

Universidad del Sureste

Licenciatura en Medicina Humana

Materia:

Genética Humana

Trabajo:

Resumen sobre patología molecular.

Docente:

QF. Nanjera Mijangos Hugo

Alumno:

Gordillo López José Luis

Semestre y grupo:

3º "A"

Comitán de Domínguez, Chiapas a; 11 de Septiembre del 2020.

Patología molecular:

La Patología Molecular es la aplicación de las técnicas moleculares al diagnóstico anatomopatológico de los tumores. La reciente secuenciación del genoma humano va a permitir el conocimiento de todos y cada uno de nuestros genes, lo que sin duda dará un impulso definitivo a la Patología Molecular, al facilitar el conocimiento de la etiología molecular de las enfermedades de origen genético, tanto monogénicas como poligénicas. Entre estas últimas se encuentran algunas de las enfermedades de mayor prevalencia y con un impacto social más elevado, como la diabetes, la arteriosclerosis y el cáncer

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.

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 ácido ribonucleico (ARN) y desoxirribonucleico (ADN), a partir de muestras de tejidos (especímenes de biopsias o autopsias) o células (exámenes citológicos). Como se explicará en este artículo de revisión, la Patología Molecular tiene en la actualidad una aplicación práctica limitada, aunque presenta un gran potencial de desarrollo en el diagnóstico de laboratorio en medicina.

ESPECÍMENES TÉCNICAS USADAS EN PATOLOGÍA MOLECULAR

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 ARN¹. 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°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. 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 anátomo-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.

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

Las técnicas de micro disección disponibles se basan en la manipulación directa o a través de aparatos de micro manipulación o de un sistema semi-automatizado basado en energía láser infrarroja ("laser capture microdissection, LCM"). Las células micro disecadas 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 micro disección 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.

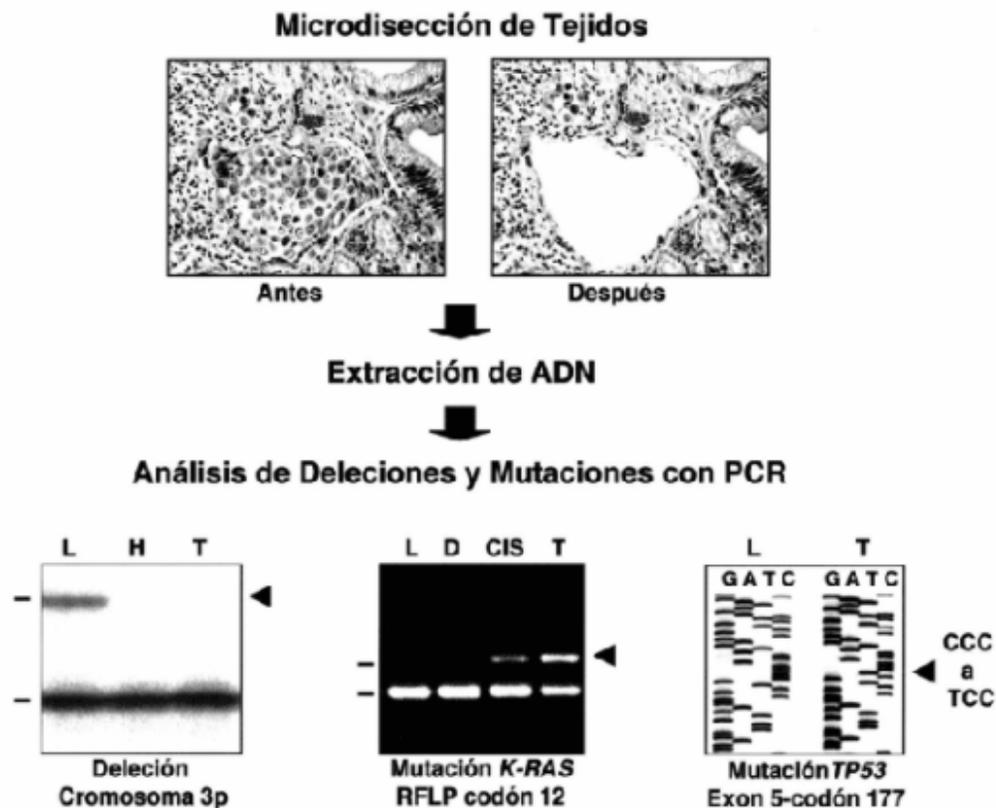


Figura 1. Esquema en el que se representa la microdisección de tejido y algunas técnicas de biología molecular que se pueden realizar a partir de este tipo de material. Paneles superiores: microfotografías con ejemplo de microdisección de un carcinoma infiltrante (antes y después). Paneles inferiores: izquierda, ejemplo de estudio de delección o pérdida de heterocigocidad en una región del cromosoma 3p con un marcador microsatélite mediante de amplificación por PCR y electroforesis (L, linfocitos; H, epitelio bronquial con hiperplasia; T, carcinoma escamoso pulmonar); centro, análisis de mutación del codon 12 del gen *K-RAS* mediante amplificación por PCR y uso de enzimas de restricción ("RFLP, restriction fragment length polymorphism") (L, linfocitos; D, epitelio bronquial con displasia; CIS, carcinoma *in situ* bronquial; T, carcinoma pulmonar); derecha, secuenciación de parte del exon 5 del gen *TP53* en el que se muestra mutación puntual en el codon 177, CCC a TCC (L, linfocitos; T, carcinoma pulmonar).

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.

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.

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

Tabla 2. Microorganismos que pueden ser detectados mediante hibridación o amplificación (PCR) de ácidos nucleicos en muestras de tejidos o citológicas

	Microorganismo	Técnica
Bacterias	<i>Legionella pneumophila</i>	PCR
	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	PCR
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	PCR
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	PCR
	<i>Mycobacterium avium</i>	PCR
	Otras especies de <i>mycobacterium</i>	PCR
	<i>Bartonella henselae</i>	PCR
	Hongos	<i>Pneumocystis carinii</i>
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	PCR
	<i>Candida albicans</i>	PCR
	<i>Aspergillus sp</i>	Hibridación <i>in situ</i> de ADN / PCR
Virus	Virus papiloma humano (sub-tipos)	Hibridación <i>in situ</i> y en fase líquida de ADN/ PCR
	Adenovirus	Hibridación <i>in situ</i> de ADN / PCR
	Citomegalovirus	PCR
	Epstein-Barr	Hibridación <i>in situ</i> de ARN/ PCR
	Hepatitis B y C	Hibridación <i>in situ</i> de ARN/ PCR-transcriptasa reversa

fundamentalmente a métodos de hibridación in situ y amplificación por PCR de los ácidos nucleicos

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 bronco alveolar, 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 avium*. 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 100000 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.

Los métodos basados en la amplificación de secuencias de ADN mediante PCR serían también herramientas útiles en el diagnóstico de micosis en muestras de tejidos o citologías. Existen varios estudios en los que se ha demostrado la identificación exitosa de hongos mediante PCR, especialmente en especímenes citológicos, tales como *Aspergillus* sp (lavados bronquiolo-alveolares), *Criptococo* (tejido pulmonar), *Candida* sp (sangre y orina), y *Pneumocystis carinii* (expectoración, lavado bronquiolo-alveolar, aspirados nasofaríngeos y tejido pulmonar). El incremento significativo de las infecciones por *Pneumocystis carinii* en las últimas décadas estimuló el desarrollo de exámenes rápidos y sensibles de diagnóstico basados en la detección de sus secuencias génicas mediante PCR. Algunos de los estudios han reportado 100% de sensibilidad y especificidad, en comparación con los métodos tradicionales, especialmente en el grupo de pacientes VIH positivos.

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.

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.

Determinación de predisposición genética para el desarrollo de neoplasias

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.

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. Este es el caso de la enfermedad conocida como síndrome de Lynch o cáncer colorrectal no poliposo hereditario, en el cual el análisis del tumor permite identificar la inestabilidad de secuencias microsatélites de ADN, también denominada errores de replicación. En este análisis el ADN extraído de tejido normal y de tumor deben ser analizados mediante amplificación por PCR para identificar el fenómeno de inestabilidad de microsatélites, fenómeno que sugiere un defecto en los mecanismos de reparación de ADN.

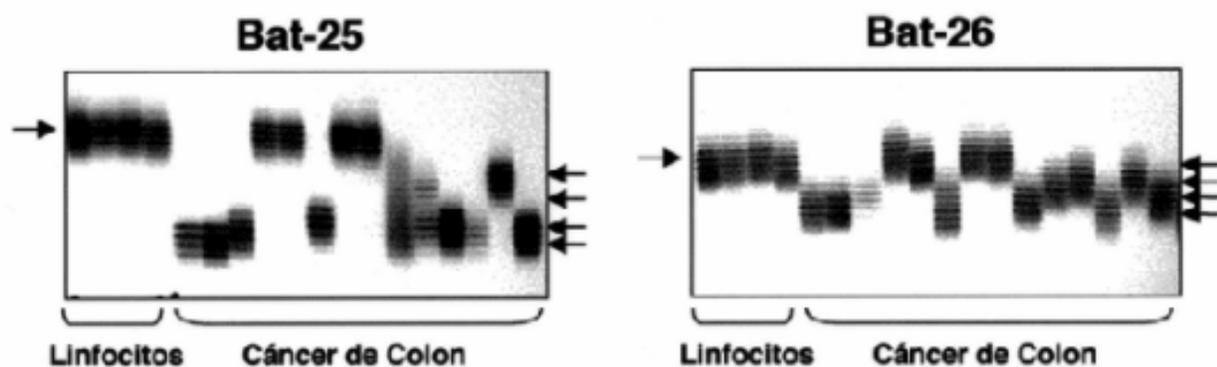


Figura 2. Estudio del fenómeno de inestabilidad genética o error de replicación en cáncer de colon. Ambos paneles, amplificación por PCR y electroforesis de secuencias microsatélites BAT-25 y BAT-26 en ADN extraído de linfocitos normales sanguíneos y de células tumorales de cáncer de colon. Flechas a la izquierda de ambos paneles muestran posición de las secuencias normales y flechas a la derecha de los mismos indican secuencias anormales propias de la inestabilidad genética. El fenómeno de inestabilidad genética en esta neoplasia puede estar asociado a mutación de genes encargados de la reparación del ADN.

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 pre neoplásicas 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 anátomo-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.

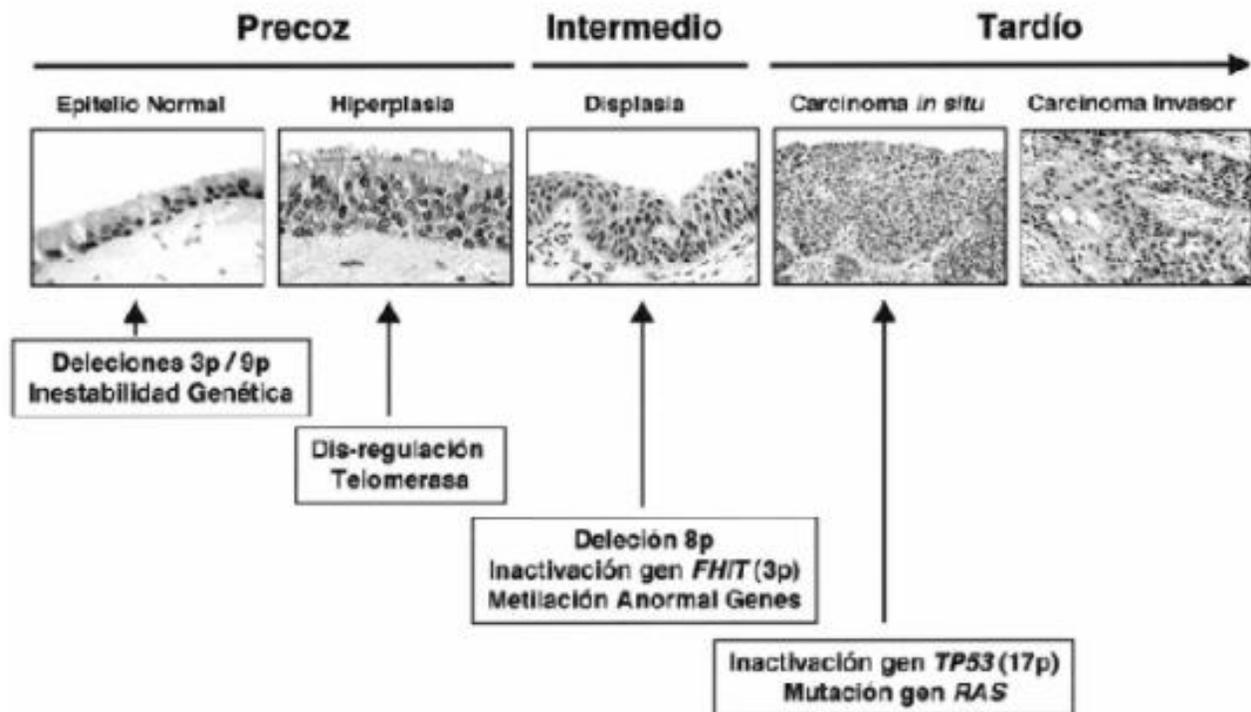


Figura 3. Ejemplo de modelo secuencial de origen de una neoplasia. Resumen de la progresión de alteraciones histopatológicas (microfotografías) y genéticas en el desarrollo de carcinoma escamoso de pulmón. Las alteraciones moleculares pueden comenzar precozmente (epitelio bronquial histológicamente normal o con alteraciones mínimas), en estadios intermedios (displasia del epitelio bronquial); o relativamente tardíos (carcinoma *in situ* o tumor infiltrante).

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.

Una de las aplicaciones del conocimiento de las alteraciones genéticas en las lesiones precursoras humanas la constituye la evaluación de su utilidad como control de la progresión o regresión de las mismas, y para el monitoreo de terapias quimio-preventivas.

Diagnóstico de tipos específicos de neoplasias

- a) Translocación de cromosomas en sarcomas y neoplasias hematológicas. Ciertos sarcomas se caracterizan por translocaciones cromosomales específicas y recurrentes. Estas translocaciones 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

Tabla 3. Traslocaciones cromosomales más frecuentes en sarcomas

Tumor	Translocación	Genes de Fusión	Frecuencia Estimada* (%)
Sarcoma de Ewing / Tumor neuroectodérmico periférico	t(11;22)(q24;q12)	EWS-FLI1	95
Sarcoma de Ewing / Tumor neuroectodérmico periférico	t(21;22)(q22;q12)	EWS-ERG	5
Tumor desmoplásico de células redondas pequeñas	t(11;22)(p13;q12)	EWS-WT1	>99
Liposarcoma mixoide / células pequeñas	t(12;16)(q13;p11)	TLS-CHOP	95
Condrosarcoma mixoide extra-esquelético	t(9;22)(q22;q12)	EWS-CHN	75
Condrosarcoma mixoide extra-esquelético	t(9;17)(q22;q11)	TAF2N-CHN	25
Sarcoma sinovial	t(X;18)(p11;q11)	SYT-SSX1	65
Sarcoma sinovial	t(X;18)(p11;q11)	SYT-SSX2	35
Rabdomiosarcoma alveolar	t(2;13)(q35;q14)	PAX3-FKHR	75
Rabdomiosarcoma alveolar	t(1;13)(p36;q14)	PAX7-FKHR	10
Dermatofibrosarcoma protuberans	t(17;22)(q226;q13)	COL1A1-PDGFB	>99

*Frecuencia aproximada para cada categoría. Las frecuencias pueden variar de acuerdo a los métodos de detección utilizados.

Las traslocaciones cromosomales son también frecuentes en neoplasias hematológicas (linfomas y leucemias), algunas de las cuales son también utilizadas con fines diagnósticos. Muchos linfomas no-Hodgkin presentan traslocaciones cromosomales específicas, las cuales forman parte integral del diagnóstico y clasificación de estas neoplasias.

Tabla 4. Traslocaciones cromosomales más frecuentes en linfomas no-Hodgkin

Tumor	Traslocación	Genes de Fusión	Frecuencia Estimada * (%)
Células B			
Centro folicular	t(14;18)(q32;q31)	IgH-BCL2	90
Burkitt	t(8;14)(q24;q32)	MYC-IgH	75
	t(2;8)(q12;q24)	Igk-MYC	16
	t(8;22)(q12;q24)	MYC-IgI	9
	t(11;14)(q13;q32)	CCND1-IgH	70
Células de manto	t(9;14)(p13;q32)	PAX5-IgH	50
Linfoplasmocítico	t(3q27)	BCL6	40
Difuso de células grandes	t(11;18)(q21;q21)	--	35
Zona marginal			
Células T			
Anaplásico de células grandes	t(2;5)(p23;q35)	NMP-ALK	35

*Frecuencia aproximada para cada categoría. Las frecuencias pueden variar de acuerdo a los métodos de detección utilizados.

-- Genes comprometidos no han sido aún identificados.

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).

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.

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 encuentra 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. Un ejemplo de esto lo constituye el desarrollo de terapias basadas en anticuerpos anti-proteína HER-2/neu producto del gen del mismo nombre, cuya anomalía genética más relevante, la amplificación génica, está presente en aproximadamente el 40% de los carcinomas de mama.

f) Determinación del pronóstico. 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.

Bibliografías:

-  <http://www.doctorazua.com/patologia-molecular>
-  <http://www.jmordoh.com.ar/clases/patmolecular.pdf>
-  <https://cienciaysalud.laverdad.es/la-genetica-molecular-biotecnologia/genetica-genomica-terapia-genica/que-patologia-molecular-article.html?ref=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F>
-  https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872001000700014