



**UDS**  
UNIVERSIDAD DEL SURESTE



**NOMBRE DE ESTUDIANTE:**

**Adly Candy Vázquez Hernández**

**DOCENTE:**

**Dr. Jose Miguel Culebro Ricaldi**

**MATERIA:**

**Biología Molecular**

**TEMA:**

**“Ensayo Patología Molecular ”**

**CARRERA:**

**Medicina Humana**

**SEMESTRE:**

**4°**

**Tuxtla Gutiérrez, Chiapas**

**07/06/2020**

## **PATOLOGÍA MOLECULAR**

El desarrollo reciente de técnicas de biología molecular y la expansión acelerada del conocimiento de las bases genéticas y moleculares de las enfermedades humanas, han tenido un impacto significativo en Anatomía Patológica. Aunque no es fácil resumir ni sistematizar este impacto, es posible visualizar en Anatomía Patológica dos áreas propias de la especialidad que han experimentado un gran desarrollo debido a la incorporación de principios y técnicas relacionados con la biología molecular, éstas son el conocimiento de la patogenia de enfermedades humanas y el diagnóstico en patología.

En la medida que los patólogos han participado en el estudio de las bases genéticas y moleculares de las enfermedades humanas se ha producido no sólo una mejor comprensión de muchos de estos fenómenos, sino que, además, ha permitido el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas en Anatomía Patológica y la creación de una sub-especialidad en esta disciplina, la Patología Molecular. La Patología Molecular es una subespecialidad incipiente en Anatomía Patológica que se define por las técnicas que se utilizan en ella y por los elementos que se analizan, básicamente ácidos ribonucleico (ARN) y desoxirribonucleico (ADN), a partir de muestras de tejidos (especímenes de biopsias o autopsias) o células (exámenes citológicos).

## **ESPECÍMENES Y TÉCNICAS USADAS EN PATOLOGÍA MOLECULAR**

Las pautas del manejo de los especímenes y las técnicas de biología molecular que se utilizan en Patología Molecular han sido desarrolladas en laboratorios de investigación. Estas han sido adaptadas a las muestras propias del trabajo anátomo-patológico, es decir a muestras de tejidos y citológicas, ya sean especímenes frescos sin ningún tipo de fijación, o muestras preservadas en diversos fijadores y bajo diversas condiciones.

El ADN en su forma pura es estable a temperatura ambiente por años. Sin embargo, las endonucleasas presentes en las células pueden degradar el ADN en fragmentos pequeños, interfiriendo con los resultados de su examen. Aunque el ARN también es estable en forma pura, se degrada muy fácilmente en presencia de la enzima ribonucleasa, que se encuentra en altas cantidades en algunos tejidos e incluso está presente en el medio ambiente. La fijación con alcohol de las muestras citológicas es óptima para la preservación de ADN y de ellas es posible extraer ARN.

La fijación en formalina, el fijador de uso rutinario en muestras de tejidos en Anatomía Patológica, produce degradación y fragmentación del ADN y ARN de tal manera que sólo es posible amplificar mediante PCR fragmentos cortos (<250 pares de bases nitrogenadas) de cada uno de ellos. Sin embargo, la preservación óptima de los tejidos para procedimientos de biología molecular es su congelación inmediata después de obtenidos y la preservación a lo menos a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Por ello, es aconsejable establecer en los laboratorios de Anatomía Patológica bancos de tejidos, especialmente de tumores y los correspondientes tejidos normales, de tal manera que este material se encuentre disponible para los estudios que requieran de análisis moleculares.

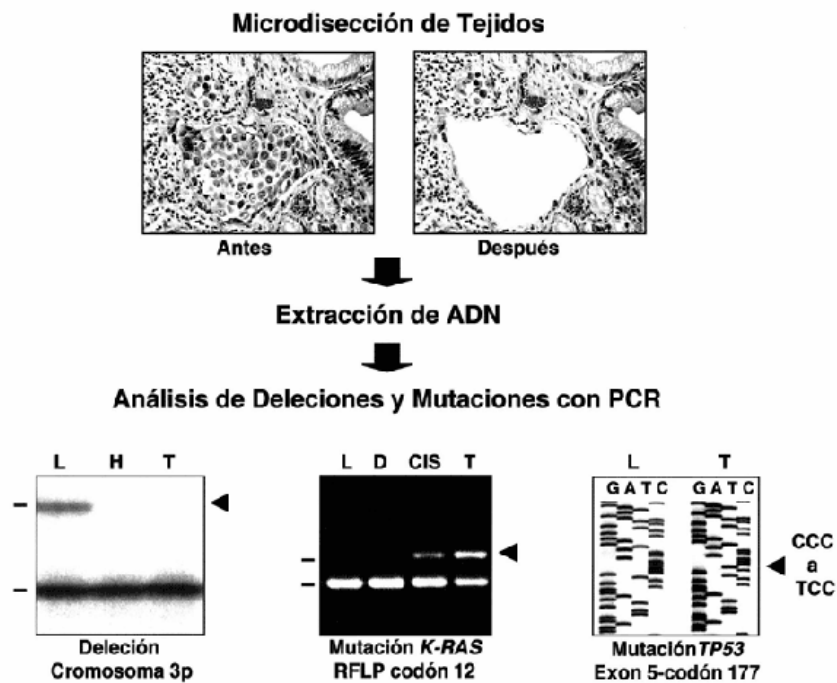
Las técnicas propias del trabajo en Patología Molecular son todas aquellas que forman parte del arsenal de la biología molecular como lo que se muestra en la tabla:

**Tabla 1. Técnicas de biología molecular usadas en Patología Molecular**

Técnica	Información Obtenida	Ventajas y Desventajas	Ejemplos de Exámenes Clínicos
"Southern Blot"	Presencia, tamaño y estructura de un gen	Relativamente lento y trabajoso; útil para información de tamaño y estructura; semicuantitativo	Monoclonalidad de linfocitos T o B; análisis de translocaciones de sarcomas y linfomas
"Slot", "dot" o "spot blot"	Presencia y cantidad de un gen o fragmento de transcripción	Rápido y más cuantitativo que "Southern" o "Northern blots"; sin información de tamaño o estructura	Amplificación de <i>N-MYC</i> en neuroblastomas
Amplificación de ácidos nucleicos (PCR, PCR-TR)	Presencia de un gen o ARNm; puede ser combinado con gel de electroforesis "Southern blot"	Muy rápido y sensible; requiere conocimiento previo del gen o el fragmento de transcripción; puede ser cuantitativo	Detección de translocaciones y otras mutaciones; agentes infecciosos
Electroforesis en gel	Visualizar directamente ADN o cADN amplificado	Evita la complejidad de la hibridación, aunque por esta razón puede ser menos específico	Evaluación de fragmentos amplificados de un gen
Hibridación <i>in situ</i>	Presencia de un gen o fragmento de transcripción en un tejido, células aisladas o cariotipos	Las preservación de las características histopatológicas y citológicas permite correlacionar los resultados con los tipos específicos de células	Análisis de translocaciones cromosomales; detección de ADN o ARNm de agentes infecciosos
Secuenciación	Secuencia de un gen o fragmento de transcripción (cADN)	Obtención de la mejor resolución posible de un gen o fragmento de transcripción; actualmente cara y trabajosa	Análisis de mutación de genes (ej. <i>BRCA1/BRCA2</i> , <i>TP53</i> , etc)
"Western blot"	Presencia y tamaño de proteínas	Análisis del producto final del gen más que del propio gen; relativamente trabajoso	Examen de distrofia muscular de Duchenne
Análisis de proteína truncada	Término precoz de transcripción o síntesis de proteínas	Técnicamente costosa y trabajosa	Mutaciones en genes tales como <i>BRCA1</i> , <i>APC</i> , etc

Entre otras técnicas, los métodos de aislamiento de células o tejidos utilizando procedimientos de microdissección han sido de gran importancia en el desarrollo de la Patología Molecular, incentivando significativamente la participación de los anatómo-patólogos en las investigaciones de alteraciones moleculares y genéticas de los tejidos normales y anormales, y estimulando su capacitación en técnicas más propias de la biología molecular.

La microdissección de tejidos es una técnica que permite establecer una correlación exacta entre las características citológicas e histopatológicas de los especímenes y los resultados de los análisis genéticos y moleculares. Mediante ella es posible aislar poblaciones celulares específicas desde un conjunto heterogéneo de células mediante la visualización directa al microscopio.



Las técnicas de microdissección disponibles se basan en la manipulación directa o a través de aparatos de micromanipulación o de un sistema semi-automatizado basado en energía láser infrarroja ("*laser capture microdissection, LCM*"). Las células microdissecadas han sido utilizadas exitosamente en el estudio de alteraciones genéticas y moleculares del cáncer mediante análisis de ADN, estudio de expresión de genes en diversos tejidos mediante examen de ARN y más recientemente en estudios de proteínas. La aplicación de técnicas de microdissección ha cumplido, además, un papel relevante en la identificación de nuevos genes supresores de tumores y de múltiples regiones cromosomales con deleciones frecuentes en diversas neoplasias y sus lesiones precursoras, las que son candidatas a contener genes supresores de tumores aún no identificados. Además, la microdissección ha permitido la detección de nuevos genes importantes en el desarrollo de neoplasias a través de la detección de nuevos fragmentos de transcripción (ARN mensajero) y de proteínas alteradas en células tumorales.

### **IMPACTO DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL DIAGNÓSTICO EN ANATOMÍA PATOLÓGICA**

Los exámenes de diagnóstico molecular disponibles actualmente en Patología Molecular han sido desarrollados inicialmente privilegiando la sensibilidad y la especificidad, con la esperanza que la incorporación en el futuro de técnicas automatizadas permita disminuir su costo y tiempo de ejecución. El número de exámenes de diagnóstico que emplean técnicas y principios de biología molecular ha ido aumentando en los últimos años. Aunque existen diversos productos comercialmente disponibles, sólo unos pocos han completado el proceso de aprobación de la Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos (*Food and Drug Administration, FDA*). Por lo tanto, los propios laboratorios deben desarrollar y validar la mayoría de los exámenes de diagnóstico molecular con utilidad clínica.

En cada análisis de diagnóstico molecular existen varias técnicas de biología molecular disponibles. La elección de la técnica más apropiada para un determinado examen de diagnóstico debe ser muy cuidadosa y basarse en el conocimiento acabado de las ventajas y desventajas de cada técnica, en el equipamiento del laboratorio y en la experiencia de sus integrantes. En la [Tabla 1](#) se ilustran los métodos más importantes de biología molecular aplicados a Patología Molecular, y se indican las ventajas y desventajas de las técnicas de uso más frecuente. En la actualidad, los exámenes de diagnóstico molecular disponibles en Patología Molecular están referidos principalmente a la detección de microorganismos, al diagnóstico de enfermedades hereditarias y al diagnóstico auxiliar de neoplasias, especialmente en lo referente a estudios de predisposición genética, estudio de población de riesgo, diagnóstico de determinados cánceres, estudio de micrometástasis, selección de terapias y evaluación del pronóstico de la enfermedad.

#### I. *Patología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas.*

El diagnóstico utilizando métodos de biología molecular ha tenido un gran impacto en el diagnóstico y manejo de las enfermedades infecciosas. Estos métodos han sido desarrollados con el objeto de mejorar la sensibilidad y especificidad de los métodos tradicionales de diagnóstico microbiológico, como asimismo acelerar el diagnóstico en casos de microorganismos de difícil cultivo o lento crecimiento. Este desarrollo se ha extendido al diagnóstico en Patología Molecular, en la cual se han implementado técnicas de diagnóstico de virus, bacterias, hongos y protozoos en muestras de tejidos y células aisladas. Estas técnicas están referidas fundamentalmente a métodos de hibridación *in situ* y amplificación por PCR de los ácidos nucleicos.

Varios tipos virus pueden ser detectados en muestras de tejidos y células aisladas mediante la utilización de técnicas de biología molecular, tales como hibridación *in situ* de ARN y ADN, y amplificación por PCR. La lista de agentes virales que han sido detectados mediante estas técnicas en especímenes de tejidos y que tendrían importancia clínica incluye a adenovirus, citomegalovirus, Epstein-Barr, hepatitis B y C, y subtipos de virus papiloma humano (VPH).

Los métodos de biología molecular han demostrado gran utilidad en microbiología tanto en la detección de bacterias directamente en muestras clínicas, como en la confirmación de los cultivos que de ellas se obtienen. Mientras muchas de estas determinaciones se realizan en muestras tan diversas como expectoración, lavado broncoalveolar, líquido céfalo-raquídeo, orina, aspirado faríngeo, líquido articular y peritoneal, etc, sólo un número limitado de estas determinaciones tiene utilidad práctica en muestras de tejidos en la actualidad. Una de las determinaciones de bacterias más difundidas en Patología Molecular es la determinación de micobacteris en tejidos, especialmente *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium aviu*.

La detección de micobacterias al microscopio en los tejidos se caracteriza por una muy baja sensibilidad y se requiere de una gran cantidad de bacilos (a lo menos  $10^4$  micobacterias/mL). El diagnóstico de infección de micobacterias con técnicas de biología molecular, especialmente mediante amplificación por PCR de sus secuencias de ADN, se considera un método de gran utilidad en el diagnóstico de infecciones por estas bacterias, debido a su rapidez, alta sensibilidad y gran especificidad.

## II. *Patología molecular en el diagnóstico de enfermedades hereditarias.*

Las técnicas de biología molecular han sido empleadas en forma creciente en el diagnóstico de múltiples enfermedades humanas. La información actualizada de las enfermedades que pueden ser detectadas mediante técnicas moleculares.

El análisis de la secuencia del genoma humano sin duda incrementará la lista de enfermedades en las cuales se identifiquen las alteraciones genéticas responsables y los exámenes que permitan su detección. Aunque casi la totalidad de estos exámenes se realizan en muestras de sangre de los individuos afectados o con sospecha de poseer la enfermedad y aún no corresponden estrictamente al campo de la Patología Molecular, sin duda en el futuro éstos también se aplicarán a muestras de tejidos o células aisladas de los mismos.



### *III. Patología molecular en el diagnóstico de neoplasias.*

Este campo es sin duda una de las áreas de la Patología Molecular que ha experimentado el desarrollo más acelerado en los últimos años, ayudando además en forma significativa a la incorporación de los anátomo-patólogos al estudio y aplicación de los principios y las técnicas de biología molecular. Revisaremos brevemente el estado actual de sus aspectos más importantes.

#### *Determinación de predisposición genética para el desarrollo de neoplasias.*

Los avances recientes en el descubrimiento de los genes que tienen un papel importante en el desarrollo de las neoplasias humanas están revolucionando el campo de la práctica clínica del estudio de riesgo de desarrollo de cáncer. Los exámenes del material genético, junto a la historia familiar de cáncer de los individuos, se están utilizando progresivamente como un método de diagnóstico de los síndromes hereditarios relacionados al desarrollo de cáncer en individuos portadores de neoplasias, como asimismo en la estimación de la susceptibilidad al desarrollo de un cáncer en individuos sin neoplasias pero que pertenecen a familias con alto riesgo.

En la actualidad hay un grupo limitado de exámenes de determinados genes que se consideran como parte del diagnóstico de rutina de familias con síndromes de cáncer hereditarios, tales como el gen *APC* en la poliposis coli adenomatosa, gen *RET* en neoplasia endocrina múltiple tipo 2a, gen *RBI* en retinoblastoma familiar, gen *VHL* en síndrome de von-Hippel-Lindau, genes encargados de la reparación del ADN (*hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1* y *hPMS2*) en el síndrome de Lynch o cáncer de colon no-poliposo hereditario (HNPCC), gen *TP53* en síndrome de Li-Fraumeni, gen *MEN-1* en neoplasia endocrina múltiple tipo 1, y genes *BRCA1* y *BRCA2* en el síndrome de cáncer hereditario de ovario y mama.

Mientras que la mayoría de las mutaciones de los genes responsables de los síndromes hereditarios de cáncer son analizadas en ADN extraído de leucocitos sanguíneos, el ADN obtenido de tejidos frescos o de archivos (fijados en formalina e incluidos en parafina) también puede ser utilizado, especialmente en casos en que muestra de sangre o tejido no

pueda ser obtenida. El análisis específico del tejido tumoral también puede proveer de información para el diagnóstico de condiciones que confieran susceptibilidad heredada al desarrollo de neoplasias.

### *Detección precoz de cáncer con métodos moleculares.*

Se considera que la mayoría de las neoplasias humanas serían precedidas por lesiones precursoras, las que presentarían características morfológicas, histopatológicas y genéticas definidas. Sin embargo, estas lesiones preneoplásicas y su secuencia han sido determinadas con certeza sólo en algunas neoplasias humanas, especialmente en aquellas de origen epitelial (carcinomas).

La aplicación de principios y técnicas de biología molecular al diagnóstico precoz del cáncer está actualmente sólo en el plano de la investigación científica. Debido a que la identificación de las neoplasias incipientes y sus lesiones precursoras corresponden al ámbito de la Anatomía Patológica, el papel de los anatómo-patólogos es fundamental en la caracterización de las alteraciones moleculares de estas lesiones, como asimismo en el diseño de estrategias de detección precoz de cáncer que las utilicen. A pesar de que la investigación en esta área del conocimiento ha sido intensa en la última década, en la actualidad existen más interrogantes que respuestas. ¿De qué manera la biología molecular producirá un impacto en la detección precoz del cáncer? ¿Pueden las características genéticas de las células tumorales o precursoras de cáncer ser utilizadas como marcadores de diagnóstico precoz de cáncer? ¿Cuál es la sensibilidad y especificidad de estos marcadores para el estudio de población de riesgo de contraer una neoplasia? Aunque aún no existen respuestas definitivas a estas interrogantes, revisaremos muy brevemente los avances fundamentales en este campo con especial referencia a su impacto en Anatomía Patológica.

Se ha determinado que las lesiones precursoras presentan alteraciones genéticas de similares características, pero en menor cuantía, que los tumores que originan. Así en los

carcinomas pulmonares y orofaríngeos se ha observado que las lesiones displásicas presentan deleciones cromosomales (principalmente cromosomas 3p, 9p y 8p) que afectarían a los mismos genes supresores de tumores que los correspondientes tumores invasores, pero en menor extensión.

El conocimiento de las alteraciones genéticas presentes en lesiones precursoras asociadas a carcinomas infiltrantes se ha extendido al análisis del mismo tipo de lesiones precursoras presentes en individuos sin cáncer, pero con riesgo de adquirir la enfermedad. Así por ejemplo, se han detectado frecuentes deleciones cromosomales de las mismas características que las detectadas en los tumores infiltrantes en hiperplasias ductales atípicas de mama en mujeres sin cáncer. Estos y otros hallazgos han confirmado el principio de la existencia de las lesiones precursoras de las neoplasias, especialmente de origen epitelial (carcinomas), y ha permitido postular la utilidad de las alteraciones moleculares como marcadores biológicos que permitan ayudar a predecir el riesgo de desarrollo de neoplasias humanas, especialmente en población de riesgo, ya sea por susceptibilidad genética o por la adopción de conductas de riesgo.

Este tipo de estudios han sido aplicados también a otros especímenes de tipo clínico como: muestra citológica obtenida por punción de aguja fina en cáncer de mama; lavado bronquioloalveolar y esputo en cáncer de pulmón; Papanicolaou en cáncer de cuello uterino; jugo pancreático en cáncer de páncreas; deposiciones en cáncer de colon; orina en cáncer de la vejiga; y, sangre en cánceres de pulmón, mama, hígado, etc.

#### *Diagnóstico de tipos específicos de neoplasias.*

En la última década, la utilización de técnicas de biología molecular en el diagnóstico de neoplasias humanas ha experimentado un gran desarrollo. En la actualidad, dos tipos de análisis forman parte del arsenal diagnóstico de Patología Molecular, éstos son el estudio de traslocación de cromosomas en el diagnóstico de sarcomas y neoplasias hematológicas, y los estudios de clonalidad en el diagnóstico de linfomas.

a) Traslocación de cromosomas en sarcomas y neoplasias hematológicas:

Ciertos sarcomas se caracterizan por traslocaciones cromosomales específicas y recurrentes. Estas traslocaciones producen nuevos genes, denominados genes de fusión, algunos de los cuales por su especificidad y alta frecuencia en determinados sarcomas han llegado a definir y reclasificar a algunos de estos tumores.

Los datos obtenidos indican que los genes de fusión producidos por las traslocaciones cromosomales serían eventos iniciadores y tal vez, al menos en algunos sarcomas, el único evento molecular necesario para su desarrollo. La presencia de los genes de fusión puede ser estudiada mediante amplificación por PCR, mientras que la presencia de las traslocaciones por técnicas de hibridación de ADN. Aunque los especímenes óptimos son las muestras de tejidos frescos congelados, las técnicas de PCR han sido aplicadas con éxito a ARN extraído de tejido sometido a procesamiento de rutina en laboratorios de Anatomía Patológica mediante fijación en formalina.

b) Análisis de clonalidad en proliferaciones linfoides:

Una de las aplicaciones de los principios y técnicas de biología molecular en el diagnóstico de neoplasias la constituye el estudio de clonalidad de las poblaciones linfoides en el diagnóstico diferencial de linfomas (monoclonales) y proliferaciones linfoides reactivas (habitualmente policlonales).

Se conoce que los genes de las inmunoglobulinas y de los receptores T experimentan un proceso fisiológico de reordenación en la medida que las células linfoides B y T se diferencian de formas inmaduras a linfocitos maduros. Este proceso de reordenación génica afecta a los genes de las cadenas pesadas y livianas de las inmunoglobulinas y a las cuatro cadenas (a, b, d, g) de los genes receptores T. Debido a que las neoplasias son el producto de la proliferación monoclonal de una célula neoplásica progenitora, cualquier característica genética propia de dicha célula se reflejará en todas las células neoplásicas de dicho tumor. Las células linfoides policlonales se caracterizan por una población heterogénea de células con

igualmente reordenaciones heterogéneas de los genes de receptores de antígenos, mientras que las células linfoides de proliferaciones monoclonales, que habitualmente equivalen a linfomas, se caracterizan por homogeneidad monoclonal en el reordenamiento de dichos genes. Se han desarrollado técnicas de PCR en este tipo de estudios de clonalidad de las poblaciones linfoides, incluso en material de biopsias de archivo, con y sin microdissección de tejidos.

c) Distinción de doble tumor primario o metástasis:

Aunque poco difundido, el empleo de principios y técnica de biología molecular puede aplicarse al diagnóstico diferencial entre la presencia de tumores primarios múltiples (sincrónicos o metacrónicos) y de metástasis en casos seleccionados en los cuales las técnicas convencionales de Anatomía Patológica no permiten hacer esta distinción. En estos casos ciertas anomalías genéticas (mutaciones puntuales de oncogenes, deleciones cromosomales o fenómeno de inestabilidad genética) pueden ser utilizadas en este diagnóstico diferencial.

d) Estudio de metástasis:

La determinación de la presencia de metástasis en una neoplasia es fundamental en la etapificación clínico-patológica de los casos, tanto para definir la conducta terapéutica como para conocer el pronóstico de la enfermedad.

e) Selección de terapias:

El desarrollo de terapias génicas basadas en el conocimiento de las anomalías genéticas más importantes de una neoplasia aún se encuentran en el ámbito de la investigación y experimentación científica básica y clínica. Sin embargo, la adopción de terapias anti-tumorales más convencionales, basadas en el conocimiento de las anomalías genéticas más relevantes de una neoplasia, se está constituyendo en una realidad.

f) Determinación del pronóstico:

Aunque existen muchos estudios publicados en los que se ha encontrado una correlación positiva entre la presencia de determinadas alteraciones genéticas y el pronóstico de ciertas neoplasias, el resultado de muchos de estos estudios es controvertido. La variabilidad de las técnicas y métodos de detección de las alteraciones genéticas y de las series clínicas estudiadas explicarían en parte estas discordancias. El progreso en el conocimiento de las alteraciones genéticas asociadas a la progresión tumoral, especialmente la invasión de tejidos y el desarrollo de metástasis, sumado al desarrollo de técnicas de detección de alteraciones genéticas más estandarizadas con grados crecientes de automatización, la mejor definición de las series clínicas estudiadas y mayor uniformidad en el tratamiento anti-neoplásico, permitirán establecer con mayor exactitud el valor pronóstico de las alteraciones genéticas en las neoplasias.

## **CONCLUSIÓN**

El desarrollo de las técnicas de biología molecular y la expansión acelerada del conocimiento de las bases genéticas y moleculares de las enfermedades humanas han tenido un impacto significativo en Anatomía Patológica. Este desarrollo, que debe acompañarse de la capacitación de los anátomo-patólogos en los principios y técnicas de la biología molecular, debiera incidir significativamente en el desarrollo del diagnóstico anátomo-patológico y en el incremento de la investigación científica en nuestra especialidad.