contenga medio de transporte
  [medio de cultivo RPMI-1640, 20% FBS + preservative-free heparina]
- Agregar Colcemid 25 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar 900 rpm por 10 min. Descartar sobrenadante.
- Agregar solution hypotonica 25-30 min a temperatura ambiente. Centrifugar.

6

Tecnica Directa para Medula Osea

- Agregar fijador de Carnoy (metanol/acido acetico 3:1) 15 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 600 rpm. Descartar sobrenadante.
- Preparar los extendidos (slides)

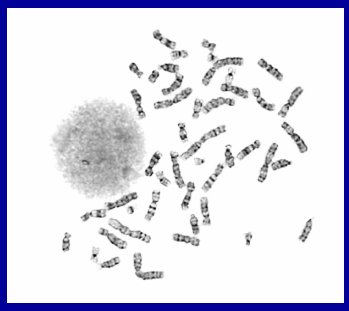
7

Como se Escribe un Karyotype?

- Evaluar **20** metafases en el microscopio
- Capturar imagenes de metafases normales y anormales con un sistema de cariotipo automatico o tomar fotos y cortar los cromosomas
- Informar el cariotipo final de acuerdo al ISCN95 (International System Human Cytogenetic Nomenclature)

8

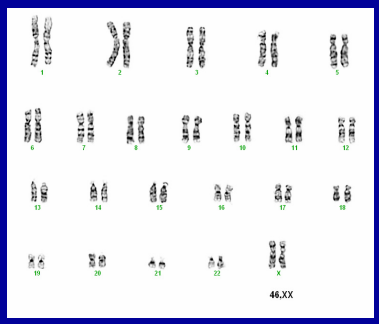
Metafase



Raimondi

9

Cariotipo Normal



Raimondi

10

Como Interpretar un Caso?

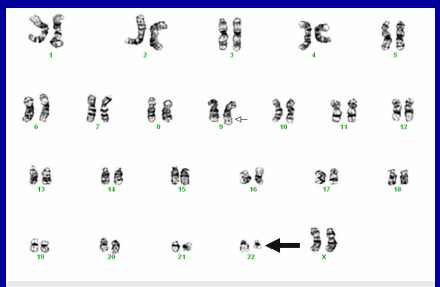
- Establecer el numero de metafases normales/abnormales
- Establecer el numero modal de cromosomas en celulas anormales

Anormalidades recurrentes=CLONE

*Minimo de 2 metafases con la misma alteracion cromosomica o ganancia del mismo cromosoma

*Minimo de 3 metafases con perdida del mismo cromosoma

11

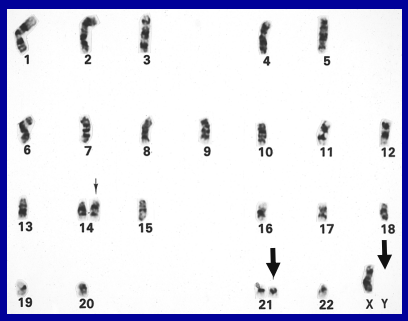


46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)

Raimondi

12

Haploidia Cercana (Near-Haploid)

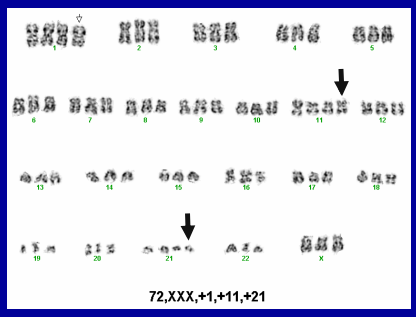


Raimondi

25,X,+14,+21

13

Triploidia Cercana (Near-Triploid)



Raimondi

14

Leucemia Linfoblastica Aguda Clasificacion Genetica

Pronostico Adverso

- t(9;22)(q34;q11.2) / *BCR-ABL*
- t(11q23;V) / *MLL* con rearreglo
- hipodiploide (<45 cromosomas)
- t(1;19)(q23;p13.3) / *PBX1-E2A*

*Si se trata agresivamente el paciente tiene buena sobrevida.

15

Leucemia Linfoblastica Aguda Clasificacion Genetica

Pronostico Favorable

- t(12;21)(p13;q22) / *TEL-AML1*
- hiperdiploide (51 – 67 cromosomas)

- Evaluacion de ploidia:
  - citogenetica (numero de cromosomas)
  - Citometria de flujo (indice de ADN = cantidad de ADN en blastos / cantidad de ADN en celulas normales)

16

Leucemia Mieloblastica Aguda Clasificacion Genetica

Pronostico Adverso

- Cariotipo complejo
  (>5 alteraciones cromosomicas)
- -7
- Alteraciones 3q
- Delecion 5q/-5

17

Leucemia Mieloblastica Aguda Clasificacion Genetica

Pronostico Favorable

- t(15;17)(q22;q12) / *PML-RARA*
- t(8;21)(q22;q22) / *ETO-AML1*
- inv(16)(p13.1q22) / *MYH11-CBFB*
- t(9;11)(p22;q23) / *AF9-MLL*

18

End of Part 1 of 3

Susana C. Raimondi, PhD Susana.Raimondi@stjude.org

More medical education materials are available at:

www.cure4kids.org

Lectura Especial-Edumed
Enero 2004

Aspectos Tecnicos de Citogenetica Convencional y Molecular en Leucemias Agudas

Part 2 of 3

Susana C. Raimondi, PhD

www.cure4kids.org

Lectura Especial-Edumed
Enero 2004

Fluorescence *in situ* Hybridization

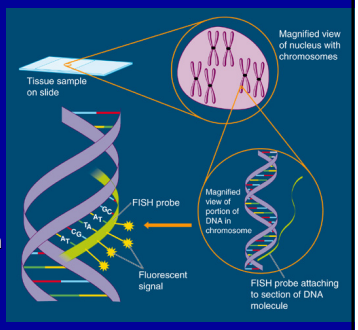
FISH

Susana C. Raimondi, PhD
Director, Cytogenetics Laboratory
Pathology Department

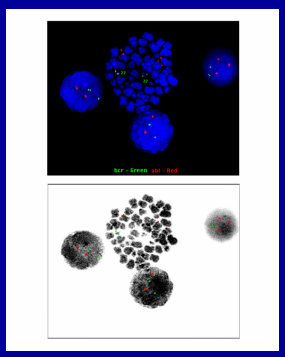
FISH System

(Fluorescence in situ Hybridization)

- Provides simultaneous assessment of multiple chromosomal and gene abnormalities in a single cell

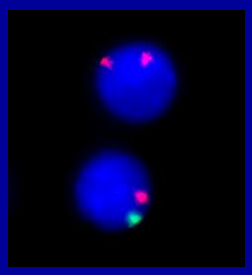


FISH Metafase con Nucleos en Interfase



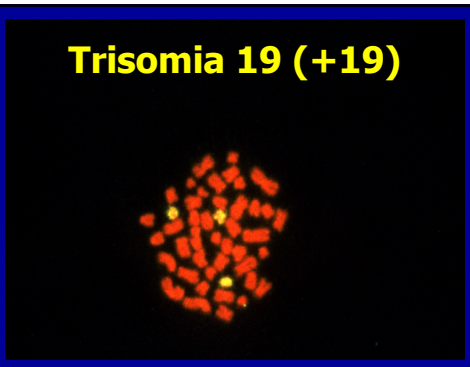
Raimondi

Post Transplante de Medula Osea
Detecion de Nucleos en Interfase:
XX (Femenino) XY (Masculino)



Raimondi

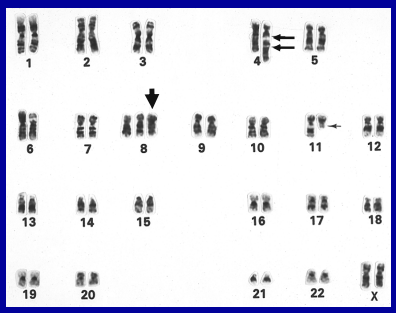
Trisomia 19 (+19)



Raimondi

25

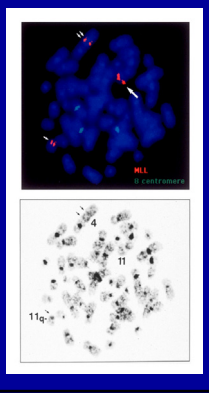
T(4;11) Insercion Compleja



Raimondi

26

Probe de Secuencia Unica (Unique Sequence Probe)



Raimondi

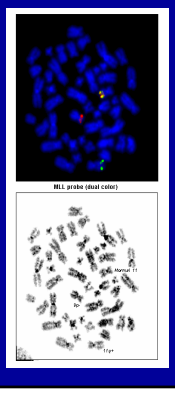
27

FISH Patterns / Translocations

- 2-Color Break-Apart Probe (BAP)
- 2-Color Simple-Fusion pattern (SF)
- 2-Color Extra Signal pattern (ES)
- 2-Color Double-Fusion pattern (DF)

28

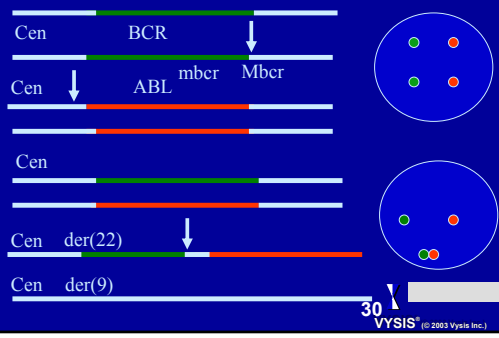
Dual Color -Break Apart Probe (BAP)



Raimondi

29

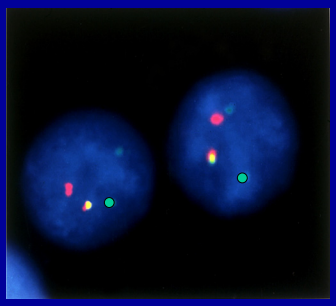
Simple 2-Color Fusion - BCR/ABL Probe



30

VYSIS® (© 2003 Vysis Inc.)

Color Dual –Fusion Unica (Dual Color -Single Fusion)

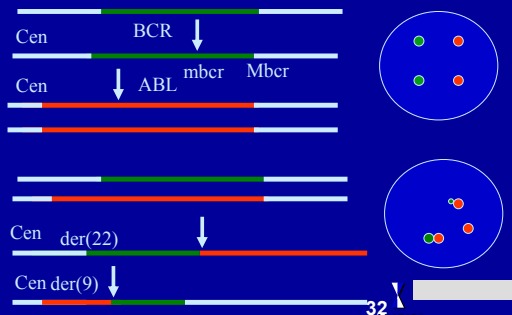


Raimondi

t(9;22)(q34;q11.2) BCR – ABL (yellow)
BCR (green) – ABL (red)

31

Double Fusion Pattern BCR/ABL ES Probe



32

VYSIS® (© 2003 Vysis Inc.)

End of Part 2 of 3

Susana C. Raimondi, PhD Susana.Raimondi@stjude.org

More medical education materials are available at:

www.cure4kids.org

St. Jude Children's Research Hospital

Lectura Especial-Edumed
Enero 2004

Aspectos Tecnicos de Citogenetica Convencional y Molecular en Leucemias Agudas

Part 3 of 3

Susana C. Raimondi, PhD
www.cure4kids.org

34

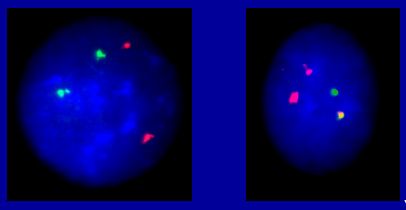
Lectura Especial-Edumed
Enero 2004

FISH System Overview

Susana C. Raimondi, PhD
Director, Cytogenetics Laboratory
Pathology Department

35

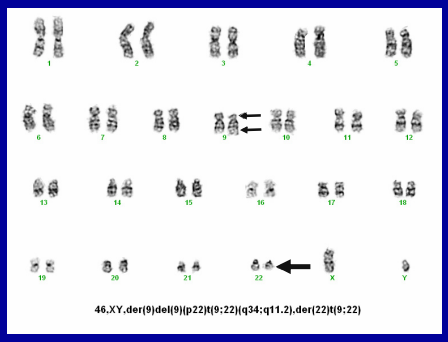
FISH System Overview:
Translocation Gene Fusion in Leukemia



LSI bcr/abl *ES* hybridized to cultured blood lymphocytes

VYSIS® (© 2003 Vysis Inc.)

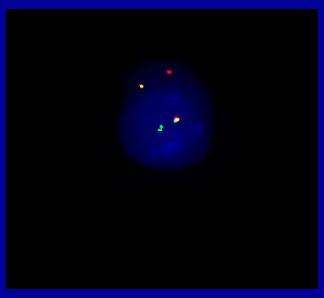
36



Raimondi

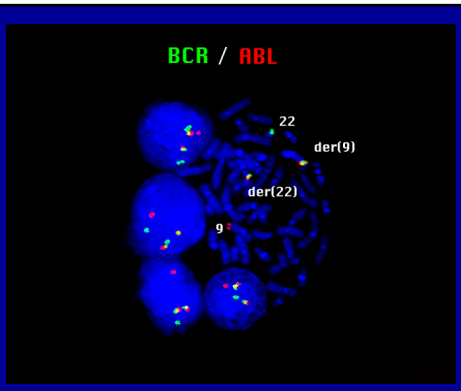
37

Color Dual -Fusion Doble (Dual Color –Double Fusion



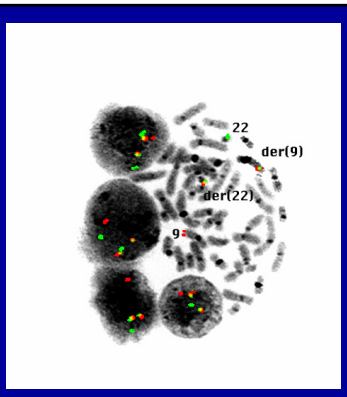
Raimondi

38



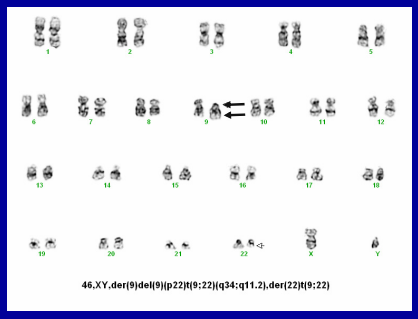
Raimondi

39



Raimondi

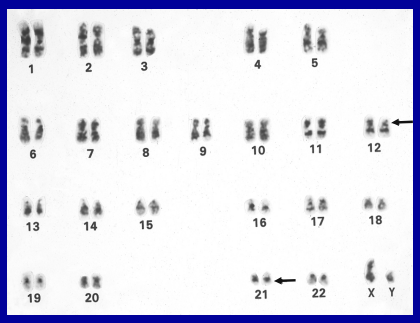
40



Raimondi

41

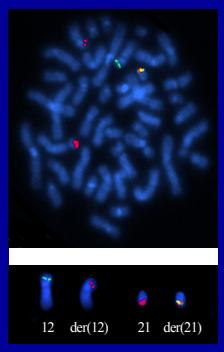
t(12;21)(p13;q22)



Raimondi

42

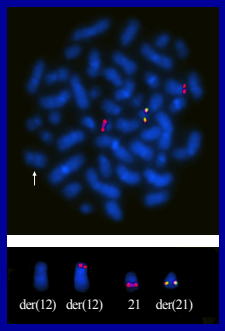
T(12;21) TEL-AML1 Single Fusion ES



Raimondi

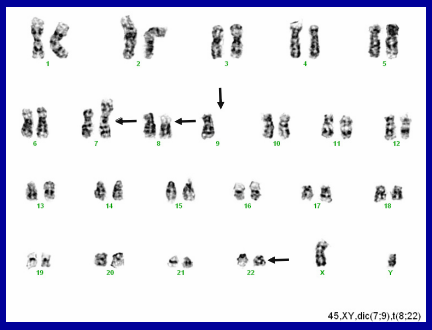
43

T(12;21) TEL-AML1 Single Fusion ES [TEL Deleted]



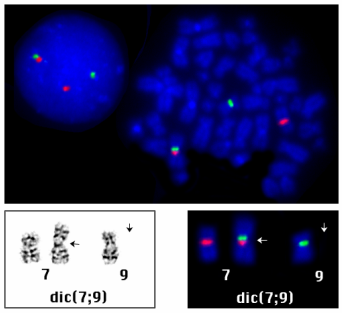
Raimondi

44



Raimondi

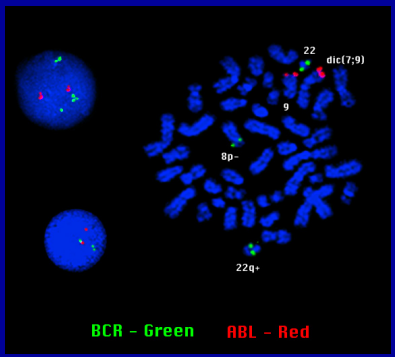
45



Centromeric Probes

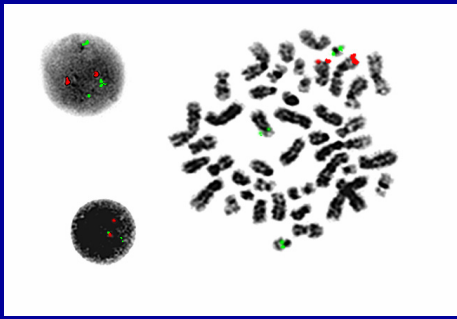
Raimondi

46



Raimondi

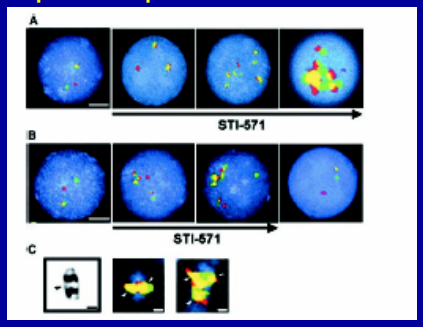
47



Raimondi

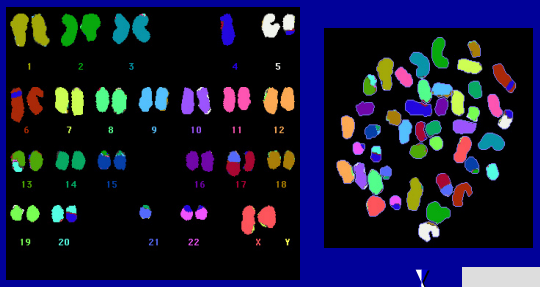
48

Amplificacion de *BCR-ABL* en Pacientes con Recaida Despues de Responder Inicialmente a STI-571



Science (293) 2001 Clinical Resistance to STI-571

MDS Specimen
44,XX,-4,del(5)(q13q33),add(6)(p23),add(13)(q34), add(17)(p11.2),add(20)(p13),-21[20]

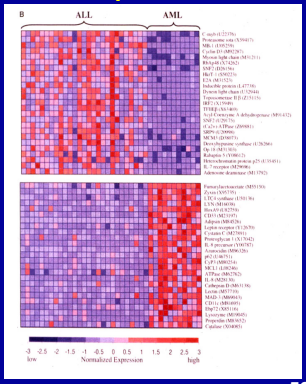


VYSIS® (© 2003 Vysis Inc.)

Investigaciones Actuales, Nuevos Aspectos y Perspectivas

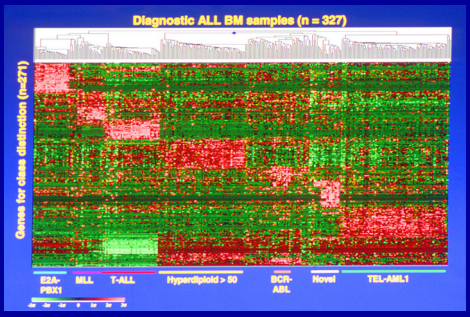
- El año pasado se finalizo el proyecto de secuenciar el genoma humano (ADN) lo cual esta facilitando el conocimiento de la base molecular de distintas enfermedades.
- En cancer, esta ayudando a clasificar los distintos tipos de tumores a nivel submicroscopico.
- Dos metodos son los mas utilizados.
  - Uno es la determinacion directa del ADN (material genetico)
  - Otro consiste en el estudio de los productos celulares (RNA y proteinas).

Gene Expression Profile



Golub et al Science 286, 531, 1999

MCA: Genomic Subsets



Yeok et al. Cancer Cell1: 133-143, 2002

Microchip Array

- Esta tecnologia se llama “microchip array” y provee una diseccion global de los cambios en la expression de los genes que ocurren en celulas malignas.
- El uso combinado de estas tecnologias va ha facilitar nuestro entendimiento de las complejidades geneticas inherentes al cancer.
- Se anticipa que “microchip arrays” tendra impacto a nivel individual, ayudando a identificar pacientes que responden o no al tratamiento y que necesiten distintos tipos de terapia para tratar enfermedades que presentan con rasgos similares.

Acknowledgment

T. O'Neill
E. Entrekin
P. Dalton
P. Mardis
A. Correa
VYSIS teaching slides

55

End of Part 3 of 3

Susana C. Raimondi, PhD **Susana.Raimondi@stjude.org**

More medical education materials are available at:

www.cure4kids.org

56