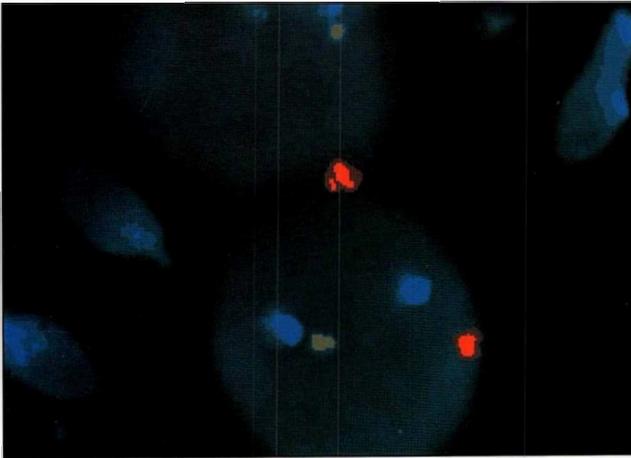


PATOLOGÍA MOLECULAR EN EL DIAGNÓSTICO ONCOLÓGICO, ENFERMEDADES METABÓLICAS, OBESIDAD Y ENVEJECIMIENTO.

Facultad de Medicina

Ana Mariño
Omar Alonso
Raúl Pisabarro

Cristovam Scapulatempo Neto
Roberto Pinto Paes
Adhemar Longatto
Rui Manuel Reis



COMISIÓN SECTORIAL DE EDUCACIÓN PERMANENTE



EDUCACION PERMANENTE
Universidad de la República



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA

ÁREA CIENCIAS
DE LA SALUD

SD

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE MEDICINA - HOSPITAL DE CLÍNICAS

Patología molecular en el diagnóstico oncológico de las enfermedades metabólicas, obesidad y envejecimiento

PRIMER CURSO DE PATOLOGÍA MOLECULAR DIAGNÓSTICA
TERAPÉUTICA E INVESTIGATIVA

ORGANIZA: UNIDAD DE INMUNOBIOLOGÍA MOLECULAR
UNIBIM- BANCO DE TUMORES Cátedra de Anatomía Patológica

16 - 17 Mayo 2013

COLABORAN Y PARTICIPAN

Cátedra de Endocrinología, Departamento Básico de Medicina
Cátedra de Medicina Nuclear, Unidad Molecular Facultad de
Química, Área de Bioquímica, Facultad de Ciencias,
Servicio de Patología Molecular del Hospital Barretos del Cáncer,
Facultad de Medicina, Barretos, Fundación PÍO XII. Brasil.

© 2013 Comisión Sectorial de Educación Permanente – Facultad de Medicina

Los conceptos vertidos en los libros editados por la Facultad de Medicina de la Universidad de la República son de responsabilidad de sus autores. Su publicación no implica que sean compartidos por las mencionadas instituciones.

ISBN: 978-9974-0-0973-8

Dep. Legal Nº 362.869 / 13

Edición amparada en el decreto 218/996 (Comisión del Papel)

Edición de texto: Grupo Magro editores.

Impresión: Zonalibro S.A.

Diseño de tapa: Unidad de Educación Permanente de la Universidad de la República

Ilustraciones: Sebastián Rodríguez Investigador en el área biológica- UNIBIM (Facultad de Ciencias)

Publicado por Comisión Sectorial de Educación Permanente – Facultad de Medicina – Universidad de la República.

Calle Rodó 1854 Esq. Emilio Frugoni-Tel. : (598) 24026913 - (598) 24092973. ucep@eduper.edu.uy

Este libro ha sido financiado con el programa Fondo Universitario de la Comisión Sectorial de Educación Permanente de la Universidad de la República para Contribuir a la Comprensión de Temas de Patología General y Molecular. El título del Texto es: **PATOLOGÍA MOLECULAR EN EL DIAGNÓSTICO ONCOLÓGICO. DE LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS, OBESIDAD Y ENVEJECIMIENTO.**

© 2013 Comisión Sectorial de Educación Permanente – Facultad de Medicina

PRIMER CURSO EN PATOLOGÍA MOLECULAR DIAGNÓSTICA, TERAPÉUTICA E INVESTIGATIVA

**UNIBIM-BANCO DE TUMORES HOSPITAL DE CLÍNICAS
Facultad de Medicina, Udelar.**

DOCENTES PARTICIPANTES

Prof. Dr. Roberto Pinto Paes

Médico Especialista en Anatomía Patológica, Universidad -Santa Casa de San Pablo-Brasil- Experto el Patología Linfhemática Morfomolecular, Formado en UK, Universidad Real de Londres. Extensa formación en Inmunohistoquímica y Biología Molecular.

Integra múltiples Comités de arbitraje editoriales.

CONFERENCISTA INTERNACIONAL

Prof. Director de Patología de la Santa Casa, San Pablo-BRASIL

PhD. Adhemar - Longatto

Graduado en Biomedicina Universidad de Santo Amaro (1979), Doctorado en Patología Experimental y Comparada por FMVZ-USP. Post Doctorado en Morfometría por la Universidad de Ancona, Italia y la Universidad de Minho, Portugal COORDINADOR del Curso de postgraduados en Oncología del Hospital de Cáncer Barretos Miembro de la Academia Internacional de Citología, de la Sociedad Europea de Patología.

PhD Rui Manuel Reis

Biólogo, F. Ciencias Universidad de Porto (UP), Portugal en 1995. Doctorado en Neuro-Oncología em 2001 International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, Francia y F. Medicina de UP. Postdoctorado en Genómica del cáncer Free University Medical Centre (VUMC), Amsterdam, Holanda y en IPATIMUP, Porto, Portugal en 2002. Desde 2003, Profesor Auxiliar, responsable del área de genética en Medicina. Universidade do Minho (UM), Braga, Portugal- Coordinador del Centro de Pesquisa en Oncología Molecular del Hospital de Cáncer de Barretos, SP, Brasil.

Cristovam Scapulatempo Neto

Potgraduación en Medicina por la Universidad de Taubaté (2000) Doctorado en Patología por la Universidade de São Paulo (2008).

Actualmente Jefe del Servicio de Patología y Patología molecular del Hospital del Cáncer de Barretos - Fundación PÍO XII.

Experiencia en Patología quirúrgica y citología principalmente: patología quirúrgica, inmunohistoquímica y Patología Molecular, citopatología, tumores de cabeza y cuello y hematopatología.

Prof. Dr. Omar Alonso

Profesor Director de Medicina Nuclear, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, UdeLaR.
Conferencista Internacional
Integrante de la Comisión de Investigación. Co-Director de CUDIM. Montevideo, Uruguay

Prof. Agregada Dra. Ana Mariño

Encargada de la Unidad de Inmunobiopatología Molecular UNIBIM y Banco de Tumores, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, UdeLaR Master en Patología Molecular y Diploma en Gestión de Banco de Tumores. Miembro Consultor del Grupo de Expertos de Patología Digestiva Europeo.

Prof. Dr. Raúl Pisabarro

Profesor Director de la Cátedra de Endocrinología del Hospital de Clínicas. Especialista en Obesidad y Enfermedades Metabólicas. Facultad de Medicina, UdeLaR.

Prof. Dra. Gisele Acosta Dibrat

Profesora Directora de la Cátedra y Departamento de Anatomía Patológica Hospital de Clínicas. Especialista en Patología Ginecológica. Facultad de Medicina, UdeLaR.

Prof. Agregada Dra. Daniela Lens

Encargada de la Unidad de Citometría de Flujo del Departamento Básico de Medicina, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, UdeLaR.

Prof. Adjunta Dra. Julia Bernachin

Prof. Adjunta de la Unidad de Inmunobiopatología Molecular, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, UdeLaR. Estudiante de Maestría PROINBIO. UdeLaR.

Sebastián Rodríguez

Investigador en el área Biológica-UNIBIM-Facultad de Ciencias.

Dr. Javier Cedrani

Postgrado de Anatomía Patológica.

Dra. Natalia Maciel

Residente de Anatomía Patológica

Histotecnóloga Adela Díaz

Tecnóloga en Patología Molecular UNIBIM y Banco de Tumores. Especialista en Inmunohistoquímica. Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, UdeLaR.

Histotecnóloga Alicia González

Tecnóloga en Patología Molecular UNIBIM y Banco de Tumores. Especialista en Inmunohistoquímica. Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, UdeLaR.

Histotecnóloga Verónica Lezué

Tecnóloga en Patología Molecular UNIBIM y Banco de Tumores. Especialista en Inmunohistoquímica. Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, UdeLaR.

DOCENTES PARTICIPANTES

DR. ROBERTO PINTO PAES

HOSPITAL SANTA CASA, SAN PABLO, BRASIL

PHD. ADHEMAR LONGATTO

HOSPITAL DAS CLINICAS, SAN PABLO, BRASIL.

PHD. RUI MANUEL REIS

HOSPITAL BARRETOS, BRASIL

PHD. CRISTOVAM SCAPULATEMPO NETO

HOSPITAL BARRETOS, BRASIL

PROF. AGREG. DRA. ANA MARIÑO

UNIBIM-BANCO DE TUMORES

HOSPITAL DE CLÍNICAS, FACULTAD DE MEDICINA, MONTEVIDEO,
URUGUAY.

PROF. ADJ. DRA. JULIA BERNACHÍN

UNIBIM-BANCO DE TUMORES

HOSPITAL DE CLÍNICAS, FACULTAD DE MEDICINA, MONTEVIDEO,
URUGUAY.

PROF. AGREG. DRA. DANIELA LENS

UNIDAD DE CITOMETRÍA DE FLUJO. HOSPITAL DE CLÍNICAS,
FACULTAD DE MEDICINA, MONTEVIDEO, URUGUAY.

PROF. DR. OMAR ALONSO

CÁTEDRA DE MEDICINA NUCLEAR-CUDIM. HOSPITAL DE CLÍNICAS,
FACULTAD DE MEDICINA, MONTEVIDEO, URUGUAY

PROF. DR. RAÚL PISABARRO

CÁTEDRA DE ENDOCRINOLOGÍA. HOSPITAL DE CLÍNICAS, FACULTAD
DE MEDICINA, MONTEVIDEO, URUGUAY

DRA. NATALIA MACIEL

UNIBIM, HOSPITAL DE CLÍNICAS, FACULTAD DE MEDICINA, MONTEVIDEO, URUGUAY

DR. JAVIER CEDRANI

UNIBIM, HOSPITAL DE CLÍNICAS, FACULTAD DE MEDICINA, MONTEVIDEO, URUGUAY.

SEBASTIÁN RODRIGUEZ

UNIBIM, FACULTAD DE CIENCIAS, MONTEVIDEO URUGUAY.

Indice

Prefacio	11
Introducción. Servicios de Patología Molecular, Justificación y cometidos	13
Metodologías empleadas en los Servicios Moleculares	15
Inmunopatología y Patología Oncológica	17
Biología molecular y su implicancia en la anatomía patológica actual	29
Diagnóstico Molecular	37
Linfoma del manto	47
Aportes de la Citometría de Flujo en el Diagnóstico de los Linfomas del Manto y sus diagnósticos diferenciales	53
Screening en Cáncer Cervical: Nueva Era Nuevos Paradigmas	59
Leucemia Mieloide Crónica	67
Aspectos moleculares en el cáncer gástrico	73
HER2 en cáncer gástrico	77

Melanoma aspectos moleculares actuales	83
Introducción al Centro de Pesquisa en Oncología Molecular	87
Aportes de la Imagenología Molecular en la Investigación Clínica en Uruguay	91
Utilidad de los MicroRNAs en Patología Oncomolecular	99
Aspectos Moleculares del Envejecimiento celular	111
Obesidad y cáncer. Aspectos moleculares	117
Esteatohepatitis no Alcohólica EHNA-(NASH)	125
Bibliografía	131

Prefacio

Este libro es el resultado de toda la información dictada por docentes de diferentes disciplinas en el Primer Curso de Patología Molecular Diagnóstica, Terapéutica e Investigativa, en la que participaron docentes de la Facultad de Medicina de la UdelaR, Uruguay, en conjunto con docentes de la Universidad de Minho (UM), Braga, Portugal y del Hospital del Cáncer de Barretos, Facultad de Medicina SP, Brasil. Ha sido nuestra intención brindar información accesible, basada en el conocimiento científico académico. La información brindada en el texto contribuye a fomentar la comprensión de temas de gran interés como es la Patología de las diversas enfermedades, y sus aspectos moleculares con impacto en el diagnóstico, pronóstico y terapéutica más específica, personalizada y racional de los pacientes.

Queremos agradecer a quienes han hecho posible este texto- Comisión Sectorial de Educación Permanente-UDELAR.

El mismo está dedicado a todos los alumnos y especialistas de disciplinas afines a la Patología Molecular.

Drs. Ana Mariño, Omar Alonso, Raúl Pisabarro.



Introducción

Servicios de Patología Molecular, Justificación y cometidos

Prof. Agregada Dra. Ana Mariño

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: estas 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 **especialidad** en esta disciplina, la Patología Inmunomolecular. La Patología Inmunomolecular es una especialidad que se define por predecir el diagnóstico y la terapéutica de Enfermedades Oncológicas y no Oncológicas determinada por técnicas especializadas que se utilizan en ella y por los elementos que se analizan, básicamente reacciones antígeno anticuerpo mediante inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, estudio de ácidos ribonucleico (ARN) y desoxirribonucleico

(ADN), a partir de muestras de tejidos (especímenes de biopsias o autopsias) o células (exámenes citológicos).

El concepto de la Anatomía Patológica en las últimas décadas ha experimentado un notable cambio, mutando de una patología casi exclusivamente morfológica a un diagnóstico apoyado en métodos de estudio inmunobiológicos, basado en técnicas que analizan la Patología diagnóstica, pronóstica y terapéutica desde una perspectiva más objetiva y precisa.

El avance de la Anatomía Patológica en los últimos 30 años ha sido acelerado, sumado al hecho de nuevos métodos terapéuticos en patología oncológica que apuestan a una terapia más racional y personalizada, siendo en estos casos el diagnóstico inmunopatológico el eje o guía en el cual se sustenta este tipo de terapia.

En este contexto se crean y desarrollan áreas especializadas que estudian la Patología inmunomolecular constituyéndose en un desafío para el Patólogo dado que implica un conocimiento profundo de ésta área de la Patología y una especialización tanto en el desarrollo de dichas técnicas como en la interpretación de las mismas.

El campo de la Inmunobiopatología ha cambiado el concepto de la Patología como disciplina morfológica realizando el diagnóstico mediante la utilización de métodos moleculares que permiten inclusive la extracción de ADN de tacos parafinados determinando la alteración genética causante de la enfermedad morfológica.

En el momento actual es uno de los campos más prometedores en la medicina diagnóstica y terapéutica de este próximo siglo.

La Patología Molecular permite mediante diferentes técnicas diagnósticas (inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, CISH, FISH, extracción de ADN mediante microdissección de tejido "in situ".) realizar un diagnóstico preciso de enfermedades oncológicas, infecciosas y degenerativas, colabora en la Patología del Trasplante y en la inmunodetección de las células regenerativas o "stem cells".

Permite predecir el pronóstico de la enfermedad con mayor certeza, así como una terapéutica específica o terapia "target" en Patología Oncológica e infecciosa.

Metodologías empleadas en los Servicios Moleculares

Prof. Agregada Dra. Ana Mariño
Prof. Agregada Dra. Cristina Touriño

IMUNOHISTOQUÍMICA

La inmunohistoquímica es la detección de los antígenos en los tejidos mediante el uso de anticuerpos a través de reacciones específicas e interacciones antígeno anticuerpos a través de la cual se visualiza con coloraciones especiales la misma.

La inmunohistoquímica es una herramienta fundamental en el diagnóstico patológico y en la investigación médica. Las técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) permiten la identificación, sobre muestras tisulares o citológicas, de determinantes antigénicos característicos de distintas líneas de diferenciación y funcionalismo celular.

La aplicación directa de anticuerpos policlonales o monoclonales sobre secciones tisulares permite la localización microanatómica de su expresión y su correlación con los parámetros morfológicos, aumentando la sensibilidad y especificidad del estudio y proporcionando información adicional esencial en muchos casos. En las últimas décadas la utilización de la IHQ ha sido progresivamente creciente y se ha consolidado como tecnología esencial en el diagnóstico patológico de rutina. En general y muy especialmente en patología oncológica, son cada vez más las patologías cuyo diagnóstico y clasificación requiere IHQ. La incorporación de nuevos protocolos de recuperación antigénica y la afluencia constante de nuevos anticuerpos están am-

pliando notablemente el ámbito de aplicación con nuevas utilidades en diagnóstico y pronóstico. En el momento actual existen más de 2500 anticuerpos en el mercado que el especialista en esta disciplina debe conocer todas sus interacciones posibles. En fase de investigación y desarrollo existen numerosos anticuerpos.

La IHQ requiere una metodología de laboratorio muy distinta de la del laboratorio clásico de anatomía patológica y, para su correcta utilización, es indispensable conocer en profundidad sus ventajas y limitaciones. Es fundamental disponer de una amplia batería de anticuerpos que permita trabajar con paneles amplios protocolizados y actualizados. La elección de un panel de anticuerpos inapropiado o excesivamente limitado puede llevar a conclusiones insuficientes o erróneas.

El panel inicial de estudio debe elaborarlo el patólogo en función de la clínica y del estudio morfológico previo y, siempre que sea posible, debe incluir distintos anticuerpos para cada una de las líneas de diferenciación que se investigan.

El personal técnico y Médico debe estar específicamente entrenado en el manejo y evaluación de los distintos anticuerpos y disponer de información apropiada acerca de su sensibilidad y especificidad, del método de evaluación de resultados y de su posible trascendencia clínica. La interpretación debe efectuarse siempre conjuntamente con el contexto clínico y los hallazgos morfológicos.

Es importante conocer las posibles causas de falsos positivos y falsos negativos con los distintos anticuerpos y seguir una sistemática meticulosa de controles negativos y positivos en cada proceso de laboratorio. Los anticuerpos de nueva incorporación requieren siempre un enfoque crítico y cauto en las primeras fases de utilización ya que la presunta especificidad y sensibilidad inicial puede modificarse al acumular experiencia y publicaciones.

Un aspecto elemental, pero esencial, es la preservación del tejido desde el momento de su obtención. La inmensa mayoría de técnicas de IHQ pueden aplicarse a tejido fijado e incluido en parafina con buenos resultados, siempre que la fijación tisular, su procesado e inclusión se realicen correctamente.

La utilización de métodos o reactivos inapropiados en el tratamiento tisular previo a la IHQ determina pérdidas de antigenicidad que limitarán o impedirán la obtención de resultados fiables. Existen numerosos métodos de detección de antígenos por inmunohistoquímica que no detallaremos.

El ideal es aquel método que esté basado en parámetros de investigación certeros y que tenga el grado de sensibilidad requerido.

Inmunopatología y Patología Oncológica

Prof. Agregada Dra. Ana Mariño

Prof. Agregada Dra. Cristina Touriño

La evolución de la Oncología en las últimas décadas y los avances en Patología molecular han incorporado modificaciones sustanciales, cuantitativas y cualitativas, en la información que se espera del patólogo, configurando progresivamente un nuevo escenario en los laboratorios de Patología con complejidad tecnológica y especialización crecientes.

La metodología de estudio de piezas quirúrgicas oncológicas debe proporcionar, además del diagnóstico, la totalidad de los parámetros morfológicos y moleculares necesarios para el seguimiento del paciente y las decisiones terapéuticas.

INMUNOFLUORESCENCIA

La microscopia de inmunofluorescencia es una técnica de inmunohistoquímica que consiste en conjugar colorantes fluorescentes (isotiocianato de fluoresceína, rodamina B de lisamina o ácido 1-dimetilaminonaftalen-5-sulfónico) con anticuerpos o antígenos, exponiendo después este conjugado a los anticuerpos o antígenos correspondientes en cortes de tejidos, frotis de microorganismos o de células, o cultivo de tejidos en capa única. Cuando la reacción es positiva y se expone a la luz ultravioleta se producirá fluorescencia observable bajo el microscopio de inmunofluorescencia.

Se utiliza en los tejidos neoplásicos, en patología del trasplante, en pacientes con patología infecciosa, regenerativa y por depósitos.

HIBRIDIZACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH)

Es un proceso técnico que detecta a los cromosomas o porciones de ellos, con moléculas fluorescentes. Esta técnica es útil para identificar anomalías cromosómicas y elaborar mapas génicos y genéticos.

Esta técnica permite la visualización de genes y fragmentos de ADN en los cromosomas durante todas las etapas del ciclo celular. El proceso involucra marcar fluorescentemente las sondas de ADN, un paso de hibridización y finalmente la visualización de la secuencia usando microscopía de fluorescencia. El FISH se utiliza para estudios de mapas genéticos y para el análisis de cambios en los cromosomas, como los que ocurren en las células cancerosas (1, 2).

La utilización del FISH puede ser realizada en tejido formalizado y deparafinado o en citología. La técnica de **FISH** (Hibridización in situ fluorescente) permite en el caso de la Patología oncológica determinar el oncogén implicado, la traslocación genética o la mutación del mismo. En la mayoría de los casos esto es indispensable para un correcto diagnóstico y para un adecuado tratamiento.

La técnica de FISH es aplicable a una variedad muy importante de patologías pudiendo ser realizada sobre tejido fresco congelado, citología, tejido previamente fijado en formalina e incluso material de banco.

La técnica de FISH para la detección de translocaciones se basa en la utilización de sondas, marcada con diferentes fluorocromos. Según la estrategia empleada, se distinguen dos tipos de sondas: sondas de fusión o colocalización y sondas de separación o "split" (también llamadas "break-apart"). En las primeras se emplea una sonda específica para cada uno de los loci involucrados en la translocación, de tal manera que la presencia de dicha translocación producirá una yuxtaposición de señales (roja y verde juntas o color amarillo si hay una gran superposición). Las sondas "split", por el contrario, van dirigidas contra regiones que flanquean el punto de rotura de un mismo gen; por tanto, en núcleos normales las señales se yuxtaponen, mientras que aparecen señales separadas en núcleos que portan alguna translocación que afecte dicho gen. Las sondas "split" son muy útiles para el estudio de translocaciones en los que los genes diana presentan múltiples posibles "partners", como es el caso de MYC, BCL6 o ALK; de otra manera, hay que realizar varios FISH con sondas de fusión específicas para cada uno de los posibles "partners". Por supuesto, ambas estrategias se pueden combinar.

La técnica de FISH es algo más problemática sobre tejidos parafinados, por lo que podemos recurrir a su realización sobre improntas o citologías. Por este motivo, es de amplia utilización en hematopatología. Sin embargo, es evidente que no en todos los casos vamos a disponer de este tipo de muestras, como por ejemplo en biopsias endoscópicas, y por otra parte, perderíamos la oportunidad de realizar estudios retrospectivos. Los problemas que la técnica de FISH sobre parafina suelen plantear son de dos tipos: técnicos (señal de hibridación débil o poco reproducible debido a la interferencia que suponen la fijación e inclusión en parafina), y de interpretación de los resultados. Para solucionar estos problemas, hay autores que abogan por la realización de FISH sobre núcleos celulares aislados, extraídos de secciones gruesas de parafina. Nosotros preferimos realizar la técnica directamente sobre cortes de 3 micras; de esta manera, la translocación se estudia en su contexto histológico, el procedimiento es más rápido y menos engorroso y se pueden estudiar biopsias pequeñas.

La técnica de FISH posee un enorme potencial de aplicaciones en hematopatología. Permite detectar translocaciones y otras alteraciones genéticas de interés diagnóstico y pronóstico en material anatomopatológico de rutina, con ventajas sobre otras técnicas moleculares. Además, requiere escasa cantidad de material y posibilita la realización de estudios retrospectivos. Todo esto, junto con la creciente disponibilidad de sondas comerciales, abre grandes posibilidades de aplicación.

Esta técnica puede ser combinada con la técnica de Inmunohistoquímica (**IHQ**) poniendo de manifiesto alteraciones cromosómicas numéricas o traslocaciones en patología oncológica. Ambas técnicas son análogas excepto en cuanto a que FISH utiliza pruebas de ADN, a diferencia de la IHQ que utiliza anticuerpos (3, 4).

Ambas técnicas son correlacionables y sumatorias en el diagnóstico de rutina. Mientras que la IHQ permite evidenciar la sobreexpresión proteica, la técnica de FISH pone de manifiesto la alteración del ADN (amplificación, delección, mutación o traslocación) lo que permite en definitiva realizar un diagnóstico objetivo y de certeza. Comparado con otras técnicas de biología molecular (PCR, CGH-array etc.), la técnica de FISH es de relativo bajo costo, más sencilla, mejor reproductibilidad y más objetiva.

Las principales aplicaciones de la técnica FISH ("Fluorescence In Situ Hybridization") en el área de la Patología Oncológica e Infecciosa General. La técnica FISH presenta indudables ventajas sobre otras técnicas de análisis genético. A diferencia de la citogenética conven-

cional, no requiere células en división (cultivo celular previo), sino que pueden utilizarse núcleos en interface.

Esto es fundamental para el estudio de los tumores con bajo índice de proliferación celular. Al igual que la PCR, la técnica de FISH se puede realizar sobre tejido fijado e incluido en parafina, algo esencial para su plena incorporación en el laboratorio de Anatomía Patológica. Además presenta algunas ventajas adicionales sobre la PCR: permite la detección de anomalías como monosomías o trisomías, que no pueden ser estudiadas por PCR, y es muy útil para la detección de translocaciones con puntos de rotura variables y dispersos. Esta técnica es ideal pues permite un estudio concomitante de la morfología celular asociado a alteraciones moleculares.

La **patología oncológica** es una de las principales causas de muerte en el Uruguay y las principales aplicaciones de la técnica de FISH son en el área de la hematología, leucemias, linfomas, tumores sólidos en general, en el cáncer de mama y en el melanoma.

Aplicaciones en Hematopatología

La utilización de la técnica de FISH ha aumentado en los últimos años en hematología como complemento de la citogenética convencional en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de las neoplasias hematológicas.

En algunos casos es fundamental para establecer el diagnóstico de ciertas hemopatías (leucemias, linfomas). En otros casos es importante para determinar el pronóstico de la entidad (SMD, leucemias, linfomas). (5, 6, 7)

En ciertas patologías, como en la leucemia mieloide promielocítica, es indispensable para el diagnóstico e impone un tratamiento específico vinculado a la alteración molecular presente en esta entidad. Además, tanto en esta entidad como en otras entidades es fundamental para el seguimiento y evaluación de la respuesta al tratamiento.

La aplicación de la técnica FISH en el estudio de los **linfomas**, reside en su importancia diagnóstica para la detección de translocaciones. *Translocación t(14;18)*. La translocación t(14;18)(q32;q21) se encuentra en alrededor del 90% de los linfomas foliculares y en aproximadamente el 30% de los linfomas B difusos de células grandes. Esta translocación afecta al gen de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (IgH) en el cromosoma 14 y al gen BCL2 en el cromosoma 18. Cuando el punto de rotura en el cromosoma 18 se

sitúa en una de las dos regiones clásicas, MBR ("major breakpoint region") o, más raramente, MCR ("minor cluster region"), la translocación puede ser detectada por PCR. Sin embargo, en un 30-40% de los casos de linfoma folicular el punto de rotura se sitúa en otras regiones. Esto supone que cuando utilizamos PCR estamos expuestos a ese mismo porcentaje de falsos negativos. La técnica de FISH no presenta ese problema y puede detectar prácticamente todos los casos con $t(14;18)$. *Translocación $t(11;14)$* . - La $t(11;14)(q13;q32)$ es el marcador genético característico del linfoma del manto, aunque puede encontrarse también en un 20% de mielomas. En esta translocación el gen de la ciclina D1, localizado en la región BCL1 del cromosoma 11, se yuxtapone al gen de IgH en el cromosoma 14. La técnica de elección para detectar $t(11;14)$ es FISH, aunque se puede optar por la demostración indirecta de la translocación mediante inmunohistoquímica para ciclina D1. Con PCR sólo se detecta la mitad de los casos, aquellos en los que el punto de rotura en el locus BCL1 se sitúa en la región denominada MTC ("major translocation cluster"). *Translocación $t(8;14)$* . - La $t(8;14)(q24;q32)$ se detecta en aproximadamente el 80% de los linfomas de Burkitt. Conlleva la yuxtaposición del oncogén C-MYC (cromosoma 8) al gen de IgH (cromosoma 14). Dada la variabilidad en los puntos de rotura, la PCR no es adecuada para el estudio de esta translocación; las técnicas más sensibles son FISH y Southern blot. Esta última técnica, sin embargo, requiere más tiempo de procesamiento y la utilización de material radioactivo, es costosa y resulta muy laboriosa, por lo que lo más práctico es la realización de FISH. *Translocación $t(11;18)$* . - La $t(11;18)(q21;q21)$ es la más frecuente en el linfoma MALT (casi el 50% de los casos). Produce la fusión del gen API2, inhibidor de apoptosis, con MLT, gen con función desconocida. En el linfoma MALT gástrico, esta translocación se asocia con falta de respuesta al tratamiento con antibióticos y con un menor riesgo de transformación a linfoma B de células grandes. Debido a la variabilidad en los puntos de rotura, las técnicas empleadas para su detección son FISH y RT-PCR. Sin embargo, la técnica de elección para su detección es el FISH, ya que puede realizarse sobre biopsias endoscópicas incluidas en parafina, fuente habitual de diagnóstico de esta entidad.

Otra aplicación de la FISH, de gran relevancia diagnóstica y pronóstica, es en el estudio de las **leucemias**. En las leucemias agudas (LA) el estudio citogenético permite identificar diferentes entidades clínico-citogenéticas.

En las LAM (Leucemias Agudas Mieloblásticas):

- *Translocación $t(8;21)$* : determina un pronóstico favorable en adultos en las LAM M2.

- *Translocación t(15;17)* esta translocación es altamente específica de la leucemia aguda promielocítica (LAP) o LAM M3. Como ya fue mencionado, el hallazgo de esta translocación tiene implicancias terapéuticas ya que la LAP con esta translocación es sensible al tratamiento con ácido transretinoico o trióxido de arsénico.
- *Alteraciones del cromosoma 16*: En la LA mielomonocítica con eosinofilia (LMA-M4Eo) pueden existir alteraciones del cromosoma 16 vinculadas con buena respuesta al tratamiento. La mayoría de los pacientes presenta una inversión del cromosoma 16 inv(16) y algunos la t(16;16). (8, 9, 10)

En las LA linfoblásticas:

- *hiperdiploidía* que tiene buen pronóstico
- *translocación t(9;22)* que tiene mal pronóstico con implicancias terapéuticas.

También, en el estudio de los **Síndromes Mieloproliferativos Crónicos** tiene gran aplicación. La citogenética es diagnóstica en la Leucemia Mieloide Crónica (LMC), siendo la *translocación t(9;22) Ph* + típica de la LMC, permitiendo valorar la respuesta al tratamiento que puede ir desde una respuesta nula (>95% Ph+) hasta respuesta completa (0%Ph+). También permite saber si existe evolución clonal que tiene pronóstico peyorativo. En la Policitemia Vera pueden presentarse como alteraciones citogenéticas: +8;+9; en la Mielofibrosis Idiopática: +8;-7; *del(7q)*; *del(11q)*; *del(13q)* y *del(20q)*. En el caso de la Trombocitemia Esencial no se han identificado alteraciones constantes.

En la **Leucemia Linfóide Crónica** el empleo de FISH ha aumentado la sensibilidad para detectar translocaciones, deleciones o trisomías cromosómicas. Los pacientes con un cariotipo normal tienen un mejor pronóstico. La *delección del(13)(q14)* se asocia a larga sobrevida; la *trisomía del cromosoma 12* se asocia a pronóstico intermedio; *del(11)(q23)* y *del(17)(p13)* se asocian a mal pronóstico, progresión de la enfermedad y corta sobrevida. A su vez los pacientes con alteraciones citogenéticas complejas (más de 3 alteraciones) tienen un pronóstico más desfavorable que el resto.

En el **Mieloma Múltiple**, la aplicación de la técnica de FISH permite la detección de alteraciones cromosómicas en células en interface con una incidencia que llega a 90%. La *del(13)* se ha re-

conocido como el principal dato de laboratorio pre-terapéutico con pronóstico adverso.

Otra aplicación, de gran utilidad, es en el estudio de los pacientes portadores de **Síndromes Mielodisplásicos (SMD)**. Estos se definen como un grupo de entidades malignas adquiridas que afectan a la célula madre hematopoyética y que comparten la alteración en la producción ineficiente de células sanguíneas maduras. Una característica de los SMD es el riesgo variable de transformación leucémica (leucemia mieloide aguda), tal progresión parece estar determinado por la inestabilidad genética como de modificaciones epigenéticas. El diagnóstico de los SMD se establece por las características del aspirado y/o biopsia de médula ósea; en algunos casos las alteraciones citológicas son sutiles creando un desafío en excluir causas no neoplásicas de displasia celular. En estos casos el estudio genético se presenta como un medio alternativo de confirmación diagnóstica, así como consideraciones pronósticas y de manejo de la enfermedad. Es así, que en 1999 la OMS (Organización Mundial de la Salud) crea una nueva clasificación modificando la clasificación anterior (clasificación FAB) mediante la incorporación de una nueva visión morfológica y de los hallazgos citogenéticos. Las alteraciones citogenéticas en los SMD tienen un importante valor pronóstico, predicen la supervivencia y la progresión a la LA, siendo una de las variables utilizadas en el índice pronóstico internacional (IPI). Su incidencia es de 30 a 50% en los SMD primarios. Siendo mayor de un 80% en los secundarios y frecuentemente se observan anomalías múltiples. Los pacientes que cursan con cariotipo normal presentan mejor pronóstico que aquellos que presentan una o más anomalías cariotípicas. Sin embargo, existen excepciones a esta regla ya que el síndrome 5q- y la presencia aislada de 20q- y -Y tiene relativamente buen pronóstico. En cambio las alteraciones aisladas: *Trisomía 8 (+8)*, isocromosoma 17 (iso17q), del (12p) y sobre todo *monosomía del 7 (-7)* determinan un pronóstico desfavorable, así como también la presencia de múltiples alteraciones cromosómicas (cariotipo complejo con 3 o más anormalidades). Tomando en cuenta estas alteraciones los pacientes con SMD se distribuyen en tres grupos de riesgo: (I) pronóstico pobre: anormalidades de cromosoma 7 (pérdidas totales o parciales), anormalidades cariotípicas complejas (>3 anormalidades); (II) buen pronóstico: cariotipo normal, 5q-, 20q-, -Y; (III) pronóstico intermedio: otras anormalidades. Los hallazgos citogenéticos pueden predecir la evolución y las características clínicas de la enfermedad. El síndrome 5q- es una forma de anemia refractaria, que predomina en el sexo femenino, con megacariocitos atípicos, hipoplasia eritroide, gran dependencia a las transfusiones y bajo riesgo de transformación leucémica con una prolongada sobrevida. Aunque solo el síndrome 5q- se ha reconocido como una entidad dentro de

los SMD según la OMS, otras aberraciones cromosómicas se han ligado con las características de presentación y evolución la enfermedad. Por ejemplo, el isocromosoma 17 (iso 17q) puede asociarse con hallazgos mieloproliferativos y pobre respuesta terapéutica; la Trisomía 8 predomina en el sexo masculino y la inv(3)(q21q26. 2) se asocia con trombocitosis y displasia megacariocítica así como pobre respuesta terapéutica. (11, 12, 13).

Aunque el análisis citogenético convencional continúa siendo la técnica Standard tanto con propósito diagnóstico y/o pronóstico, existe un interés creciente en la aplicación de técnicas más sensibles como la FISH. Las ventajas de esta técnica incluyen su uso tanto para muestras de sangre periférica como de medula ósea, la oportunidad de analizar células en interface y no solamente células en división y la capacidad de analizar un número mayor de células que con las técnicas convencionales. Cuando los cambios cromosómicos solo están presentes en un pequeño grupo de células neoplásicas, situación común en los SMD, la FISH ofrece un incremento en la sensibilidad sobre las técnicas convencionales. Varios grupos han utilizado "paneles" de sondas para identificar las anormalidades más frecuentes en los SMD, como aquellas que involucran los cromosomas 5, 7, 8, 11, 13 y 20. El análisis por FISH revela en ocasiones anormalidades citogenéticas que no son reconocidas por el análisis en metafase. Muchas de las anormalidades detectadas por FISH no son reconocidas por el análisis convencional, incluso algunas de las que se incluyen en el IPI (ej. Monosomía 7 y trisomía 8). Dado que los defectos moleculares específicos son más importantes que el lugar en donde ocurre y el cambio morfológico que determina en la estructura del cromosoma, es probable que en el futuro la técnica de FISH se incorpore obligatoriamente al algoritmo terapéutico, diagnóstico y pronóstico. Es de destacar que la mayoría de los autores jerarquizan el hecho que: debe verse a la citogenética convencional y a la técnica de FISH como técnicas complementarias en el análisis de las hemopatías malignas con el fin de determinar un pronóstico y con ello definir un tratamiento acorde a la severidad de la enfermedad. (14, 15, 16).

Otra aplicación de la técnica de FISH en hemato-oncología está relacionada con la posibilidad de seguimiento de quimeras post trasplante de progenitores hematopoyéticos en caso que donante y receptor sean de sexo diferente. Esto es muy importante para el seguimiento y evolución de los pacientes trasplantados. (17, 18, 19).

1. 2. Aplicaciones en Oncología

Recientemente la FISH ha tenido un impacto en el pronóstico y tratamiento del cáncer de mama en aquellos pacientes en los que se determina mediante IHQ una intensa positividad en la expresión de la proteína HER-2/Neu. Correlacionando estos hallazgos IHQ con FISH se ha podido evidenciar la amplificación genética del gen HER-2/Neu. Dicha amplificación permite efectuar una terapia celular blanco específica (cell target specific therapy). La técnica de FISH ha sido validada como una técnica de screening en cáncer de mama para la selección de aquellas pacientes que se beneficiarán con la terapéutica con el trastuzumab, dado que un resultado positivo intenso identifica las pacientes que responderán a la quimioterapia con esta droga. Uno de los kit utilizados en el estudio de FISH para cáncer de mama es el denominado kit PathVysion que emplea dos pruebas, una para el cromosoma 17 y otra para el gen Her-2/ Neu, el nivel de la amplificación del gene Her-2/ Neu es cuantificado por el radio de las copias genéticas del Her- 2/Neu por cromosoma 17 y el radio de 2. 0 es definido como resultado positivo

Alrededor Del 25 al 30 % de los casos de tumores presentan polisomías en el cromosoma 17 esto es lo que valida la utilización del método de FISH como método de screening de alto beneficio en la selección de pacientes que se beneficiaran con la terapéutica con el trastuzumab. Esto finalmente permite una terapéutica más racional y personalizada del cáncer de mama hoy día.

1. 3. Aplicaciones en Dermatología

Dentro de los factores pronósticos en el Melanoma Maligno (MM), el índice de Breslow es el más fiable, independiente y reproducible. Sin embargo en la práctica diaria, a escala individual, es imposible predecir la evolución de la enfermedad. El MM es considerado un cáncer heterogéneo con una tasa de progresión impredecible. Se espera que en el futuro estudios genéticos e inmunohistoquímicos permitan establecer un pronóstico más confiable y un tratamiento más eficaz.

Recientemente, la identificación de altas tasas de mutación en el gen BRAF ha centrado la atención no solo por su importancia en el desarrollo del MM sino por sus posibles aplicaciones terapéuticas. Sin embargo las implicancias pronósticas de dicha alteración son controvertidas.

1. 4. Aplicaciones en Patología Infecciosa

La técnica de FISH ha sido implementada con éxito en el campo de la microbiología básica (detección de mutaciones puntuales en el genoma bacteriano) y aplicada (diagnóstico etiológico en casos de meningitis aguda supurada). Se trata de un método rápido, relativamente barato y que no requiere de una infraestructura muy compleja para su aplicación. A diferencia de los procedimientos basados en la amplificación de ácidos nucleicos, en la FISH, el riesgo de contaminación genético es menor.

El estudio de agentes virales como Epstein-Barr y HTLV tiene relevancia por su asociación con enfermedades hemato-oncológicas y el de bacterias como *Helicobacter pylori* por su relación con linfoma MALT. *Helicobacter pylori* es un patógeno digestivo asociado con úlcera péptica, gastritis crónica, linfoma de la mucosa gástrica (MALT) y adenocarcinoma gástrico. Este agente infecta a más del 90% de las personas que habitan en zonas menos desarrolladas y los mecanismos de transmisión solo se conocen parcialmente.

La aparición de cepas resistentes a claritromicina ha surgido como un problema importante en el momento de elegir el tratamiento en los individuos infectados con este agente. La infección con estas cepas resistentes se asocia con fallas terapéuticas. (20, 21, 22).

El virus de Epstein-Barr (EBV) integra la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Gammaherpesvirinae*. La partícula viral de 250nm presenta una envoltura compleja formada por lípidos y proteínas. Tiene una cápside icosaédrica integrada por 162 capsómeros. El genoma es ADN de doble cadena y lineal.

La infección con EBV en individuos con algún tipo de inmunodeficiencia se asocia con el desarrollo de linfoma de Burkitt, otros linfomas como Enfermedad de Hodgkin, carcinoma nasofaríngeo y leiomiomasarcoma. La expresión de genes virales tendría potencial oncogénico en las células eucariotas infectadas, sobre todo en aquellas en las cuales el genoma viral está integrado en forma de provirus. Los eventos que determinan este estado también contribuirían con el desarrollo de las alteraciones genéticas responsables de la oncogénesis. (23, 24).

TÉCNICA DE HIBRIDACIÓN IN SITU TIPO CROMOGÉNICA O CISH

Es utilizada para la detección de secuencias de ácido nucleico en los tejidos, células o aberraciones cromosómicas.

Esta técnica se utiliza para determinar la presencia o ausencia de un determinado gene, amplificación genética, traslocación cromosómica o el cambio en el número de cromosomas. Consiste en medir el número de copias del gen aplicando una nueva técnica de hibridación in situ tipo cromogénica o CISH. Intentamos determinar si esta técnica es más precisa que el método de rutina inmunohistoquímico. La nueva técnica de CISH podría aplicarse como método complementario de rutina en los casos de inmunohistoquímica dudosos, ya que no supone un gran costo adicional y esto nos permitirá seleccionar mejor a las pacientes cuando las sometemos al tratamiento, en el caso del cáncer de mama.

TÉCNICA DE MICRO DISECCIÓN DE TEJIDO

Entre otras técnicas, los métodos de aislamiento de células o tejidos utilizando procedimientos de micro disección han sido de gran importancia en el desarrollo de la Patología Molecular, incentivando significativamente la participación de los anatómo-patólogos especialistas en Inmunobiopatología 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 micro disección 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 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 aplicación de técnicas de micro disección 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 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. Puede ser aplicada en un sinnúmero de tumores y abre un gran campo en la Patología Oncológica diagnóstica y terapéutica.

Biología molecular y su implicancia en la anatomía patológica actual

Prof. Agregada Dra. Ana Mariño

La Patología Molecular necesita irremediablemente de técnicas auxiliares de diagnóstico que muestren objetividad en su análisis para constituirse en una herramienta certera de apoyo a la morfología.

Basado en este principio la mayoría de los exámenes o técnicas de que se dispone se han desarrollado enfatizando los aspectos vinculados a la sensibilidad y especificidad de los métodos. En el caso de las técnicas de inmunohistoquímica hemos asistido a la automatización de las mismas en los diversos Laboratorios del mundo, disminuyendo los tiempos empleados en la lectura diagnóstica de las muestras y también con un costo beneficio mejor para los Servicios hospitalarios. A pesar de que existen diversos métodos y productos a través de los cuales pueden obtenerse resultados moleculares en referencia a las distintas enfermedades, sólo unos pocos han completado el proceso de aprobación de la Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA).

Seleccionar cual de las técnicas disponibles es la que más se ajusta a la necesidad de ese Laboratorio se basa en el principio de que es el propio Laboratorio el cual debe ajustar los protocolos y validar sus procedimientos. Cual es la técnica mas apropiada para una determinada entidad nosológica debe ser basado en el estudio minucioso de la entidad, su diagnóstico morfológico previo, el inmunofenotipo determinado de esa entidad y el conocimiento certero del rendimiento diagnóstico de la técnica molecular que seleccionamos.

La mayoría de los exámenes o técnicas de diagnóstico disponibles en Patología Molecular están destinados a determinar alteraciones cromosómicas mutacionales en Patología Oncológica, alteraciones cromosómicas familiares que permiten incursionar en el "consejo Genético" al grupo familiar y a la determinación de productos virales o microorganismos causantes de una determinada Patología. Por otra parte se ha avanzado en los estudios moleculares que permiten predecir el pronóstico y evolución de las enfermedades, fundamentalmente en Patología Oncomolecular y también en la posibilidad de evaluar respuestas terapéuticas con las denominadas terapias "blanco" o específicas así como el estudio de micrometástasis y progresión tumoral(24, 25, 26).

CONTRIBUCIÓN DE LA PATOLOGÍA MOLECULAR EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS DIVERSAS ENFERMEDADES

El cáncer es en cierta medida la consecuencia del aumento de la expectativa de vida registrado en la mayoría de las comunidades que habitan el planeta, apareciendo fundamentalmente en poblaciones por encima de la cuarta década de la vida. Al aumentar la expectativa de vida la incidencia de enfermedades cardiovasculares y oncológicas también han aumentado, lo cual hace que debamos emplear metodologías que nos permitan un diagnóstico precoz de estas enfermedades o en etapas tempranas para poder obtener su curación. Es así que los factores de riesgo de los diferentes cánceres, su biología, su genética, la predisposición poblacional a padecerlo debe incluir estrategias y diseños de prevención en esa y para esa población determinada. El mayor esfuerzo debe estar dirigido a la prevención de la Patología Oncológica estableciendo programas sanitarios eficientes y eficaces que permitan determinar grupos de riesgo y detectar la enfermedad en sus fases iniciales.

A modo de ejemplo la población japonesa tradicionalmente padeció de una alta incidencia de Cáncer gástrico, vinculado a factores ambientales, en la alimentación y tipos de alimentos consumidos. Recién en las últimas décadas se logró disminuir la mortalidad por este tipo de tumor debido fundamentalmente a programas sanitarios que incluyen el screening poblacional con detección precoz y en fase curable de la enfermedad.

En el Uruguay el cáncer de mama es el tumor maligno más común en la mama, y es la neoplasia maligna no cutánea más común en mujeres. Una mujer que viva 90 años tiene una probabilidad entre ocho de presentar un cáncer de mama. En el período entre el año 1998 y el 2003 en Uruguay se diagnosticó un promedio de 1653

casos de cáncer de mama, donde se encontró un promedio de 628 muertes por año a causa de dicha patología. Si bien la incidencia del cáncer de mama permanece estable en el Uruguay, la mortalidad ha disminuido debido a estudios que permiten una detección precoz, al control y vigilancia más frecuente que tiene la población uruguaya, todo lo cual permite detectar la patología en estados iniciales y estas etapas iniciales son curables. Debido a esto se observó que hubo una tendencia a la baja de la mortalidad de mujeres, esto fue gracias a los controles y a las nuevas modalidades terapéuticas. La frecuencia de esta enfermedad en las mujeres ha llevado a hacer estudios intensivos de los factores de riesgo de desarrollar cáncer de mama para tener claves sobre su etiología. Desde el punto de vista molecular y de acuerdo a la expresión de varias proteínas, se ha dividido al cáncer de mama en 5 subtipos: Luminal A- este subtipo expresa receptores de estrógeno, y es el subtipo más frecuente de cáncer de mama, se asocia con un mejor pronóstico y es menos agresivo que el subtipo basal o el que sobre expresa Her2/neu. Luminal B-. Los tumores del subtipo Luminal B tienen algunas características similares con los tumores que son negativos para el Receptor estrogénico, con un incremento en las mutaciones del P53, una proteína anti oncogénica. Los pacientes con patrón Luminal B tienen una sobrevida libre de enfermedad muy corta al igual que la sobrevida global. HER2/neu (sobreexpresión)- Este grupo es habitualmente resistente a la terapia endócrina y se trata a menudo con trastuzumab. Esta variante debe siempre ser correlacionada con la hibridización "in situ" fluorescente (FISH) cuando el resultado de la expresión de la proteína Her-2Neu es 2+ de acuerdo a un protocolo de interpretación de la expresión preestablecido y estandarizado. Basal-like- El subtipo Basal-like o basal mioepitelial. Estudios sobre la expresión genética de citoqueratinas, caracterizaron la expresión de genes en el grupo de cáncer de mama basal asociado con células mioepiteliales. El hallazgo clínico más significativo reveló que este subtipo es el más agresivo y con menor tiempo libre de enfermedad. Subtipo normal "breast-like tumour" definido por las similitudes de expresión con el tejido normal y lesiones benignas.

Estos subtipos varían en términos de diferentes etnias, evolución clínica, sobrevida y respuesta terapéutica. Esto sugiere que el cáncer de mama no es una única entidad sino un grupo muy heterogéneo de enfermedades manifestadas por diferencias moleculares, histopatológicas y clínicas que pueden originarse de líneas celulares diferentes o "stem cells". Los estudios genético moleculares tan útiles como FISH o Hibridización "in situ" cromogénica (CISH), son muy importantes de incorporar en la rutina diagnóstica del cáncer de mama.

La Oncología Traslacional como disciplina es joven dado que tiene alrededor de unos 10 años, sin embargo ha podido en este tiempo aportar nuevos conocimientos en Patología Oncológica, es así que ha permitido en la investigación e interacción de lo clínico básico avanzar sobre el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales identificando que grupo de pacientes responderán o no a un determinado tratamiento. Sobre fármacos concretos que actúan sobre una determinada diana sabremos si serán eficaces o no. Los avances en Patología Molecular nos han permitido estudiar la familia de los micro RNA implicados en la patogénesis del cáncer humano. Entre las dianas de los microRNA están mensajeros que codifican para diversas proteínas reguladoras del ciclo celular, angiogénesis, apoptosis, desarrollo, diferenciación celular y proteínas supresoras de tumores.

El estudio de los microRNA en cuanto a su sobreexpresión, mutación o deficiencia determinada mediante métodos moleculares permite su utilización como posibles dianas terapéuticas.

En Patología infecciosa es posible determinar mediante técnicas de Patología Molecular tales como hibridación in situ de ARN y ADN, inmunofluorescencia de tejidos la presencia de virus, bacterias, hongos.

A modo de ejemplo: Virus de hepatitis By C, adenovirus, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr y virus del papiloma humano. Existen varios archivos como el GeneTest TM con más de 700 enfermedades hereditarias y no hereditarias registradas para las cuales existe diagnóstico molecular. La secuenciación del genoma humano incrementará la lista de enfermedades en las que puede identificarse claramente los tipos de genes implicados. (30, 31, 32, 33, 34).

ENFERMEDADES ONCOLÓGICAS CON IMPLICANCIA O PREDISPOSICIÓN GENÉTICA

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, como el gen APC en la poliposis coli adenomatosa, gen RET en neoplasia endocrina múltiple tipo 2a, gen RB1 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, así como la asociación de cáncer de endometrio de tipo I o tipo II y otras neoplasias. También el estudio genético de predisposición a cáncer de riñón en determinados grupos familiares. El estudio de las mutaciones de BRAF y RAS en familias de riesgo de padecer melanoma cutáneo. En el momento actual existen dos posibles formas de estudiar este tipo de mutaciones, ya sea mediante el análisis de células o mediante la obtención de muestras tisulares, inclusive material previamente parafinado. Las muestras permiten el estudio de ADN extraído por microdissección de tejido. En varios cánceres el análisis del tumor permite identificar la inestabilidad de secuencias microsátélites de ADN, también denominada errores de replicación. (35, 36, 37, 38).

ETAPA PRECOZ Y DETECCIÓN TEMPRANA DEL 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. Estas lesiones preneoplásicas y su secuencia han sido determinadas con certeza sólo en algunas neoplasias humanas, especialmente en aquellas de origen epitelial (carcinomas). Un modelo de ello ampliamente estudiado por Nakamura y Morson es la secuencia de la lesión adenomatosa de colon y la posibilidad de evolucionar a un carcinoma. De manera que realizando la resección de las lesiones adenomatosas de cualquier tipo de colon estaríamos previniendo el desarrollo de un tipo de neoplasia de este órgano. La secuencia displasia-carcinoma ha sido ampliamente estudiada e investigada también en otros órganos como el pulmón, orofaringe, sinusal, cérvix y tracto urinario. También las lesiones precursoras del cáncer presentan alteraciones genéticas demostradas y la gran mayoría de ellas presenta rutas genéticas alteradas muy similares a la de los tumores desarrollados a los que dan origen. 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. En cáncer de colon, los adenomas tienen una alta frecuencia de mutaciones del codón 12 del gen K-RAS. Las mutaciones del gen TP53 que se detectan en las displasias en el esófago de Barrett, la lesión precursora del

adenocarcinoma de esófago, sería la misma que la detectada en los tumores adyacentes. En el caso de lesiones melanicas es imperante determinar las mutaciones de BRAF y también en algunas lesiones dérmicas dependiendo de la topografía de las mismas la mutación de c-Kit. En el carcinoma escamoso del pulmón, la alteración se iniciaría con pequeñas deleciones del cromosoma 3p y del cromosoma 9p en lesiones epiteliales con alteraciones mínimas, seguidas de deleciones del cromosoma 8p, para posteriormente en las displasias acumularse otras deleciones cromosomales y mutación del gen TP53. En cáncer de colon la secuencia sería iniciada por inactivación del gen APC, seguida por mutación del gen K-RAS, inactivación de los genes DCC y TP53. (39, 40, 41). Si bien estos estudios se realizan en muestras congeladas de Banco también puede ser extraído el ADN, ARN y posteriormente estudio de PCR en muestras parafinadas que previamente fueron fijadas en formalina. (42, 43). En tumores hematológicos también se emplean estas técnicas con éxito tanto en Linfomas como en Leucemias. La secuenciación genética es muy importante en algunos linfomas como el Linfoma de Burkitt, el Linfoma Difuso a grandes células B, los linfomas foliculares, el linfoma del manto y el linfoma MALT. Si bien han sido descritas las denominadas firmas genéticas en estos tipos de Linfomas, es importante saber que hay Linfomas como el Linfoma de Burkitt y el Difuso a grandes células B en los cuales existe una zona gris tanto desde el punto de vista morfológico, fenotípico y genético. Esta zona gris hace que en algunos casos sea imposible aún diferenciarlos dado que inclusive desde el punto de vista genético presentan superposición de anomalías idénticas en más 65 genes. También este tipo de dificultad diagnóstica persiste en muchas neoplasias hematológicas y no hematológicas pues hay varios cánceres humanos que presentan las mismas mutaciones genéticas.

También es importante el estudio genético en Enfermedades policlonales que simulan neoplasias hematológicas y que no han podido ser diagnosticadas mediante el inmunofenotipo. Existe una variedad de enfermedades denominadas "borderline" donde solo el estudio genético puede realizar un diagnóstico de certeza, teniendo en cuenta que en ocasiones ni siquiera el estudio de secuenciación permite arribar al diagnóstico preciso. Muchas veces continúa siendo la evolución de la enfermedad y la falta de respuesta terapéutica lo que indica al Clínico la biología de la dolencia. Las traslocaciones cromosómicas en los linfomas foliculares en vinculación a la apoptosis debido a la ulación anómala del gen BCL-2 podría en cierta medida explicar su resistencia a la quimioterapia en algunos casos. También el estudio de traslocaciones permite evaluar la presencia de enfermedad mínima residual de algunas neoplasias hematológicas, lo cual no es detectable por los métodos utilizados en la Patología convencional permitiendo

de esta manera establecer un pronóstico evolutivo y una respuesta terapéutica acorde. (44, 45).

DETERMINACIÓN DEL PRONÓSTICO Y "CONSEJO GENÉTICO EN CÁNCER HUMANO"

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. Es por todo ello que el "consejo genético" en cáncer y la información de la metodología disponible debe ser realizado por especialistas que conozcan claramente el alcance de cada uno de los métodos a emplear, no creando falsas expectativas en los pacientes y en su familia. La búsqueda de nuevos biomarcadores moleculares predictivos de respuesta terapéutica se hace pues fundamental para mejorar el tratamiento del cáncer tanto en los pacientes portadores de tumores malignos en este siglo como en el futuro teniendo presente que el cáncer es la enfermedad de este siglo y que aproximadamente una de cada tres personas sanas padecerá un cáncer durante el transcurso de su vida.

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 la Anatomía Patológica y en especial en la Patología Oncomolecular. La búsqueda de nuevos biomarcadores moleculares con implicancias pronósticas y terapéuticas es un desafío diario para los especialistas e investigadores en el mundo.

Este impacto tan acelerado de la tecnología e interpretación en Patología Molecular debe acompañarse de la capacitación de los Médicos Anatomopatólogos en los principios y técnicas de la biología molecular constituyéndose en un nuevo campo de desarrollo de la especialidad lo cual implica la formación de recursos humanos específicos en esta área. El Patólogo debe además sumar colaboradores

de otras áreas integrándose a los equipos diagnósticos moleculares, Biólogos Moleculares, áreas vinculadas a la Química, a la genética y a las Ciencias Biológicas.

La Inmunobiopatología es considerada una disciplina aparte con nuevos desafíos en el campo diagnóstico, pronóstico y terapéutico de la Patología posibilitando el incremento de la investigación científica.

Diagnóstico Molecular

Prof. Dr. Cristovam Scapulatempo Neto

La Anatomía Patológica y el estudio de los tejidos de diferentes maneras comienza desde épocas remotas, sin embargo fueron estos autores que mencionamos a continuación quienes jerarquizan la disciplina e introducen y reconocen la Patología Molecular como una disciplina aparte que debe ser ejercida por especialistas en la misma.

Esto abre un campo de desarrollo impensable al Médico Anatómo Patólogo dado que es el único especialista capaz de analizar el tejido alterado en la histología y reconocer la lesión. Es por ello que la lectura de las diversas técnicas que componen la Patología Molecular deben ser leídas por Médicos Patólogos. Estos Patólogos deben capacitarse activamente en las Bases Moleculares de las Enfermedades y conocer a la perfección las diversas técnicas y estudios que hoy disponemos para el avance de la disciplina.

Sin embargo en el campo Molecular es imprescindible la asociación con otros especialistas como Biólogos, Químicos y Bioquímicos para poder ampliar el conocimiento y el espectro de las Técnicas Moleculares.

Es así que en primer lugar Giamovanni Battista Morgagni (1761), Fundador de la Anatomía Patológica moderna estudia sobre las topografías y las causas de las Enfermedades, describiendo la forma en que los pacientes mueren a través de la necropsia.

El reconocido Rudolf Virchow, padre de la Patología celular solidificó la teoría de la Patología celular con el concepto de que *todas las células provienen de células aportando inclusive hoy las bases para la patología regenerativa*. A modo de ejemplo, leucocitosis, leucemia.

Anatomía Patológica en Oncología

Desde tiempos remotos las Enfermedades deben por protocolo ser clasificadas en primer lugar siguiendo las Clasificaciones Internacionales como la utilizada por la mayoría de los Patólogos en el mundo la de la WHO lo cual permite manejar la misma terminología, en segundo lugar debemos siempre gradar la enfermedad, atender la presencia o ausencia de infiltración angiolinfática y perineural por los tumores y la extensión de estas neoplasia teniendo en cuenta el TNM, donde T es tumor, N ganglios linfáticos y M metástasis. Basados en estos parámetros podemos establecer un pronóstico, una efectividad en la Terapéutica quirúrgica y en alguna otra orientación terapéutica complementaria.

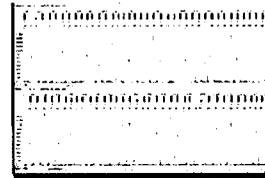
El diagnóstico Molecular es un nuevo paradigma en el diagnóstico del cáncer lo cual hace imprescindible la creación de Servicios de Patología Molecular.



1. Diagnóstico clínico



2. Diagnóstico Morfológico



3. Diagnóstico Molecular

¿Por qué la necesidad de crear Servicios de Patología Molecular con cometidos académicos, investigativos y asistenciales?

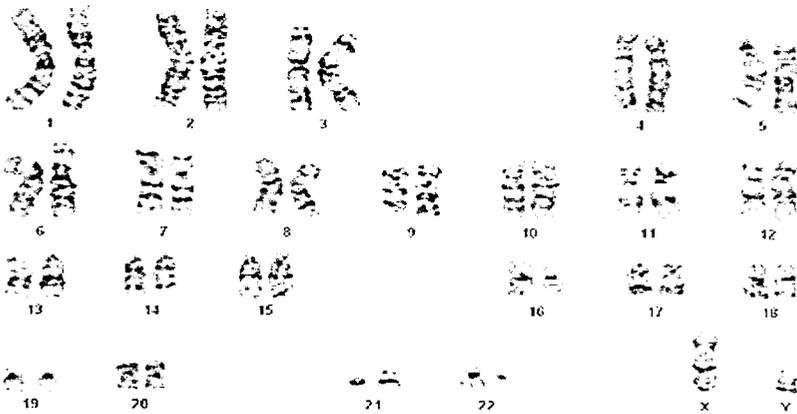
- Para clasificar adecuadamente las neoplasias.
- Para establecer factores pronósticos.
- Para validación de factores predictivos de respuesta a determinados fármacos. Es así que el estudio combinado de la morfología, citogenética y oncogenética permite terapéuticas más racionales y personalizadas.

Citogenética

Oncogenética

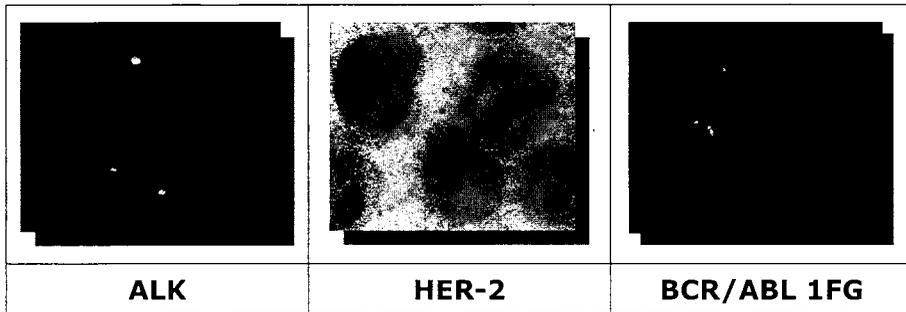
**Medicina
Personalizada**

La citogenética permite el estudio del cariotipo convencional y así identificar las anomalías cromosómicas que son características de leucemias, linfomas y tumores sólidos.



Citogenética Molecular – FISH y CISH

Las técnicas de Hibridación in situ Fluorescente y la de Hibridación in situ cromogénica son dos técnicas Moleculares altamente sensibles y específicas en el diagnóstico, pronóstico y como ayuda en la elección terapéutica de Tumores sólidos y neoplasias hematológicas. (46. 47, 48).



Con la técnica de FISH podemos identificar las alteraciones cromosómicas en los diferentes tumores como por ejemplo:

Sarcoma de Ewing a través de las siguientes mutaciones cromosómicas encontradas:

EWSR1 – EWS gene breakpoint region 1
 BREAK APART PROBES
 EWS/Fli1: 85%
 EWS/ERG-1: 10%
 EWS/ETV-1
 EWS/FEV
 EWS/E1AF

Tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas

EWS/WT-1

Rabdomiosarcoma alveolar

FKHREWSR1 –

Sarcoma de células claras

EWS gene breakpoint region 1

Sarcoma Sinovial t(X: 18)

SS18

SYT-SSX1

SYT-SSX2

FISH DUAL FUSION PROBES

IgH/MYC	Linfoma de Burkitt
IgH/Bcl-2	Linfoma folicular
IgH/CCND1	Linfoma de células do manto
IgH/MALT1	Linfoma MALT

Diagnóstico Molecular en Enfermedades Hereditarias o Síndromes asociados a Cáncer. El Servicio de Patología Molecular del Hospital Barretos cuenta con la posibilidad de estudiar las diferentes entidades Oncológicas que a continuación mencionamos.

1. Síndrome de predisposição para cáncer de mama y de ovário. Screening de mutaciones puntuales y grandes delecciones en los genes BRCA1 e BRCA2

2. Poliposis Adenomatosa Familiar (APC). Screening de mutaciones puntuales comprometendo los genes APC.

3. Síndrome de Lynch ou HNPCC. Estudio por IHQ e MSI y screening de mutaciones comprometendo los genes MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2.

4. Síndrome Li-Fraumeni. Screening de mutaciones puntuales comprometendo el gen TP53

5. Cáncer Gástrico difuso Hereditário. Screening de mutaciones puntuales comprometendo el gen CDH1

6. Diagnóstico Molecular para Decisiones Terapéuticas Screening de hotspot mutacional em el gen KRAS (Panitumumab and Cetuximab response) y status de MSI (5-FU response)

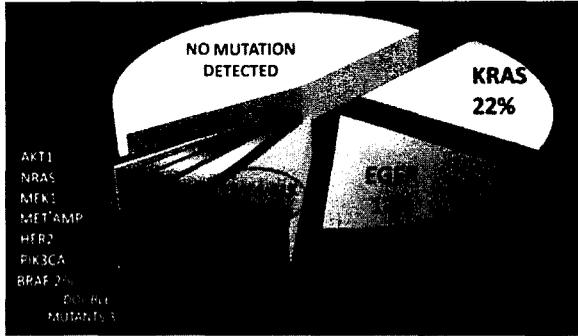
7. KRAS (códon 12 e 13): mutado en 30-40% de los Carcinomas colorrectales CCR

8. Cáncer de Pulmón – No Células Pequeñas. Screening de hotspot mutations de los genes EGFR e KRAS (Erlotinib, Gefitinib)

EGFR: exóns 18, 19, 20 e 21.

ADENOCARCINOMA DE PULMÓN

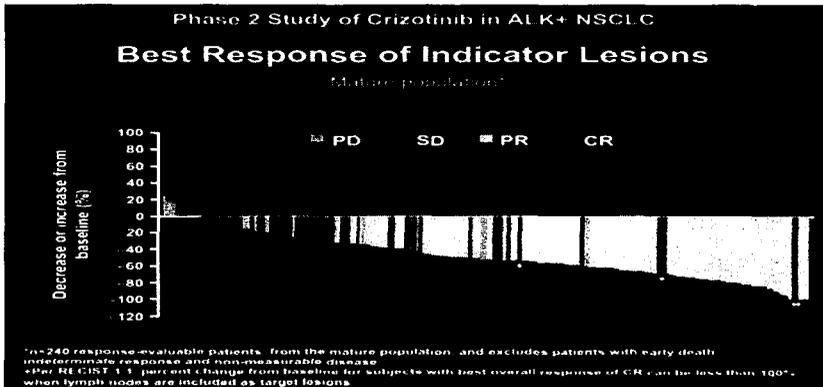
Estudio molecular disponible para: ALK-EGFR

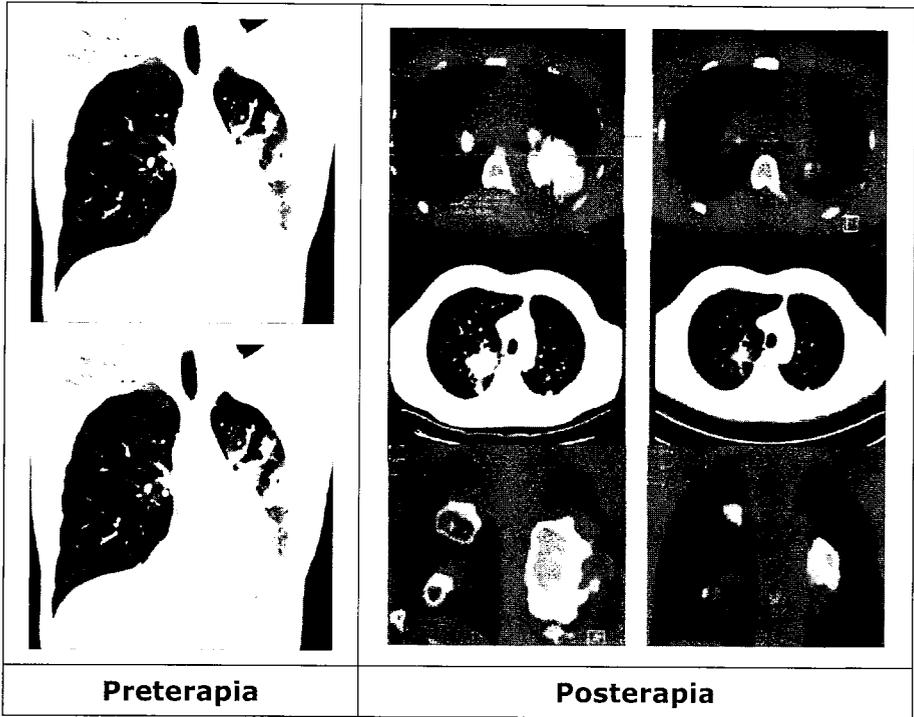


Crizotinib:

Potente y selectivo inhibidor competitivo oral de MET e ALK quinasas y sus variantes oncogénicas.

Crizotinib:





CRIZOTINIB: Inhibidor Tirosin quinasa con muy buena respuesta terapéutica.

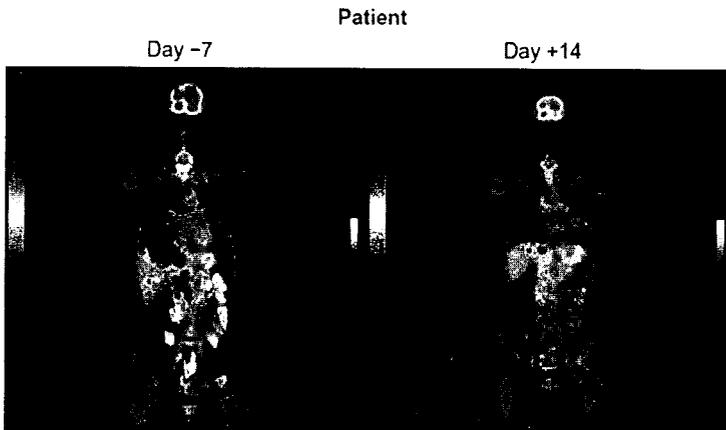


Fig. 3 Dramatic response to crizotinib in a ALK-rearranged NSCLC patient.

EGFR: FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB-1 o HER1 en el ser humano) es el receptor de la superficie de la célula de los miembros de la familia del factor de crecimiento epidérmico (familia EGF) de los ligandos de las proteínas extracelulares. El factor de crecimiento epidérmico es un miembro de la familia de receptores ErbB, una subfamilia relacionada con los receptores tirosino-quinasa: EGFR (ErbB-1), HER2/c-neu (ErbB-2), Her 3 (ErbB-3) y Her 4 (ErbB-4). Las mutaciones que afectan a la eEl EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) se encuentra en la superficie celular y se activa mediante la unión de sus ligandos específicos, incluyendo el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento transformante alfa (TGF α). El ErbB2 no tiene ningún ligando de activación directo conocido, y puede estar en un estado activado constitutivamente o hacerse activo mediante heterodimerización con otros miembros de la familia como el EGFR. (49)

Tras la activación del factor de crecimiento por sus ligandos, el EGFR sufre una transición de una forma monomérica inactiva a una forma homodimérica activa - aunque hay algunas pruebas que demuestran que los dímeros inactivos pre-formados también pueden existir antes de la unión del ligando. Además de la formación de homodímeros después de la unión del ligando, el EGFR puede unirse a otro miembro de la familia de receptores ErbB, como el ErbB2/Her2/neu, para crear un heterodímero activado. También hay pruebas que sugieren que se forman grupos de EGFRs activados, aunque no está claro si esta agrupación es importante para activarse por sí sola o si ocurre como consecuencia de la activación de los dímeros individuales. (50).

La dimerización del EGFR estimula la actividad intrínseca de la proteína intracelular tirosina quinasa. Como resultado, en el dominio C-terminal del EGFR se produce la auto-fosforilación de varios residuos de tirosina (Y), como Y992, Y1045, Y1068, Y1148 y Y1173. Esta auto-fosforilación provoca la activación en cascada y la señalización por varias otras proteínas que se asocian con las tirosinas fosforiladas mediante la unión en los dominios SH2 de la fosfotirosina. (51, 52, 53, 54). Estas proteínas de señalización inician cascadas de transducción de varias señales, principalmente la MAPK, AKT y las vías de JNK, que conducen a la síntesis de ADN y a la proliferación celular. Estas proteínas modulan fenotipos tales como la migración celular, la adhesión y proliferación. La activación del receptor es importante para la respuesta inmune innata en la piel humana. El dominio de la quinasa del EGFR también puede cruzar residuos de tirosina fosforilada de otros receptores con los que está unido, y puede activarse de esta manera.

Sobreexpresado en el 40-80% de EGFR en tejidos tumorales de pacientes con NSCLC. (55, 56, 57).

Correlacionado con un pobre pronóstico.

SATURN: PFS Stratified by Biomarker Status

Biomarker Status	Median PFS, wk		P
	Erlotinib	Placebo	
EGFR IHC+	12.3	11.1	<.0001
EGFR IHC-	11.0	9.0	.1768
EGFR mutation	44.6	13.0	<.0001
EGFR wild-type	12.0	8.9	.0185
KRAS mutation	9.3	6.3	.2246
KRAS wild-type	12.3	11.4	.0009

Brugger . et al. *J Clin Onc.* 2011;29:4113-4120.

Contexto actual mundial en el abordaje de cáncer de pulmón

Luego del diagnóstico de Adenocarcinoma pulmonar a través del estudio histomorfológico utilizando la Clasificación y los estadios de acuerdo a la WHO debemos realizar la inmunohistoquímica y técnicas de FISH para información terapéutica.

NEOPLASIAS BRONCOPUMONARES Y PEURA

- CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES PULMONARES
- CARCINOMA BRONCÓGENO
 - CARCINOMA EPIDERMOIDE
 - ADENOCARCINOMA
- CARCINOMA BRONQUILO-ALVEOLAR
 - CARCINOMA ANAPLÁSICO
 - CARCINOMA MICROCÍTICO U OAT-CELL
- MESOTELIOMA

DIAGNÓSTICO DE TIPO HISTOLÓGICO EN BIOPSIAS PEQUEÑAS

2: Inmunohistoquímica

- Carcinoma escamoso: P63, CK 5-6, CK 34BE12, desmolina positivas
- Adenocarcinoma: CK7, TTF1, napsina A, proteína de surfactante positivas
- CK 20 en algunos ADC mucosecretorios
- Si tenemos muy poco material: panel pequeño: TTF1-P63

CARCINOMA BRONCÓGENO: Clasificación (OMS)

C. PULMONAR NO MICROCÍTICO (CPNM): 70-75%

- Carcinoma Epidermoide: 25-30%
- Adenocarcinoma: 30-35% (Incluido el C. Bronquiolo)
- Carcinoma de Células Grandes: 10-15%

C. PULMONAR MICROCÍTICO (CPM): 20-25%

PATRONES COMBINADOS: 5-10%

- C. Epidermoide + Adenocarcinoma

Una vez concluido el diagnóstico de tipo histológico de carcinoma pulmonar el paciente debe ser referido al Oncólogo para iniciar la terapéutica con TKIs (Erlotinib/Gefitinib)

El pre-requisito es el hallazgo de mutaciones en los exones 18, 19, 20 e 21 del gen EGFR y en KRAS 12/13 por secuenciamento directo. Debe buscarse el test más sensible, con el menor costo y menor tiempo posible para la rutina diagnóstica.

Linfoma del manto

Prof. Dr. Roberto Pinto Paes

El linfoma del manto (LM) es un linfoma no Hodgkin (LNH) de células B, de agresividad intermedia, que representa el 7-8% de todos los LNH del adulto en Estados Unidos y Europa (1). Se trata de una neoplasia incurable, con una mediana de supervivencia global de unos 3 años, con una supervivencia libre de enfermedad de aproximadamente un año con los tratamientos convencionales. Una variante rara del LM es la blastoide que en algunos estudios parece tener un comportamiento más agresivo, con una mediana de supervivencia de unos 18 meses.

Es una enfermedad propia de personas mayores, con una marcada predominancia en el sexo masculino (75% de los pacientes son varones). La mayoría de los pacientes (en un 70% de los casos) presentan en el momento del diagnóstico estadio IV, con afectación de diversos órganos como los ganglios linfáticos, bazo, anillo de Waldayer, médula ósea e incluso estructuras extraganglionares como el tracto gastrointestinal, dando lugar a la poliposis linfomatoidea. (58, 59, 60).

ANATOMÍA PATOLÓGICA

Se trata de una neoplasia de células neoplásicas monomorfas de fenotipo B y de talla pequeña o intermedia, de núcleo irregular, que remedan los centrocitos foliculares. Las células neoplásicas proceden

de la zona del manto de los folículos linfoides. Desde el punto de vista histopatológico puede presentar un patrón de crecimiento difuso (lo más frecuente), nodular, mixto o bien un crecimiento limitado a la zona del manto folicular (en este último caso indica mejor pronóstico, con un curso clínico indolente). Está formado por células linfoides monomorfas de talla pequeña y/o intermedia, con núcleo irregular o hendido (remedan los centrocitos), y con ausencia o escasez de células grandes transformadas de tipo inmunoblasto o centroblasto. El índice mitótico puede ser elevado. En algunos casos existe una variante de LM, denominado blastoide, que suele presentar diversas alteraciones genéticas que le confiere un curso clínico más agresivo. (61, 62).

TABLA I

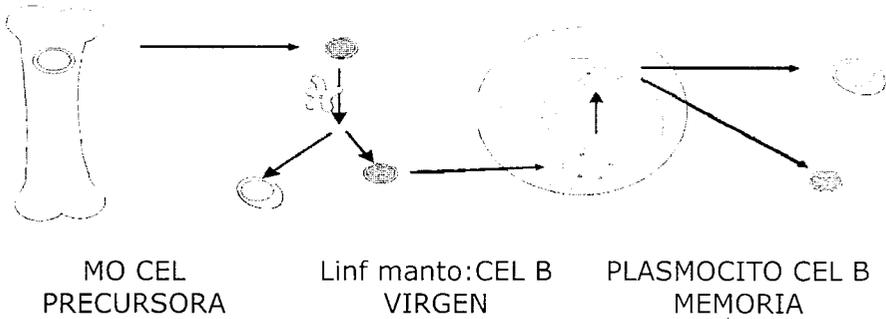
INMUNOFENOTIPO DE LAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS DEL LINFOMA DEL MANTO

Antígeno común leucocitario o CD45 +
Antígenos de la clase B (CD19/20/22/79a) +
CD5 +
CD10 -
CD 23 -
Inmunoglobulinas de superficie (Ig M/D, con restricción de cadenas Lambda) +
Ciclina D1 intranuclear + (clave para el diagnóstico)

ALTERACIONES GENÉTICAS

La alteración genética característica del LM es la presencia de la traslocación t(11;14) (q13;q32), que da lugar a una sobreexpresión del gen de la ciclina D1, que es una proteína reguladora clave del ciclo celular. El LM es una neoplasia de células B, puesto que presenta un reordenamiento monoclonal de los genes de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (PCR IgH+). La ausencia de mutaciones hipersomáticas de los genes de las regiones variables de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (IgHV), indican que el origen de las células del LM son pre-centrogerminal. El LM presenta un curso

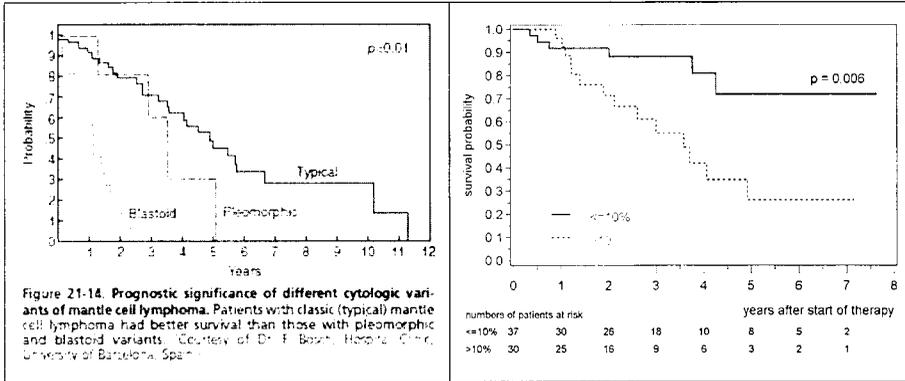
moderadamente agresivo con una mediana de supervivencia global de unos 36 meses, aunque la variante blastoide suele presentar un curso clínico más agresivo con una mediana de supervivencia de 18 meses. Tiene a infiltrar la MO y el BAZO.



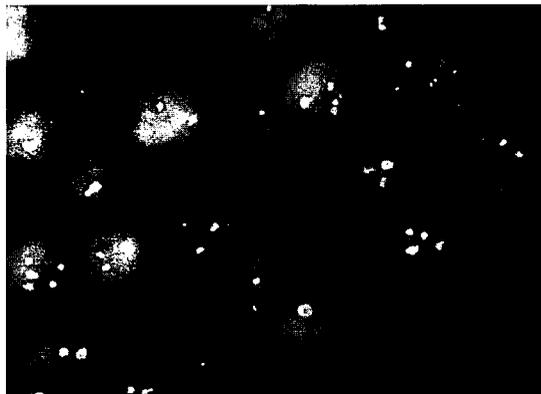
LM clásico	LM pleomorfo
LM de células pequeñas	LM blástico

Fotos: Dr. Wolfran Klaper, de *Kiel*.

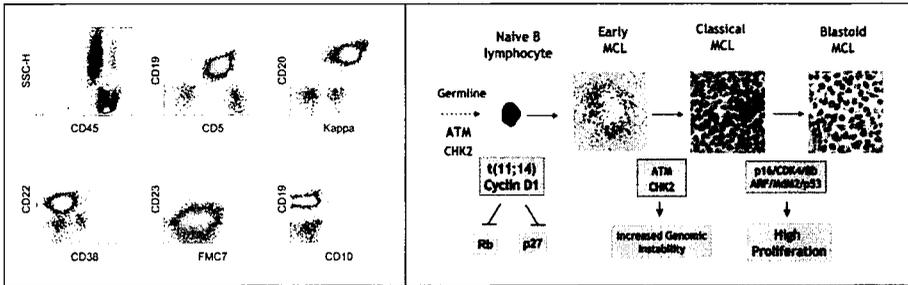
LINFOMA DEL MANTO SOBREVIDA



<p>Histología del LM</p>	<p>TRASLOCACIÓN t(11;14) en LM</p>



Técnica de FISH t(11;14)



CITOMETRIA DE FLUJO EN LINFOMA DE CÉLULAS DE MANTO

Schematic evolution of mantle cell lymphoma (Jares et al): - Inactivation of DNA damage pathways from ATM mutations may lead to genetic instability and risk of secondary genetic events. Rare cases of "in situ" MCL have been recognized (Aqel 2008).

TRATAMIENTO EN EL LINFOMA DEL MANTO

El LM es una neoplasia incurable, aunque en las últimas dos décadas ha habido algunos avances en su tratamiento como la inclusión de nuevos esquemas de poliquimioterapia, la inclusión del anticuerpo monoclonal anti-CD20 (rituximab) e incluso los trasplantes de médula ósea autólogo y alogénico tras quimioterapias de alta dosis como el esquema BEAM.

ESTADIOS LOCALIZADOS (ESTADIOS I Y II)

Los LM en estadios localizados son infrecuentes, y el tratamiento más óptimo para estos pacientes es desconocido. En estos raros casos existen dos posibilidades terapéuticas, sin que exista ningún ensayo clínico aleatorizado fase III que haya comparado la eficacia de estas dos opciones terapéuticas:

1. Radioterapia de campo afecto. Consiste en la utilización exclusiva de radioterapia externa, sin la adición de ningún fármaco quimioterápico.

2. Quimioterapia abreviada seguida de radioterapia de campo afecto. En esta opción combinada, se inicia por 3-4 ciclos de poliquimioterapia, por lo general con esquema R-CHOP (rituximab, ciclofos-

famida, vincristina, adriamicina y prednisona), para continuar con la radioterapia externa de campo afecto.

ESTADIOS AVANZADOS (ESTADIOS III Y IV)

La mayoría de los pacientes presentan estadios diseminados en el momento del diagnóstico. El tratamiento de los LM avanzados es también controvertido. Los pacientes con LM avanzado debería clasificarse en dos grandes grupos

1. No candidatos al trasplante de médula ósea autólogo: Se trata de la mayoría de los pacientes con LM avanzado, con una edad mayor de 65 años y/o presencia de comorbilidad severa que contraindique el trasplante de médula ósea. En estos pacientes la única opción de tratamiento son los regímenes de poliquimioterapia que incluyan el anticuerpo monoclonal anti-CD20 (rituximab).

2. Candidatos al trasplante autólogo de médula ósea: los pacientes candidatos al trasplante son pacientes jóvenes (menores de 65 años), con buen estado general (PS menor de 2) y ausencia de comorbilidad importante.

TRATAMIENTO DE LAS RECIDIVAS

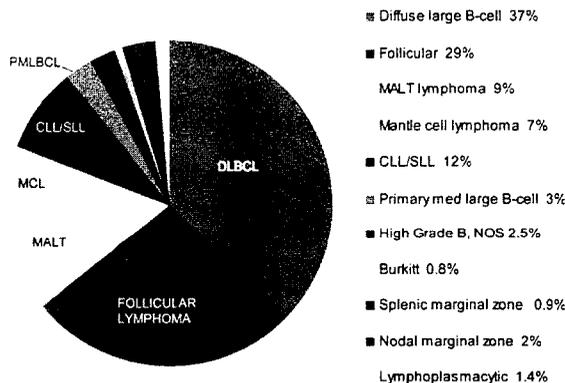
En los casos de los pacientes no candidatos al trasplante de médula ósea se puede emplear una segunda línea de tratamiento con otro esquema de poliquimioterapia diferente al empleado en primera línea.

Aportes de la Citometría de Flujo en el Diagnóstico de los Linfomas del Manto y sus diagnósticos diferenciales

Prof. Agregada Dra. Daniela Lens

Linfoma de célula B compuesto por células linfoides de pequeño a mediano tamaño y núcleo irregular, característica: traslocación del CCND1 a IgH - t(11, 14)

Linfomas representados según su frecuencia



Situación actual de inmunofenotipaje en Síndromes Linfoproliferativos (SLP) mediante citometría de flujo.

El Inmunofenotipo es esencial para el diagnóstico de las neoplasias linfoides. (63, 64, 65, 66).

Los patrones de expresión de antígenos han contribuido sustancialmente a la clasificación WHO

Dado la disponibilidad de la Citometría de Flujo, actualmente en la mayoría de estos desórdenes se tiene la información de Sangre Periférica o MO antes que se proceda a la biopsia del tejido.

OBJETIVOS DEL INMUNOFENOTIPO EN SLP

1. determinar la estirpe B, T o NK de la proliferación linfocítica
2. diferenciarlos de procesos reactivos: CLONALIDAD
3. distinguir entre SLP "maduros" o inmaduros
4. reconocer subgrupos distintos
5. caracterizar entidades clínico-patológicas definidas
6. determinar factores pronósticos

Muestras utilizables para el diagnóstico

1. Sangre y MO.
2. Líquidos biológicos: LCR, líquidos de cavidades serosas
3. Tejido: Ganglio, Bazo, Hígado, Tiroides, etc
4. PAAF

Diagnóstico esquemático en Enfermedades Hematológicas

Clinical symptoms
and signs

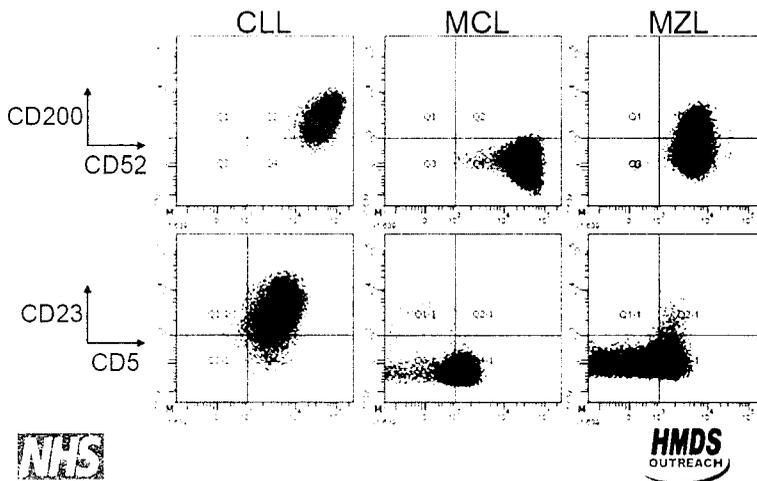
Laboratory
findings

Morphology + cytochemistry

Immunophenotyping

FIGURE 1. CLONALITY

CD5+ B-cell disorders: options for differential diagnosis



El modelo euroflow

Ha permitido y permite:

Utilización de un mayor número de parámetros (10) y nuevos softwares de análisis.

Generación de nuevos anticuerpos

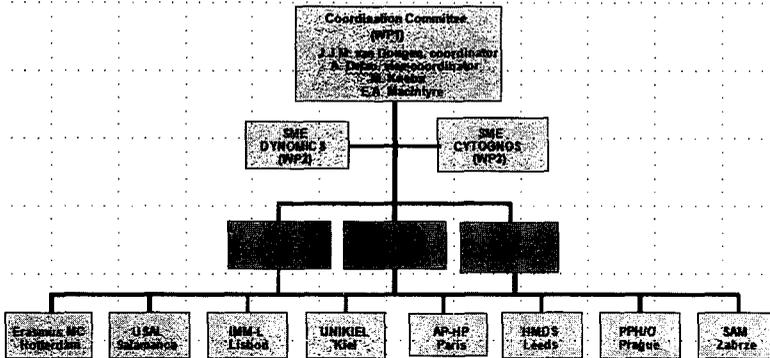
Protocolización total de la técnica por 7 países europeos

Generación de bancos de datos que nos permite comparar el resultado de los pacientes contra los de las diferentes entidades y nos dice a qué entidad se asemeja más y el rango de error diagnóstico estadístico.

La CF estandarizada y validada:

La CF estandarizada y validada:
un ejemplo

Euroflow Consortium



Euroflow Consortium
Flow cytometry for fast and sensitive diagnosis

**EuroFlow B-CLPD panel:
summary and perspectives**

- B-CLPD panel allows unequivocal classification of most mature B-cell malignancies according to WHO classification
- All differential diagnoses achieved efficiently except for the following 1 vs 1 comparisons:
 - FL vs DLBC
 - MZL vs LPL
 - LPL vs DLBCL
 - MZL vs DLBCL

By S. Böttcher

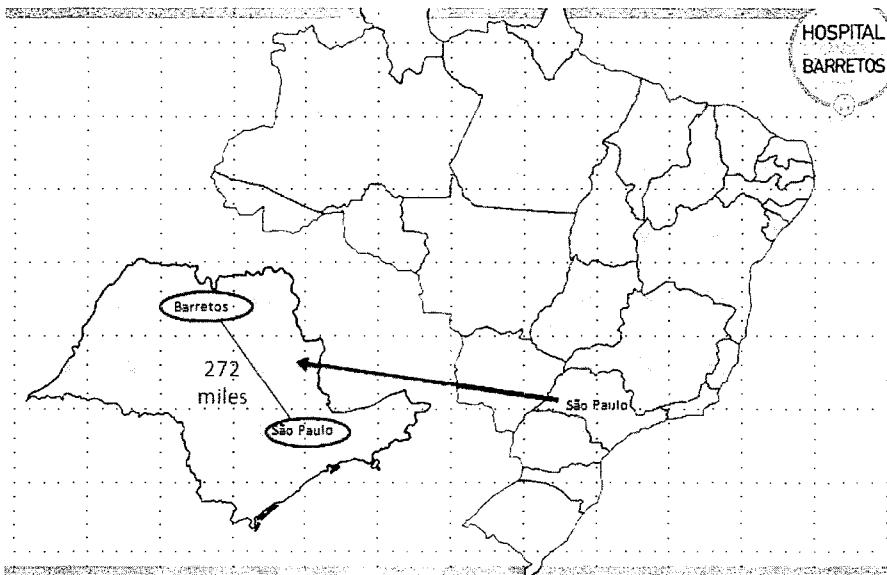


CONCLUSIÓN

La citometría de flujo multiparamétrica permitirá diagnosticar los linfomas del manto con alta sensibilidad y especificidad (67).

Screening en Cáncer Cervical: Nueva Era Nuevos Paradigmas

*Prof. Adhemar Longatto-Filho, PhD.
Scientific Researcher –
Laboratory of Mecial Investigation (LIM)
Faculty of Medicine University of São Paulo.*



Puntos importantes que han implicado una reducción efectiva del
cáncer cervical en Brasil:

Determinación política de vigilancia.

Organización instrumental de puestos.

Sistema de trazabilidad.

Adiestramiento y enseñanza a profesionales de la salud.

Adecuada remuneración por los test seleccionados.

Reproducibilidad de los test utilizados. Cáncer cervical-Tipos Histológicos(WHO-FIGO).

El tipo histológico más frecuente es el carcinoma epidermoide (90%), seguido a distancia por el adenocarcinoma (10%). A continuación se enumeran los tipos histológicos conocidos.

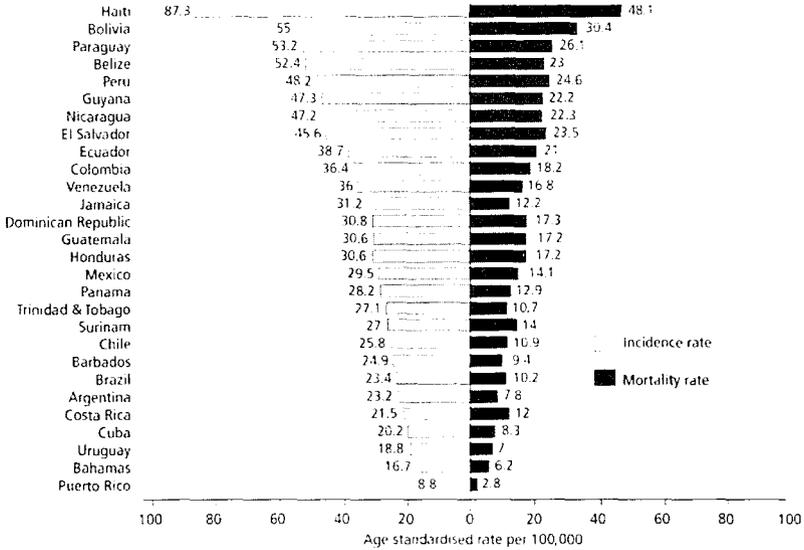
- Tumores epiteliales
- Carcinoma epidermoide (90%), - No queratinizante de células grandes, - Queratinizante de células grandes, - De células pequeñas
- Verrucoso Adenocarcinoma (<10%)
- Mucinoso, -Papilar, - Endometroide, - De células claras, - Adenoide quístico, - Carcinoma adenoescamoso
- Carcinoma de células pediculadas
- Tumores mesenquimales.
- Muy raros, - Sarcoma del estroma endocervical, - Carcinocarcinoma
- Adenosarcoma, - Leiomiosarcoma, - Rabdomiosarcoma embrionario, -Tumores del conducto de Gartner
- Neuroendocrinos (microcítico), - Otros: - Metastásicos, - Linfomas, - Melanomas, - Carcinoide

El cáncer de cuello uterino constituye la primera causa de muerte por cáncer en el mundo, con una incidencia de medio millón de casos al año; incidencia que varía en los distintos grupos poblacionales, pero cuya mayor mortalidad radica en los países en vías de desarrollo, en donde la conjunción de factores sociales, políticos, culturales y económicos, sumado al inadecuado registro y desconocimiento de la enfermedad, le han convertido en un problema de salud pública. (68, 69, 70). En la actualidad la biología molecular y la genética del cáncer hacen parte primordial de las herramientas de vanguardia

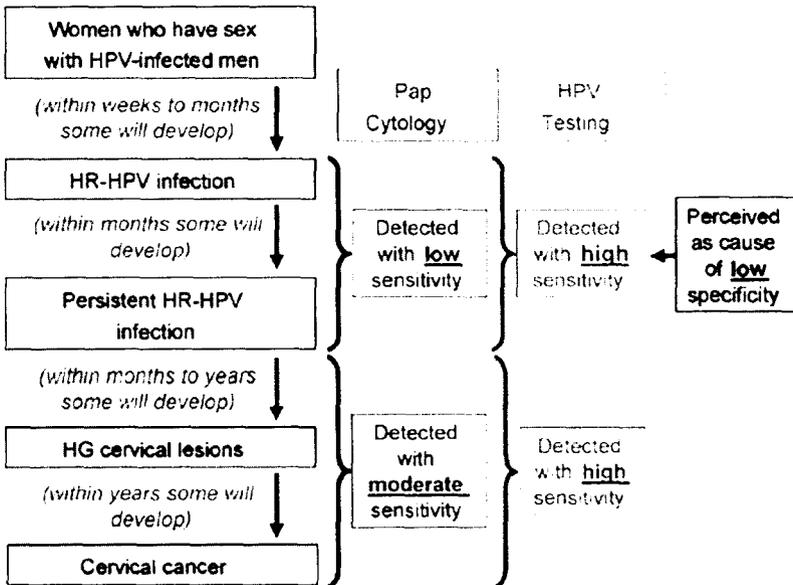
para combatir este flagelo. Sólo el conocimiento y la investigación de los mecanismos implicados en la carcinogénesis asociada al virus del papiloma humano (VPH) han de generar mejores herramientas diagnósticas, al tiempo que brindarán nuevos blancos para la intervención terapéutica oportuna. Se define ciclo celular como el lapso de tiempo comprendido entre dos divisiones mitóticas (interfase), compuesto por los períodos G0 (punto de quiescencia del ciclo celular); G1 (síntesis de ácido ribonucleico y proteínas); S (síntesis y replicación del ácido desoxiribonucleico), y G2 (período de transición de la fase S al inicio de la mitosis). La proliferación celular es estrictamente regulada por un delicado balance entre señales activadoras e inhibitorias, papel desempeñado por la interacción de proteínas como las ciclinas, las quinasas dependientes de ciclinas (CDK por sus siglas en inglés) y los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas (CDKI). Las CDK no son activas en forma autónoma, sino que requieren su asociación a subunidades reguladoras (ciclinas) como paso inicial para la activación del ciclo celular; subunidades reguladoras que poseen la característica de ser cíclicamente sintetizadas y destruidas por actividad proteolítica (de ahí su nombre). En contraparte, el control negativo sobre el ciclo celular es ejercido por los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas (CDKI); la expresión de estos inhibidores es mediada por la activación de genes supresores tumorales (p53 y pRb) en los puntos de control del ciclo celular, encargados de detenerlo en caso de existir una falla. Así pues, el proceso de transformación tumoral de una célula, es el resultado del compromiso en los mecanismos reguladores del ciclo celular, ya sea de forma congénita o adquirida, determinando la aparición de un clon celular inmortal, en continua transformación y con capacidad metastásica. El VPH es un virus ADN de doble cadena circular, con cápside icosaédrica, fuertemente ligado como factor causal del cáncer de cérvix con fundamento en evidencia epidemiológica y soporte biológico plausible. Existen más de 80 tipos distintos de VPH, de los cuales, al menos 25 afectan al tracto genital femenino y, de acuerdo a su asociación con lesiones preinvasivas y cáncer, se agrupan en: alto (tipos 16, 18, 45, 56), moderado (tipos 31, 33, 35, 51, 52) y bajo riesgo (tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44), siendo el VPH 16 el responsable hasta en el 50% de todos los cánceres cervicales. El genoma del VPH posee 8000bp de longitud y codifica ocho regiones de lectura abierta (ORF por sus siglas en inglés) que regulan la síntesis de proteínas tempranas (E1, E2, E5, E6, E7) y tardías (L1, L2) de acuerdo a su expresión durante el ciclo de vida viral (68, 69, 70, 71).

INCIDENCIA Y MORTALIDAD POR CÁNCER CERVICAL EN LATINOAMÉRICA

Figure 1. Cervical cancer age-standardised incidence and mortality rates in Latin America and the Caribbean, 2002²



DETERMINANTES EN LA INFECCIÓN POR HPV HUMANO

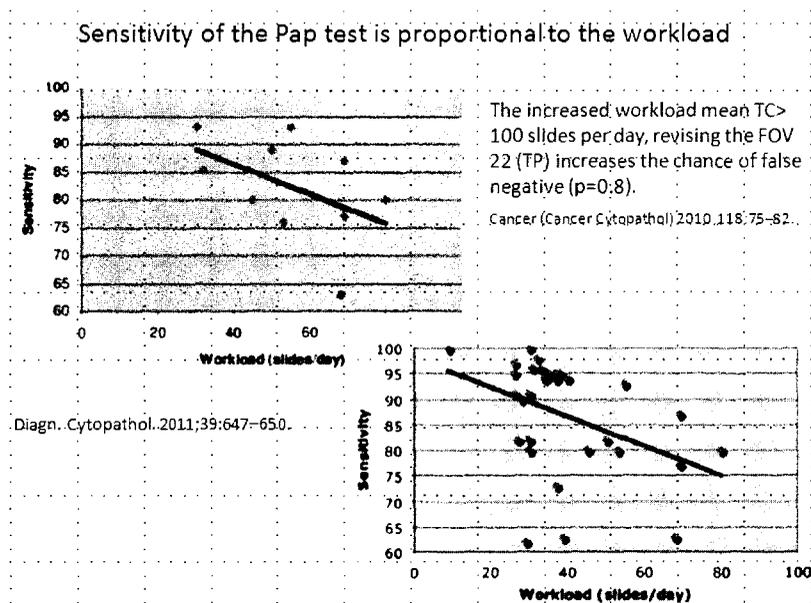


El screening luego de la vacunación debe seguir siendo realizada, la vacuna protege solo de las cepas HPV's 16 y 18 que son las responsables de causar carcinoma en alrededor del 75%. (71, 72).

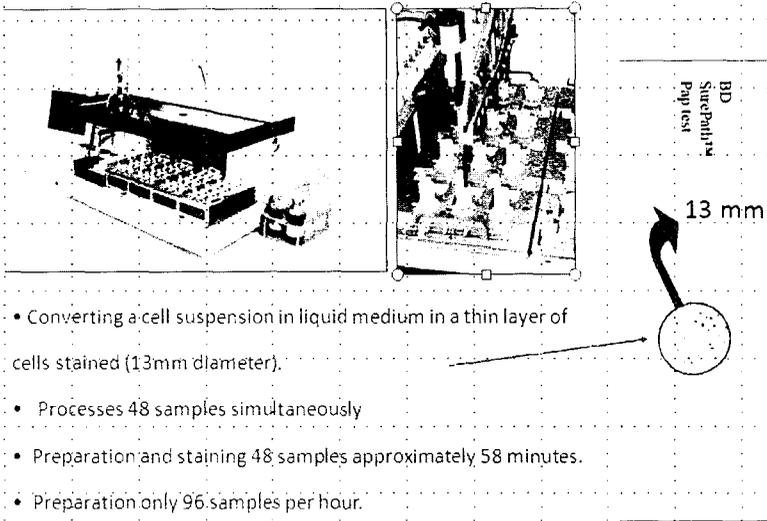
Por lo tanto se debe tener en cuenta que la vacunación no tiene una eficacia del 100%

Tener en cuenta que la vacuna debe ser aplicada en pacientes jóvenes como pre exposición al virus del HPV, como profilaxis

Muchas mujeres deben continuar en el programa de screening.



Preparation and Staining of Samples



- Converting a cell suspension in liquid medium in a thin layer of cells stained (13mm diameter).
- Processes 48 samples simultaneously
- Preparation and staining 48 samples approximately 58 minutes.
- Preparation only 96 samples per hour.

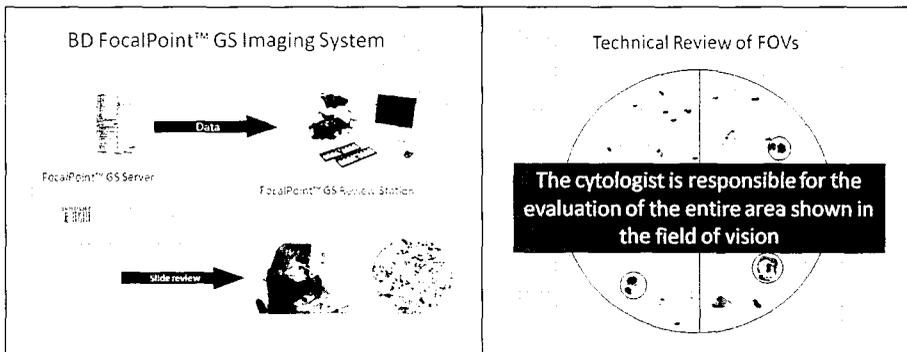
Global Positioning” or “Great Pap” System?

Consider the system as aGP Intelligent Pap Imaging™ The system locates and selects up to 10 positions or FOVs.

Prepared for the conventional system selects 15 fields.

Station GS BD leads directly to these points (FOVS)

You can go off course (manual screen) at any time and Analysis Station FocalPoint™ GS will bring back the FOVs designated



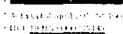
BD FocalPoint™ GS Imaging System

Technical Review of FOVs

The cytologist is responsible for the evaluation of the entire area shown in the field of vision

RESULTADOS SOBRE LA IMPLEMENTACIÓN DEL TEST CON HC2

Gynecologic Cytopathology

Implementing Human Papillomavirus Testing in a Public Health Hospital: Challenges and Opportunities

Mariana Zamora-Bedó¹, Mirley Tola¹, José Caño-Frío,
 Alexandre Abadell², Sheila Aguero², Edmund Frutos-Escudé,
 Verónica Álvarez-Ferreira-Alte², Arnelmar Longatto-Frigo²

Table 3. Distribution of sensitivity and specificity of HC2 by age as compared with cytological (HSIL endpoint) results and age

Endpoint CIN2-3	Sensitivity	Specificity
15-20 years	100%, p = 0.26	61%, p = 0.26
21-25 years	100%, p = 0.5	56%, p = 0.5
26-29 years	83%, p = 0.7	33%, p = 0.7
≥30 years	91%, p < 0.0001	70%, p < 0.0001

Biomarker positivity by histological grade of cervical intraepithelial lesion

Study	Biomarker	WNL	CIN1	CIN2
Shi 2007 et al. [62]	Ki-67	2/14 (14%)	29/34 (85%)	14/14 (100%)
	p16 ^{INK4}	0/14 (0%)	26/31 (77%)	14/14 (100%)
	BD ProEx C	0/14 (0%)	32/31 (94%)	11/14 (79%)
	BD ProEx C/p16	0/14 (0%)	34/34 (100%)	15/14 (100%)
Badr 2008 et al. [63]	Ki-67	0/37 (0%)	6/22 (27%)	34/37 (91%)
	p16 ^{INK4}	2/38 (5%)	8/23 (35%)	35/37 (92%)
	BD ProEx C	1/38 (3%)	11/23 (48%)	34/37 (92%)
	BD ProEx C/p16	3/35 (9%)	15/23 (65%)	37/37 (100%)
Pinto 2008 et al. [64]	Ki-67	11/23 (48%)	ND	34/36 (94%)
	p16 ^{INK4}	13/35 (37%)	ND	51/61 (84%)
	BD ProEx C	10/35 (29%)	ND	52/60 (87%)
	BD ProEx C/p16	9/23 (39%)	ND	55/56 (92%)
Hallouch 2008 et al. [65]	Ki-67	14/29 (48%)	22/27 (82%)	15/16 (94%)
	p16 ^{INK4}	19/29 (66%)	25/27 (92%)	19/19 (100%)
	BD ProEx C	2/29 (7%)	2/27 (7%)	16/19 (84%)
	Ki-67	6/26 (23%)	10/21 (48%)	76/85 (89%)
Conesa Zamora 2009 et al. [66]	p16 ^{INK4}	4/28 (14%)	12/19 (63%)	73/81 (89%)
	BD ProEx C	3/25 (12%)	10/19 (53%)	70/80 (88%)

WNL: within normal limits; CIN: cervical intraepithelial neoplasia; ND: not determined. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001; % staining: †10-20% staining; ‡19/29 < 10% staining; §12/29 < 10%.

Leucemia Mieloide Crónica

Prof. Agregada Dra. Ana Mariño
Prof. Adjunta Dra. Julia Bernachín

Trastornos Mielo proliferativos crónicos (SMP)

- **Leucemia mieloide crónica**
- **Policitemia vera**
- **Trombocitosis esencial**
- **Mielofibrosis primaria**

Los SMP son desórdenes clonales de la stem cell hematopoyética caracterizada por la proliferación en Médula ósea (MO) de uno o más linajes mieloides. En su patogenia está implicada la desregulación de la proliferación y expansión de progenitores mieloides en MO. Esto es debido a la desregulación en la expresión de genes o anomalías genéticas. Una de las alteraciones más importantes en las rutas genéticas es la alteración que se describe en la activación de la señal de transducción de la Tirocin-Kinasa. La Leucemia Mieloide Crónica clínicamente se caracteriza por una leve predominancia en el sexo masculino, fundamentalmente en pacientes que superan los 50 años, con sintomatología vinculada a astenia, anorexia, sudoración nocturna. Pueden aparecer otras manifestaciones clínicas como dolores articulares, dolores óseos, hemorragias, hiperviscosidad. Los pacientes asocian Esplenomegalia: 80-90%, Hepatomegalia: 1/3 de los casos. El diagnóstico de Leucemia Mieloide Crónica debe sustentarse

en la Clínica, Paraclínica, citomorfología y genética molecular. Existe leucocitosis granulocítica, mieleemia, basofilia, disminución de la FA y esplenomegalia. Las lesiones histomorfológicas que sugieren infiltración por LMC se caracterizan por médula ósea hiper celular con celularidad Grado 4 , aumento franco de los neutrófilos y sus precursores. Los blastos representan menos del 5% de las células. Más de 10% de blastos indica transformación a una fase blástica. Los megacariocitos son pequeños, micromegacariocitos, discarióticos con núcleos hipobulados, irregulares, pueden estar en cantidad normal o levemente disminuidos, pero en el 50% de los pacientes, los megacariocitos están aumentados. Los precursores eritroides generalmente están disminuidos. El retículo está moderadamente aumentado. Los eosinófilos pueden estar muy aumentados. En la fase acelerada se observa displasia marcada de los granulocitos, megacariocitos frecuentes y en grupos y aumento marcado del retículo; y en fase blástica se observan grupos de blastos similares a lo que se encuentran en la leucemia aguda. En cerca del 70% de los casos, los blastos son de la línea mieloide, pero la fase blástica puede ser de tipo linfoblástico. Con técnicas de inmunohistoquímica observamos que las células mieloides expresan mieloperoxidasa, CD15, CD43 y CD33. Habitualmente es posible demostrar el cromosoma Filadelfia (Phi) o bcr/abl, teniendo en cuenta que alrededor de un 5% de las LMC son cromosoma Phi(-). Dentro de los diagnósticos diferenciales planteables están otros posibles Síndromes Mielo Proliferativos Crónicos o reacciones leucemoides. La LMC puede tener una fase acelerada, una fase crónica o la aparición de una crisis blástica. En la LMC se expresa la translocación cromosómica t (9; 22) (q34; q11) que da lugar a la formación del cromosoma Filadelfia (Ph). A causa de esta translocación se producen 2 nuevos genes híbridos: el BCR-ABL en el cromosoma 22q- o cromosoma Ph y el gen recíproco ABL-BCR en el cromosoma derivado 9q+, el cual, aunque transcripcionalmente activo, no parece desempeñar ninguna actividad funcional en la enfermedad. La identificación de enfermedad mínima residual mediante métodos moleculares es de vital importancia para la evaluación precisa del estado evolutivo de la enfermedad. No se conoce exactamente cómo se forma el cromosoma Ph ni qué tiempo debe transcurrir para que ocurra progresión de la enfermedad. Se propone la influencia de las altas dosis de radioterapia y la proximidad de los genes BCR y ABL en las células hematopoyéticas en interfase y se especula sobre la posible importancia de la duplicación de 76kb identificada en el cromosoma 9 cerca del gen ABL y en el cromosoma 22 cerca del gen BCR. (73,74,75).El cromosoma Ph está presente en el 95 % de los pacientes con LMC y cerca de un tercio de los pacientes que aparentan tener un cariotipo normal, lo tienen citogenéticamente oculto, pues expresan el BCR-ABL que representa la expresión molecular del Ph. Con la aplicación de las

técnicas moleculares se reconoce que la translocación entre los cromosomas 22 y 9 es recíproca, ya que el cromosoma 9 transfiere a su vez una pequeña porción de sus brazos largos al cromosoma 22. Este material constituye el protooncogen ABL, que al unirse a la región BCR (breakpoint cluster region) del cromosoma 22, da origen al oncogen BCR-ABL. Dependiendo del sitio de ruptura en el gen BCR, se pueden formar 3 tipos de BCR-ABL; el gen híbrido predominante en la LMC clásica es derivado de la disrupción en el punto de ruptura mayor (M-BCR). El producto final de este gen es una proteína de fusión citoplasmática de 210 kd, la cual es responsable de la mayoría de las anormalidades fenotípicas de la fase crónica; puede ser b3a2, en el 55 % de los casos ó b2a2 en el 40 %. Cuando el punto de ruptura es en la región mínima (m-BCR), sabiendo que es bastante menos frecuente que ocurra se asocia a la forma neutrofílica de la LMC, similar a la leucemia neutrofílica crónica, pero Ph-positiva y asociada con el transcrito c3a2 del gen BCR-ABL (76,77,78). Una porción del gen ABL del cromosoma 9 se transloca y fusiona con la porción restante del gen BCR en el cromosoma 22. El fragmento translocado del cromosoma 9 produce un gen de fusión llamado BCR-ABL. Posterior a ello puede determinarse la aparición de una proteína mutante, una enzima llamada tirosina quinasa Bcr-Abl. La proteína enzimática anormal es el factor principal en la transformación de la célula madre de la médula de una célula normal en una célula leucémica. En referencia a las vías moleculares en la LMC es conocido que la quinasa BCR-ABL es creada por el gen BCR-ABL del Cromosoma Philadelphia. Si bien BCR-ABL es la vía más importante se han descrito vías alternativas que también desempeñan un rol fundamental en la oncogénesis de esta enfermedad. En la terapéutica de la LMC, el Dasatinib es utilizado como un inhibidor de quinasa oral, cuyo blanco es BCR-ABL y la familia de kinasas. Habitualmente está indicado en pacientes adultos con LMC en fase crónica, acelerada o blástica ya sea linfocítica o mieloblástica, con intolerancia o resistencia al Imatinib. En la LMC puede observarse resistencia al Imatinib por mutaciones que mantienen BCR-ABL en la conformación activa. Imatinib se une solamente a la conformación inactiva de BCR-ABL(77,78).

Los marcadores biológicos de origen genético tales como los biomarcadores diagnósticos que definen la enfermedad con la mayor discriminación que sea posible, asociado al biomarcador pronóstico que nos define la evolución de la enfermedad en ausencia de terapia y el biomarcador predictivo el cual se asocia a una respuesta a determinada terapia permiten en su conjunto agrupar la información proporcionada para el uso de una terapia individualizada en estas enfermedades.

RUTA DE LA FUNCIÓN REGULADORA TIROSÍN QUINASA EN LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

GRB2 se une a SH2 por la tirosina Y177, y de ahí va a RAS: proteína reguladora de la proliferación y la diferenciación a través de las cascadas de señales MAPK o SAPK/JUN. Es el centro de la ruta de transmisión de señales más importantes en la patogenia de la LMC

iva la ruta JAK-STAT (mitogénica)

Sobreexpresión de cMYC (proliferación independiente de RAS)

Complejos multinuméricos con proteínas de adhesión (paxilina, talina) y es capaz de unirse a F-actina, lo que sugiere una acción directa sobre la función del citoesqueleto celular:

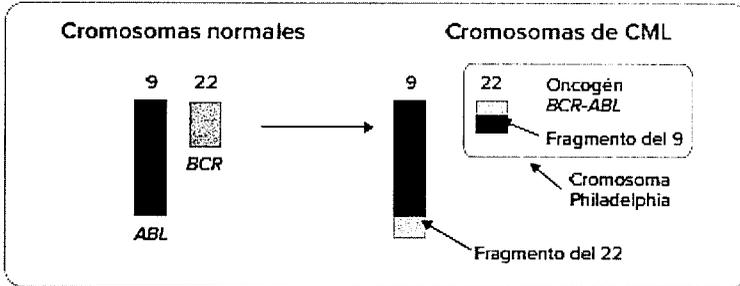
Redistribución de la proteína hacia el citoplasma (se ancla por el actin binding domain)

Genes implicados alt molecular	Técnica de detección / frecuencia	
ABL 1 - FUSIÓN BCR, ABL	RT-PCR, CARIOTIPO-FISH- 100%	LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

SMP ATÍPICOS DEFINIDOS MOLECULARMENTE

	GENES	ALT MOLEC	TÉCNICA	FRECUENCIA
MASTOSITOSIS	PDGFA	FUSIÓN	RT-PCR-FISH	100%
LEC SMP	PDGFA	FUSIÓN	CARIOTIPO FISH	100%
MASTOSITOSIS CON C-KIT	C-KIT	MUT. D816V	SECUENCIACIÓN	100%
SMP	FPFGR1	FUSIÓN	CARIOTIPO	100%

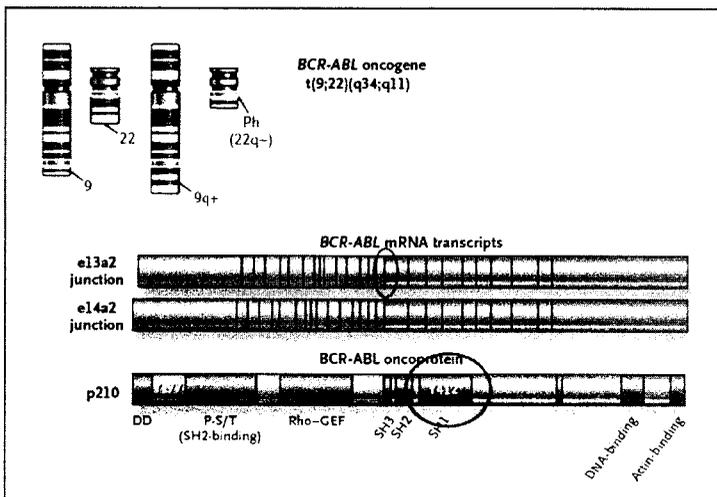
Translocación de los cromosomas 9 y 22



Una porción del gen ABL del cromosoma 9 se transloca y fusiona con la porción restante del gen BCR en el cromosoma 22. El fragmento translocado del cromosoma 9 produce un gen de fusión llamado BCR-ABL. { El gen de fusión BCR-ABL dirige la producción de una proteína anormal. (mutante), una enzima llamada tirosina quinasa Bcr-Abl.

La proteína enzimática anormal es el factor principal en la transformación de la célula madre de la médula de una célula normal en una célula leucémica.

Transcritos mRNA BCR-AB



NEJM 2003;349: 1451-64

Aspectos moleculares en el cáncer gástrico

Prof. Agregada Dra. Ana Mariño

Dra. Natalia Maciel

Dr. Javier Cedrani

El cáncer gástrico (CG) es uno de los tumores más frecuentes en el mundo. El cáncer de estómago es la segunda causa de mortalidad por cáncer en todo el mundo y el cuarto más diagnosticado, con más de 1.000.000 de nuevos casos diagnosticados cada año.

El pronóstico del cáncer de estómago en etapa precoz, denominado carcinoma superficial o "early gastric cancer" es muy bueno y puede ser curado con la resección quirúrgica. Se caracteriza por tumores que comprometen la mucosa y o la submucosa con o sin metástasis en los ganglios linfáticos regionales.

Sin embargo cuando el tumor es avanzado superando la muscular propia del órgano el pronóstico es sensiblemente peor, la mediana de supervivencia de los pacientes es de alrededor de 10 meses tras el diagnóstico y terapéutica. Su diagnóstico precoz resulta difícil, pues la mayoría de los pacientes no tienen síntomas en las fases incipientes de la enfermedad. El cáncer gástrico (CG) es uno de los tumores más frecuentes y es el segundo como causa de mortalidad en el mundo. En el Uruguay ocupa el cuarto lugar en el hombre y se constituye en una causa importante de muerte por cáncer.

Es conocido que existen factores de riesgo para el desarrollo de CG. Existen poblaciones en la cual este tumor tiene alta prevalencia como en Japón, a pesar que los estudios de screening han determinado un diagnóstico en etapas tempranas de la enfermedad es decir en la fase curable de la misma. El método de estudio más difundido es la videoendoscopia digestiva con biopsia y estudio histológico com-

plementario de las lesiones. Existen lesiones tales como el esófago de Barrett o metaplasia mucosa del epitelio esofágico secundaria a reflujo GE y esofagitis que está claramente asociado con el adenocarcinoma de la unión cardioesofágica mientras que la infección por el *Helicobacter pylori*, la gastritis crónica atrófica y la metaplasia intestinal se asocian al adenocarcinoma gástrico (79,80,81). La gastritis con atrofia y metaplasia intestinal generalmente se asocia a infección por el *Helicobacter pylori*. Este germen penetra la barrera mucosa provocando una estimulación antigénica con presencia de linfocitos T que se agrupan y estimulan la migración de linfocitos B que tienden a agruparse y formar acúmulos. En condiciones normales el estómago no tiene infiltrados linfoides. La persistencia de la estimulación antigénica por la presencia del HP permite que la gastritis crónica con componente folicular linfoide progrese y en algunos casos esos pacientes pueden desarrollar Linfoma o Carcinoma Gástrico por vías independientes.

De manera que esta es una enfermedad en la que se conoce el estímulo que antecede la aparición de la neoplasia por lo cual es pasible de realizar prevención. El tratamiento de erradicación del *Helicobacter pylori* es la mejor prevención en estos casos con seguimiento evolutivo. Aproximadamente el 15 - 20% de los tumores gástricos presentan expresión elevada de la proteína Her-2/Neu. Existen publicaciones que sugieren que el cromosoma 7 polisomía puede ser responsable de un mayor número de copias del gen EGFR en carcinomas gástricos y que la amplificación del gen HER2 puede ser la razón principal para la sobreexpresión de la proteína Her2/neu. Recientemente se han realizado estudios sobre la expresión de Her-2/neu en cáncer de estómago. Este gen, conocido también como Neu o HER/2, fue aislado inicialmente de neuroblastomas inducidos en ratas por un agente químico; codifica una proteína con actividad de tirosina-quinasa. El oncogén c-erbB-2 es uno de los genes que codifican a estos receptores. Varios trabajos han demostrado que la sobrevida total y el tiempo de aparición de las recidivas en pacientes portadores de estas neoplasias era menor en aquellos que tenían mayores niveles de este oncogén, sugiriendo que el c-erbB-2 podría ser utilizado como factor pronóstico (82). La mayoría de los investigadores coincide en que la sobreexpresión está relacionada con una menor sobrevida y con una mayor diseminación del tumor. Se ha demostrado que la sobreexpresión de Her2/Neu se correlaciona con la invasión tumoral y metástasis en los ganglios linfáticos, por lo que indica un mal pronóstico.

El gen c-erbB-2 produce un incremento en el potencial angiogénico y metastásico. Recientemente se ha demostrado que los pacientes más jóvenes muestran muy bajos niveles de amplificación de

Her2/neu (<5%) y frecuencia de sobreexpresión. La mayoría de los reportes señalan que los tumores gástricos clasificados como de tipo intestinal sobreexpresan más frecuentemente la proteína Her2/neu (hasta 30%) que las variantes difusa (2-7%) o mixta (20%). La asociación de Her2/neu con un tipo específico sugiere que el cáncer gástrico intestinal y tipo difuso se desarrollan a lo largo de diferentes vías moleculares y apoya estudios anteriores que muestran distintos patrones de alteraciones genéticas en cánceres gástricos de diferentes características histopatológicas (83). También las mutaciones en K-RAS y BRAF en cáncer gástrico esporádico deberían ser determinadas pues tienen clara implicancia evolutiva y pronóstica. Los mismos deberían ser determinados en lesiones pre neoplásicas que asientan en el estómago asociados a la presencia de expresión en CD44v6 y el gen de la E catherina.

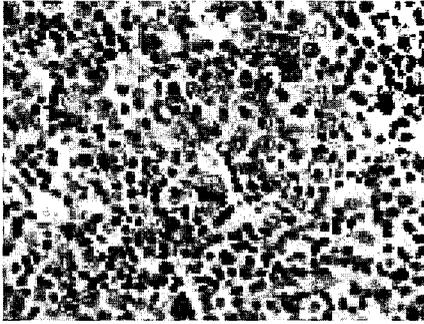


Figura 1 - CARCINOMA POBREMENTE DIFERENCIADO

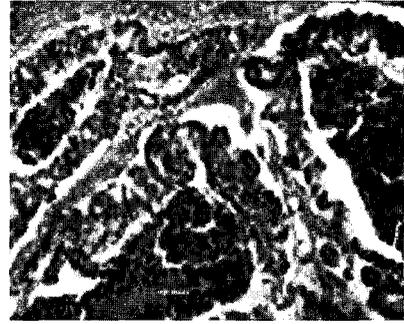


Figura 2 - CARCINOMA BIEN DIFERENCIADO



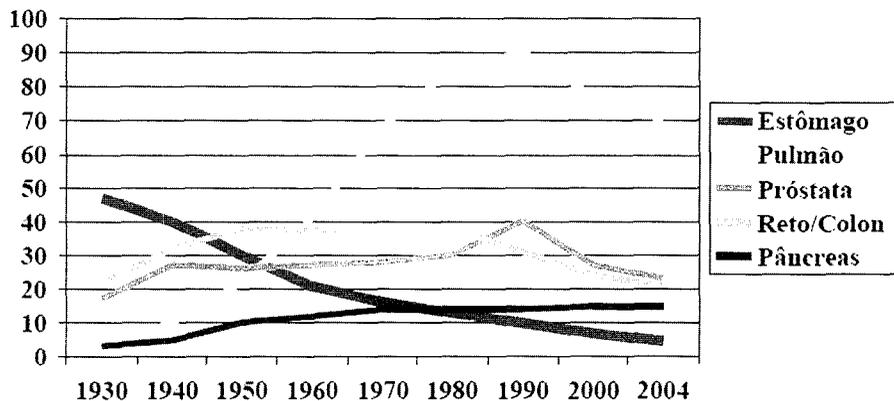
Figura 3 - CK 20+

HER2 en cáncer gástrico.

Análisis comparativo de tres anticuerpos diferentes mediante las secciones de todo el tejido y microarrays de tejidos

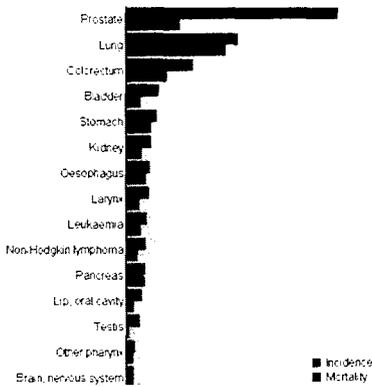
Prof. Dr Cristovam Scapulatempo Neto

EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER GÁSTRICO-DISTRIBUCIÓN MUNDIAL



INCIDENCIA Y MORTALIDAD GLOBOCAN 2008

Estimated age-standardised incidence and mortality rates, men



Estimated incidence, mortality and 5-year prevalence: men

Cancer	Incidence		Mortality			
	Number	ASR (W)	Number	ASR (W)		
Lip, oral cavity	160	2.0	77	1.5	3.5	
Nasopharynx	23	0.3	1.3	1.2	0.2	0.7
Other pharynx	84	1.0	4.2	6.0	1.2	3.0
Oesophagus	267	3.3	11.2	23.4	4.8	9.7
Stomach	335	4.1	14.7	28.6	5.8	12.2
Colorectum	756	9.3	32.7	48.3	9.9	19.6
Liver	67	0.8	3.0	6.5	1.3	3.0
Gallbladder	65	0.8	2.7	5.6	1.1	2.3
Pancreas	220	2.7	9.2	21.3	4.3	8.9
Larynx	233	2.9	11.1	13.8	2.8	6.3
Lung	1214	15.0	54.6	109.0	22.2	48.4
Melanoma of skin	73	0.9	3.5	3.6	0.7	1.6
Prostate	2475	30.6	102.8	76.0	15.5	26.1
Testis	103	1.3	6.3	1.8	0.4	1.1
Kidney	268	3.3	12.2	16.4	3.3	7.1
Bladder	388	4.8	15.7	18.1	3.7	6.7
Brain, nervous system	71	0.9	3.6	6.2	1.3	3.1
Thyroid	37	0.5	2.1	6	0.1	0.3
Hodgkin lymphoma	43	0.5	2.5	1.3	0.3	0.7
Non-Hodgkin lymphoma	197	2.4	9.3	11.8	2.4	5.4
Multiple myeloma	78	1.0	3.5	6.6	1.3	2.8

CÁNCER DE ESTÓMAGO METASTÁSICO

Pronóstico: La supervivencia media <1 año

La supervivencia a 5 años 5 a 20%

Supervivencia de 5 años (Trial Magic 35% operable)

- El aumento de los casos proximales (JEG) y el aumento de la histología difusa.
- Alta proporción con enfermedad localmente avanzada y metastásica.
- La cirugía para el "fuera de intención de cura" y resecable - "Siempre".
- Multidisciplinario para todos.
- Tratamiento: cada nuevo medicamento, el método de administración, combinación se observaron beneficios significativos en la SG (Meta análisis JCO 2006 V24, 2903) (84).

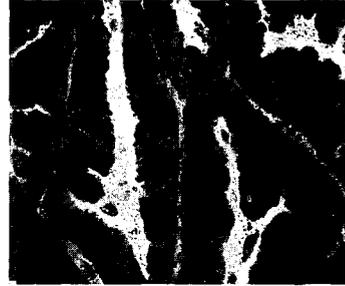
¿CÓMO EVALUAR LA EXPRESIÓN DE HER-2 EN EL ESTÓMAGO?

Diagnóstico: (biopsias endoscópicas) que deben ser:

- Múltiplas biopsias (8-10).

- La ubicación de la lesión debe ser cuidadosamente relatada.
- Pinzas más grandes pueden proporcionar material más adecuado.
- Citologías de lavados son raramente adecuados y no deben ser utilizados para el diagnóstico.

La tinción puede ser circunferencial, lateral o basolateral

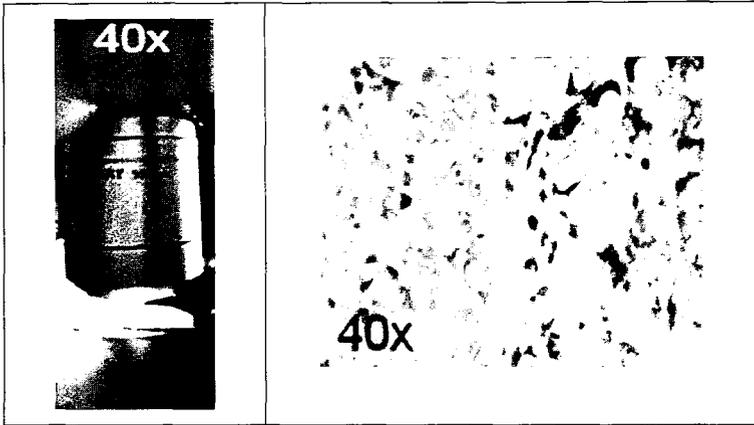


Recientemente, hay muchas publicaciones que evalúan el estado del gen HER2 en el cáncer gástrico utilizando TMA (85,86).

¿Qué tan confiables son estos estudios, dado el hecho de que la expresión de HER2 en el estómago es tan heterogénea?

¿Cómo sería la forma más confiable para evaluar la expresión del gen HER2?





MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron en el Hospital Barretos del Cáncer

199 CÁNCERES DEL ESTÓMAGO E DE LA UNIÓN GÁSTRO-ESOFÁGICA

- TMA: 2 CILINDROS DE 0,6 mm DE DIÁMETRO.
- CORTES DE BLOQUES DE PARAFINA DONDE FUERON SACADOS LOS CILINDROS PARA HACER LO TMA.
- LOS CORTES DE LOS BLOQUES E LOS TMA FUERON SOMETIDOS A LA IMUNOISTOQUÍMICA UTILIZANDO LOS SIGUIENTES ANTICUERPOS:

4B5 (Ventana), pré diluido

SP3 (Spring), 1/100 dilucion

HERCEPTEST (Dako) pré diluido

LOS CASOS FUERON EVALUADOS DE ACUERDO CON LOS CRITERIOS DE LA CAP.

- TODOS LOS CASOS 2+ FUERON SOMETIDOS A LA HIBRIDACIÓN IN SITU DE DOBLE MARCACIÓN CON PLATA (HER2) Y FOSFATASE ALCALINA (centrómero del cromosoma 17), DISH (Ventana)
- CUANDO HUBO DESACUERDO ENTRE LOS RESULTADOS DE LOS ANTICUERPOS, TAMBIÉN SE REALIZÓ EL DISH.

ESTADÍSTICA

- LOS CASOS 1+ EN LA IHQ Y LOS CASOS 2+ SIN AMPLIFICACIÓN EN LO DISH FUERON CLASIFICADOS COMO HER2 NEGATIVOS.
- LOS CASOS 3+ EN LA IHQ Y LOS 2+ CON AMPLIFICACIÓN EN LO DISH FUERON CLASIFICADOS COMO POSITIVOS.
- LA INTENSIDAD DE LOS ANTICUERPOS FUE MEDIDA CON EL ÁREA SOBRE LA CURVA ROC.
- LA CONCORDANCIA DE LOS RESULTADOS DEL TMA Y DE LOS CORTES DE TEJIDO FUE EVALUADA POR EL COEFICIENTE KAPPA.

RESULTADOS

Concordancia entre los TMA y las secciones de todo el tejido por HercepTest, 4B5 y SP3

ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICANTE EL VALOR DE "p" <0, 05.

Antibody	Overall concordance (%)	Kappa coefficient (95% CI)
HercepTest	97.4	0.75 (0.54; 0.96)
4B5	84.1	0.38 (0.22; 0.53)
SP3	85.6	0.56 (0.43; 0.70)

CI, confidence interval

HER2 gene status	Whole-Tissue Section			TMA		
	HercepTest	4B5	SP3	HercepTest	4B5	SP3
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Amplified	0 (0)	6 (30)	6 (17.6)	3 (75)	3 (100)	4 (26.6)
Not amplified	1 (100)	14 (70)	28 (82.4)	1 (25)	0 (0)	11 (73.4)
Total	1 (100)	20 (100)	34 (100)	4 (100)	3 (100)	15 (100)

A		WHOLE-TISSUE SECTIONS		
		<i>HercepTest</i>	<i>4B5</i>	<i>SP3</i>
AUC		0.73	0.91	0.78
<i>HercepTest</i>	--		<i>p</i> 0.002	<i>p</i> 0.035
<i>4B5</i>	<i>p</i> 0.002		--	<i>p</i> 0.265
<i>SP3</i>	<i>p</i> 0.035		<i>p</i> 0.265	--
B		TMA		
		<i>HercepTest</i>	<i>4B5</i>	<i>SP3</i>
AUC		0.71	0.79	0.80
<i>HercepTest</i>	--		<i>p</i> 0.058	<i>p</i> 0.075
<i>4B5</i>	<i>p</i> 0.058		--	<i>p</i> 0.714
<i>SP3</i>	<i>p</i> 0.075		<i>p</i> 0.714	--
C		WHOLE-TISSUE SECTIONS		
		<i>HercepTest</i>	<i>4B5</i>	<i>SP3</i>
	AUC	0.73	0.91	0.78
TMA	<i>HercepTest</i>	0.71	<i>p</i> 0.572	<i>p</i> 0.001
	<i>4B5</i>	0.79	<i>p</i> 0.289	<i>p</i> 0.027
	<i>SP3</i>	0.80	<i>p</i> 0.265	<i>p</i> 0.034
			<i>p</i> 0.034	<i>p</i> 0.244

AUC, area under the ROC curve; TMA, tissue microarray.

La exactitud de los tres anticuerpos; comparación de las áreas bajo la curva ROC en las secciones de todo el tejido (A), en TMA (B) y en ambas muestras (C).

Los fragmentos tisulares en los que se evalúa la muestra deben medir entre 4 y 6 mm y luego de intervenido quirúrgicamente el paciente se debe validar la IHQ.

Melanoma aspectos moleculares actuales

Prof. Agregada Dra. Ana Mariño

RELEVANCIA DEL TEMA

Historia: En el año 1806, René Laennec realiza la primera descripción del melanoma como entidad, sin embargo no es hasta el año 1812 en que por primera vez aparece publicada la palabra melanoma, término utilizado por Laennec. En el año 1820, William Norris, habla de enfermedad hereditaria familiar. Medio siglo antes de que Gregor Johan Mendel describiera las leyes de la herencia (1869).

Aspectos Clínicos y Epidemiológicos relevantes: El Melanoma representa un verdadero problema sanitario dado que es uno de los tumores malignos más agresivos (79% muertes por cáncer de piel) Incidencia: 15x100.000 en los últimos 50a. 8/100.000/a en UE, 10/100.000/a en USA >30/100.000 en Australia, 1/68 americanos tendrá melanoma por lo cual representa una verdadera "epidemia".

En Europa representa el 2.5% de todos los cánceres, el 1-2% de muerte por cáncer (5000 muertes por melanoma en Europa cada año) (87, 88, 89).

En España la incidencia es de 15: 100.000 habitantes, según las diferentes zonas, no habiendo un incremento de la mortalidad en la misma proporción (diagnóstico precoz). En referencia al sexo la relación: V=M; En <40a: M>V; En >45a: V>M Edad media: 45a.

Aspectos microscópicos: Histológicamente el Melanoma se define como un tumor maligno derivado de melanocitos (sobre todo epidérmicos) con alta capacidad metastatizante.

Factores de riesgo: exposición solar, quemaduras importantes, fenotipo de piel y ojos claros, más de 50 nevus, nevus displásicos, inmunosupresión, historia familiar, 8-12% se heredan (90).

Tipos Melanoma: Extensión Superficial. ("Pagetoide"). Melanoma Nodular, Lentigo Maligno Melanoma, Melanoma Lentiginoso Acral, Melanoma Lentiginoso de Mucosas.

Formas infrecuentes de Melanoma: Melanoma Desmoplásico, Melanoma Neurotrópico, Melanoma de células balonizadas, Melanoma Nevoide. Estos tipos de Melanomas tienen escaso valor predictivo.

La variabilidad Clínica en Melanomas quizá sea debida a la diferente susceptibilidad genética de los melanomas a la luz ultravioleta.

ASPECTOS INMUNO-MOLECULARES EN MELANOMA

Cambios Geonómicos en el número de copias de DNA en los diferentes subgrupos de Melanomas: Los Melanomas cutáneos no inducidos por daño solar muestran alteraciones en P16, PTEN, con aumento en el número de copias en (6p, 7, 8q, 17q, 20q). Los melanomas cutáneos inducidos por daño solar muestran alteraciones en CCND1, aumento del numero de copias en 17q, 20q. Los melanomas de las mucosas muestran amplificación en 1 q31, 4q12, 12q14. Los Melanomas acrales muestran alteraciones en 10q23 PTEN.

De manera que basados en las alteraciones genéticas se pueden clasificar correctamente los melanomas en cuatro grupos con un 70% de precisión:

1) 9p21: p16, 2) 12q14: CDK4, 3) 11q13: CCND1, 4) 10q23: PTEN.

Si hacemos solo dos grupos de MM que surgen en piel con daño solar y sin daño solar se pueden clasificar con 84% de precisión.

Se han demostrado distintas vías genéticas en el desarrollo de melanomas en relación a la localización y exposición solar, estas vías implican a CDK4 y CCND1 como oncogenes independientes en MM sin mutaciones en BRAF o N-RAS (91).

MELANOMAS ACRAL Y MUCOSOS: alta frecuencia de ampli-ficaciones y pérdidas focales. MELANOMAS CON DAÑO CRÓNICO

SOLAR (cara, personas añosas, queratosis solares) Mutaciones no BRAF e incremento en el número de copias de CCND1. MELANOMAS SIN DAÑO CRONICO SOLAR: (pero intermitentemente expuesto al sol: tronco, brazos, piernas). Mutaciones BRAF y pérdidas del ch 10 (PTEN). Mutaciones en BRAF + pérdida de PTEN o mutaciones en N-RAS. (Tipo más común).

Factores de valor pronóstico clásicos:

Clínicos: Sexo, Localización anatómica, Edad.

Patológicos: Tipo de Melanoma, Niveles de invasión (Clark) Espesor tumoral (Breslow), Ulceración.

Regresión parcial / completa FCR / FCV Mitosis / mm2 Infiltración linfocitaria Satelitosis, Metástasis ganglionares, Metástasis a distancia.

Espesor del tumor (Breslow) Factores a tener en cuenta: Expansión del tumor periadventicial. Medición en un melanoma ulcerado. Melanoma y nevus Melanoma y regresión. Criterios de Regresión Proliferación Vascular. Fibrosis.

Presencia de melanófagos cuanti y cualitativo. Infiltrados Inflamatorios(mononucleares). Regresión parcial o completa.

PROGRESIÓN TUMORAL. HIPÓTESIS DE CLARK(1980)

Existe una fase del melanoma con capacidad de invasión dérmica, que no se asocia a la capacidad de metastatizar. Esta fase se denomina: Fase de crecimiento radial caracterizada por tecas en dermis papilar < 15 células basales epidérmicas y ausencia de mitosis.

Fase de crecimiento vertical caracterizada por tecas en dermis papilar > 15 células, tecas > que las basales epidérmicas y presencia de mitosis. Infiltración de dermis reticular. Fase de Crecimiento Vertical, proliferación tumoral en dermis con capacidad metastatizante, dificultad diagnóstica en lesiones iniciales. Claves para el Diagnóstico: Nidos en dermis, mayores que en la epidermis. Mitosis en melanocitos dérmicos.

La progresión en tres fases clínico patológicas, radial, vertical y fase de metástasis se encuentra relacionada con alteraciones en la regulación del ciclo celular y apoptosis. Cada fase en la progresión del melanoma se caracteriza por un perfil de expresión proteico específico.

Genes Relacionados con la Transición Epitelio-Mesénquima Hipótesis de la expresión alterada de caderinas durante la progresión del melanoma:

En los Melanomas en Fase Radial se mantiene la expresión de Caderina- E en los queratinocitos. Los melanomas en fase de crecimiento radial pierden la expresión de Caderina-E escapando del control de los queratinocitos.

Melanomas en fase de crecimiento vertical, en fases más avanzadas del melanoma aparece expresión de Caderina N permitiendo la interacción del melanoma con células que la expresan como fibroblastos y células endoteliales

En estos momentos, los criterios histológicos convencionales con H&E siguen siendo los más útiles tanto para el diagnóstico como para el pronóstico del melanoma (espesor máximo de Breslow, ulceración, fase de crecimiento).

El espesor de Breslow es el factor pronóstico más importante. Los melanomas que expresan Bcl6 o pierden p16, tienen mayor capacidad de producir metástasis y matan a los pacientes más rápidamente.

Introducción al Centro de Pesquisa en Oncología Molecular

*Rui Manuel Reis, PhD
Hospital de Câncer de Barretos, Brasil*

MISIÒN

Generar conocimiento e innovación para la aplicación de la Oncología Molecular en el control del cáncer. Teniendo como premisa fundamental:

- El conocimiento de las diversas causas de los mecanismos biológicos inmunes y genéticos de las enfermedades;
- Innovar en la detección, el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de las Enfermedades Oncológicas;
- Aplicar la prevención como herramienta principal en Oncopatología y asistir al paciente en la enfermedad.

Para ello se requiere de una infraestructura acorde a las necesidades de un Centro de Patología Molecular, lo cual implica en primer término una planta física acorde a las técnicas que se desarrollaran en el Centro y ubicada en un lugar estratégico con sectores de circulación exclusiva del personal del Área.

Los equipos deben tener resguardo, con temperaturas adecuadas a cada uno de los equipos con las especificaciones del distribuidor.

Se deberán señalar correctamente las diferentes áreas y se deberá responsabilizar a los Médicos y Licenciados, así como a los Técnicos de los equipos del sector.

El área Molecular del Hospital Barretos cuenta con una completa y moderna infraestructura de más del 1000m² para los diferentes Laboratorios de citogenética, genética molecular, biología celular y molecular, siendo capaz de viabilizar el desarrollo de diferentes líneas de pesquisa en Oncología Molecular.

Las diversas líneas de trabajo han sido en el año 2012 fundamentalmente vinculadas a señalización celular, biomarcadores, Genómica funcional del cáncer, cáncer hereditario, medio ambiente y cáncer, tumores en pediatría y su genómica y epigenética.

El Centro de Diagnóstico Molecular incluye el estudio de la citogenética de la genética molecular y de Medicina Personalizada.

En el caso del Cáncer de colon todos los casos nuevos que ingresan al Hospital son incluidos para estudio de inestabilidad cromosómica y microsatelitosis. Microsatelitosis del DNA haciendo uno a seis pares de bases de secuencia larga repetitiva y microsatelitosis inestabilidad estudiando MSS, microsatelitosis estable, MSI baja y MSI alta.

Inactivación of Mismatch repair system – MMR

Mutación o promotor en metilación de MMR genes: MLH1; MSH6; MSH2; PMS2

- Ocurrencia de mutaciones en la regulación genética con microsatelitosis en regiones reguladoras : MSI Target Genes
 - Carcinogénesis con mecanismos y vías de desregulación
- Diferentes terapias blanco

Algoritmo de estudio:

Análisis de MSI-MSIH +: Historia clínica o familiar de Síndrome de Lynch: mutaciones de BRAF y estudio de MMR consejo genético y test molecular-Esporádico con o sin resitencia al 5 FLUORACILO.

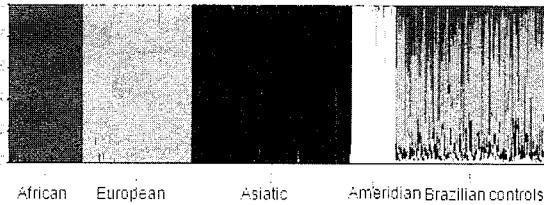
MSI evaluación mediante PCR múltiple, marcadores monomórficos, NR24, BAT25, BAT26.

Hallazgos de alteraciones genéticas en Cáncer de colon en la población brasileña en estudios genéticos poblacionales

Cáncer Colorrectal - MSI

Ancestral proportions for testing population samples from different continental origins using the HGDP-CEPH diversity panel genetic data as training sets

HOSPITAL
BARRETOS



Cáncer Colorrectal - MSI

Estimation of population assignment success and Brazilian population

HOSPITAL
BARRETOS

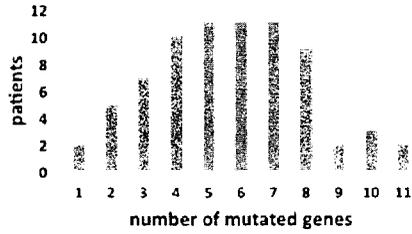
	Population assignment:			
	AFR	EUR	EAS	NAM
Population of AFR origin	100.00%	0.00%	0.00%	0.00%
Population of EUR origin	0.00%	100.00%	0.00%	0.00%
Population of EAS origin	0.00%	0.44%	96.94%	> 62%
Population of NAM origin	0.00%	0.00%	0.00%	100.00%
Brazilian Population	19.6%	67.5%	6.2%	6.7%
Individuals within QMVR	17.5%	69.7%	6%	6.8%
Individuals outside QMVR	37.2%	49.6%	7.6%	5.6%

Cáncer Colorrectal - MSI

- Presence of mutations in MSI-target genes in 73 MSI-H CCR tumors

HOSPITAL
BARCELONA

ATM	BRILL	ROCK1	DDR1	TCF7L1	MSH5	TCF4	MED4	CLYBL	ATM	DMSP30	BRCA
17/23(74%)	22/27(81%)	20/24(83%)	17/21(81%)	17/21(81%)	22/27(81%)	14/17(82%)	17/22(77%)	10/12(83%)	12/17(71%)	11/15(73%)	11/22(50%)
BRCA1	BRCA2	MLH1	PTEN	MLH2	PTEN	BRCA1	TP53	BRCA1	BRCA2	BRCA1	BRCA2
27/33(82%)	7/9(78%)	7/10(70%)	5/6(83%)	4/7(57%)	3/7(43%)	2/7(29%)	2/7(29%)	1/7(14%)	0/2(0%)	0/2(0%)	0/2(0%)



Aportes de la Imagenología Molecular en la Investigación Clínica en Uruguay

Prof. Dr. Omar Alonso
Cátedra de Medicina Nuclear, Co-director de CUDIM

Las Enfermedades coronarias y el cáncer son los grandes desafíos de este siglo. Los diferentes especialistas Médicos debemos trabajar en equipo para poder realizar prevención y diagnóstico precoz de estas enfermedades.

MEDICINA PREVENTIVA

Conlleva el concepto de:

Detectar enfermedades clínicamente relevantes en etapa pre sintomática

Evidenciar a las drogas alcanzar su blanco

Determinar si un paciente es candidato a una droga específica

Desafíos de alto impacto sanitario



Cáncer

Una persona de cada tres tendrá cáncer:



Enf. Coronaria

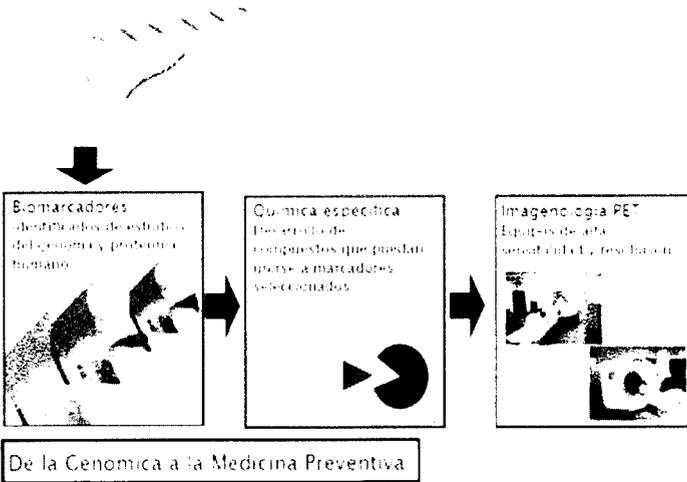
50% muertes luego del primer infarto



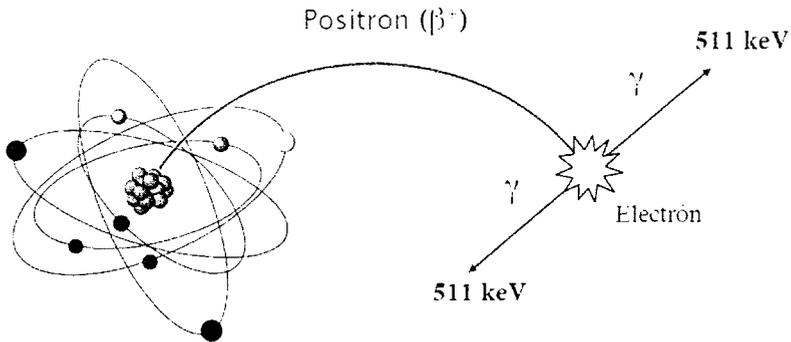
END

20% de personas entre 75-84 años tendrán EA

Desarrollo de la Genómica y Proteómica



Emisión de positrones

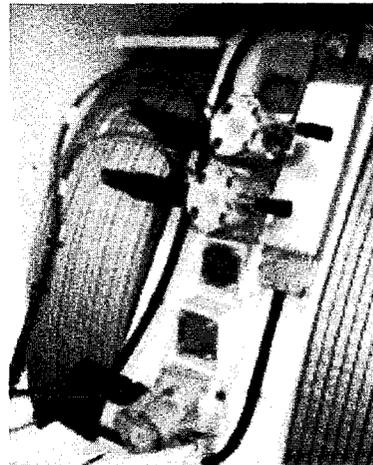


El radionucleido emite un positron. Éste interactúa con un electrón. La aniquilación del par positrón-electrón genera dos fotones de 511 keV que son emitidos exactamente en 180 grados

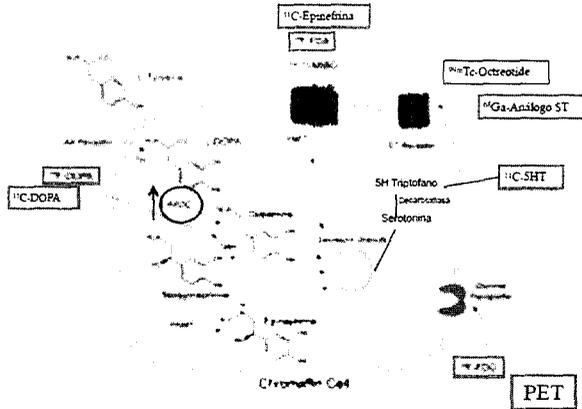
Isótopo	T. de semi desint. (min)	Energía máxima del positrón (MeV)	Rango del Positrón en agua (FWHM en mm)	Producción
^{11}C	20.3	0.96	1.1	Ciclotron
^{13}N	9.97	1.19	1.4	Ciclotron
^{15}O	2.03	1.70	1.5	Ciclotron
^{18}F	109.8	0.64	1.0	Ciclotron
^{68}Ga	67.8	1.89	1.7	Generador
^{82}Rb	1.26	3.15	1.7	Generador

Ciclotrón

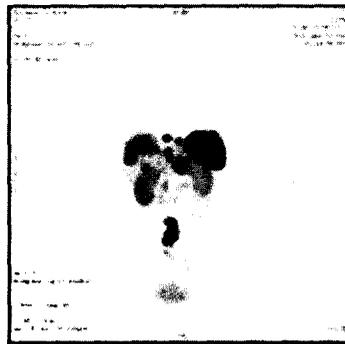
- Diseño vertical
- Doble partícula (protones y deuterones), lo que ofrece amplio rango de producción de trazadores
- Irradiación simultánea de 2 blancos
- Fuente de iones fija, de un diseño sencillo y confiable
- Operación automatizada
- Capacidad de producir nucleidos para ^{18}F , $^{11}\text{CO}_2$, $^{11}\text{CH}_4$, ^{13}N , ^{15}O .



Blancos moleculares: células de tumores neuroendócrinos



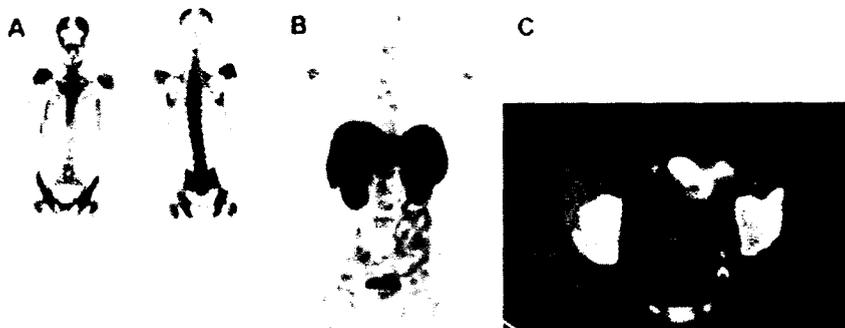
^{68}Ga -DOTATATE



Alonso O. et al. *World J Nucl Med* 2013; 12(1):63.

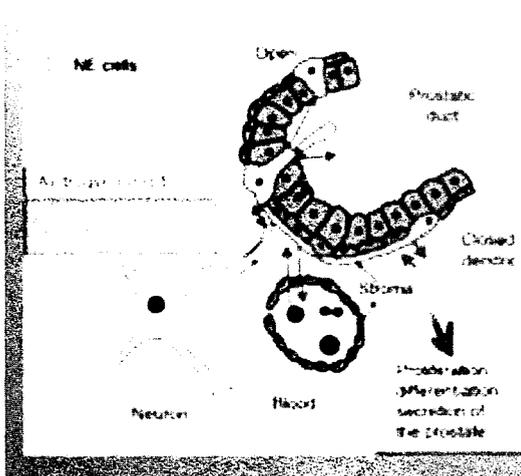
También se han estudiado los receptores de somatostatinas en el cáncer de próstata y los receptores de células neuroendocrinas como blanco moleculares.

Cáncer de Próstata. Expresión de receptores de somatostatina. Evaluación mediante ^{68}Ga -DOTATATE



Alonso O. et al. *Clin Nucl Med* 2011; 36:1063-64.

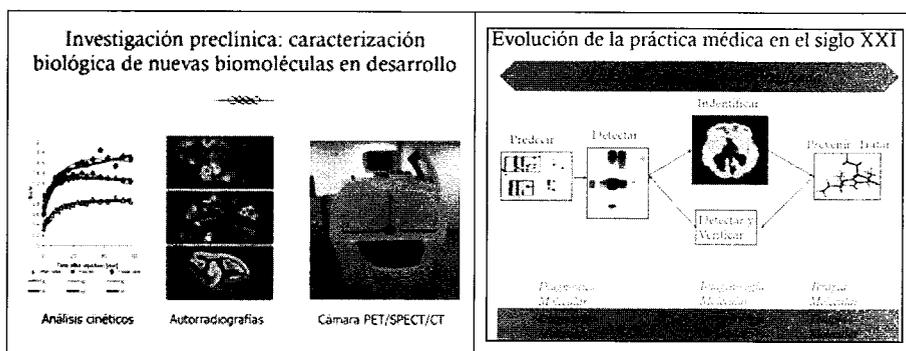
Células neuroendócrinas y degeneración neuroendócrina en cáncer de próstata



- Las células neuroendócrinas existen normalmente en la glándula prostática y son independientes de la acción androgénica.
- Probablemente jueguen un papel importante en el CP hormonosensible (degeneración neuroendócrina).

El carcinoma de próstata es el tumor maligno más prevalente en el varón. (92) La glándula prostática normal está constituida por tres tipos celulares: el luminal o secretor, el basal y el neuroendocrino. Las células neuroendocrinas se distribuyen en toda la extensión de la glándula prostática, con mayor frecuencia en los conductos que en el tejido acinar. La diferenciación neuroendocrina es un hallazgo frecuente en los carcinomas prostáticos, en su mayoría de modo focal, y en los casos en que la diferenciación es extensa, se asocia con refractariedad a la terapia hormonal o enfermedad agresiva. Es importante diferenciar este componente celular ya sea por técnicas de inmunohistoquímica en el estudio patológico molecular y por métodos de medicina nuclear.

Estos tumores tienen mayor frecuencia de metástasis ganglionares locoregionales. Es en base a la posibilidad del marcaje de estas biomoléculas que podemos desarrollar una medicina más específica y personalizada.



Utilidad de los microRNAs en Patología Oncomolecular

*Sebastián Rodríguez
Prof. Agregada Dra. Ana Mariño*

Definición

Los micro ARN (miARN) son una clase de ARN no codificante de aproximadamente 18-24 nucleótidos, conservados desde el punto de vista evolutivo y de pequeño tamaño. Son capaces de regular la expresión génica por distintos mecanismos (93). Se expresan en el núcleo de células eucariotas y pueden localizarse en intrones o exones de genes codificantes de proteínas, o en regiones no codificantes del genoma (94).

Solo se conoce la función biológica de unos pocos miARNs y el criterio establecido para clasificarlos excluye la demostración de su función. Sin embargo, se propuso una clasificación filogenética como posible indicación indirecta de su función (95).

Los ARN (ARNi) de interferencia son moléculas de RNA que presentan la capacidad de interferir post-transcripcionalmente con el ARNm (96). Los ARNi se clasifican en tres clases principales en base a su origen o a los componentes a los cuales se acoplan. La primera clase son los miARNs, la segunda corresponde a los siARNs. Ambos son generados a partir del mismo precursor (ARN doble cadena). La tercera clase corresponde a ARNs asociados a la proteína Piwi

(piARNs). Estas últimas son de mayor tamaño (26 a 31 nucleótidos) y se generan de forma independiente de Dicer.

Dichas moléculas conservadas filogenéticamente parecen haber surgido como mecanismo de defensa contra los virus (97, 98).

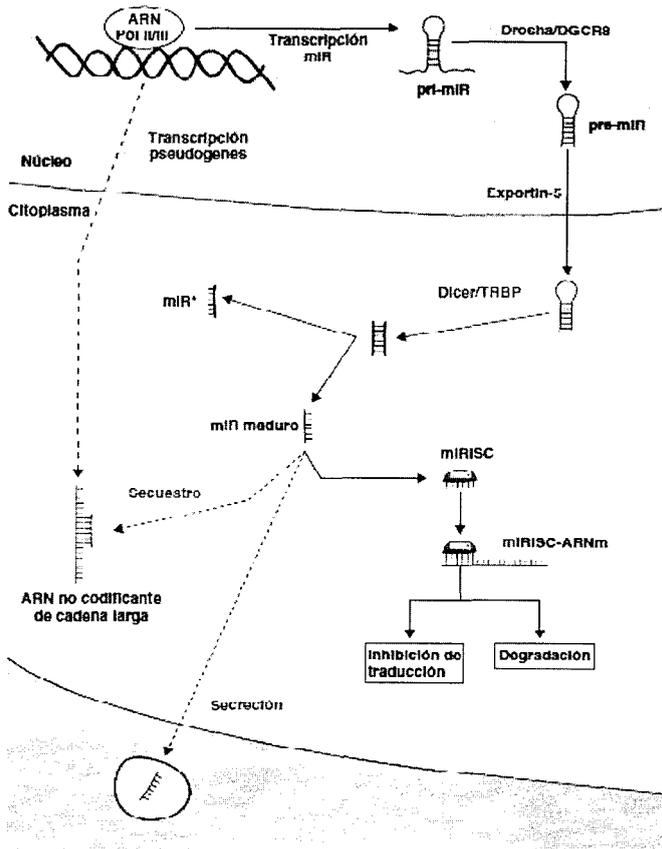
Biogénesis

Luego de la activación de la transcripción, las ARN polimerasas II o III intervienen generando una estructura de ARN en forma de Horquilla constituyendo el transcrito primario del micro ARN (pri-miR)(93). Estos pueden estar contenidos en diferentes regiones génicas; intrónica, exónica o en una región no traducida (UTR) pri-miR, al igual que el ARNm, se encuentra poliadenilado y tiene CAP en el extremo 5'(99). Cada pri-miARN puede contener uno o más miARN. La mayoría están organizados en grupos o "clusters" dentro de una misma región cromosómica con patrones de expresión similares, por lo que su transcripción se realiza en forma de policistrones que están bajo la regulación de un mismo promotor (100).

Dentro del núcleo, el complejo Dosh/DGCR8 se encarga de cortar los extremos del pri-miR, dando lugar al precursor del miR maduro (pre-miR), con un tamaño aproximado de 70-100 nucleótidos(94). Dicho proceso permite que el factor nuclear de exportación (Exportina 5) reconozca al pre-miARN y lo transporte al citoplasma de manera dependiente de RAN guanosina trifosfato, proteína nuclear relacionada a Ras (Lund et. al., 2004) (101). En el citoplasma otro complejo formado por ARNasa, Dicer y la proteína activadora de unión a ARN (TRBP) se encargan de procesar y generar una molécula de ARN de doble cadena de 19 a 25 nucleótidos.

Este dúplex de ARN se asocia a un complejo proteico denominado complejo silenciador inducido por ARN (RISC), cuyos componentes más importantes son la proteína Argonauta 6 (Ago 6). Este complejo selecciona una de las dos cadenas para que actúe como guía constituyendo de esta manera el miARN maduro. La cadena complementaria se degrada por acción de una proteína del complejo RISC, Argonauta 2 (Ago 2)(102).

Se piensa que Risc selecciona la cadena con menor estabilidad termodinámica, como la cadena guía y degrada al mismo tiempo la cadena complementaria. Sin embargo Ro y colaboradores mostraron evidencias de que ambas cadenas son susceptibles de incorporarse a Risc y co-existir en ciertos tejidos(103).



MECANISMO DE ACCIÓN

El complejo miR-RISC (miRISC) puede establecer un apareamiento de bases con una secuencia de 6 a 8 nucleótidos que se localiza en la región 3' UTR del ARNm, denominado secuencia semilla (104, 105).

Esto conduce a la degradación del ARNm o a la represión de su traducción, el grado de dicha asociación parece ser uno de los determinantes del mecanismo de represión

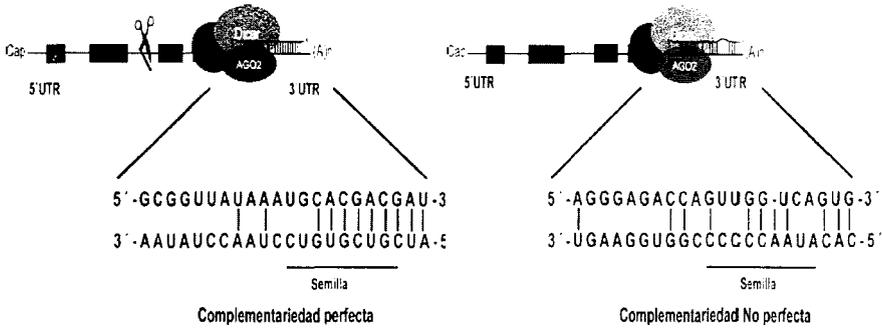
Si la asociación es casi perfecta, entonces se procederá a la degradación del ARNm donde requiere la participación de Ago 2.

Cuando la asociación es menor entonces se procederá a la represión de la traducción. En dicho mecanismo actúa Risc silenciando o bloqueando el ARNm, este último ocurre con mayor frecuencia en mamíferos. Se ha planteado que el bloqueo ocurre durante la traducción, ya sea en el inicio o en la elongación.

La represión de la traducción puede ocurrir al inhibirse el ensamblaje de la subunidad ribosomal 60s al complejo de iniciación de la traducción (106).

Los ARNm que han sido silenciados por los mecanismos mencionados son secuestrados en estructuras denominadas cuerpos P. En dichas estructuras están presentes las enzimas encargadas de la degradación del CAP 5'; Dcp1/Dcp2 y la exonucleasa 3'-5' y las que eliminan de manera progresiva la poliadenilación en 3' como el complejo Ccr4p/Pop2p/Not. El complejo Risc también se encuentra en los cuerpos P (107).

Sin embargo, la acción de los miARNs no solo se limita a inhibir la expresión génica, sino que de manera opuesta, su presencia y asociación a otros factores puede inducir e incrementar la traducción del transcrito sobre el que hacen efecto(108).



Identificación de los miARNs

Para poder entender los miARNs y sus funciones, se requiere previamente el aislamiento e identificación de los mismos expresados en células y organismos de interés.

La clonación de cDNA y posterior análisis de la secuencia han permitido la identificación de cientos de miARNs en una gran diversidad de especies. Mediante el desarrollo de numerosos algoritmos matemáticos que permitieron predecir miARNs a partir del genoma, estimaron la existencia de 2000.

Los análisis mediante *northern blot* y *microarray* se utilizaron con frecuencia para ensayar la expresión de ciertos miARNs en células y tejidos específicos. La creación de organismos mutantes permite determinar la función normal de dichas moléculas. Sin embargo dicho análisis, no es aplicable a numerosos mamíferos.

Identificación de los miRNAs en librerías de ARN de pequeño tamaño

Las librerías de ADNc son una aproximación utilizada para identificar miARNs *de novo*. Para trabajar con dichas moléculas, se utilizó de un protocolo general para clonación de ARNi. A pesar de las modificaciones realizadas en dicho protocolo, todas siguen el mismo principio (poner figura): el ARN es separado en un gel de poliacrilamida desnaturante y se recoge la fracción de un tamaño de 20-25 pb. Luego los adaptadores 3' y 5' se unen a los ARNs, se realiza

un RT-PCR y los fragmentos resultantes se clonan en vectores para crear una librería de ADNc. Luego, dichos clones son secuenciados y analizan para determinar el orden genómico.

Para la síntesis de la primera hebra el adaptador 3' necesita unirse al miARN para introducir un sitio y de esa manera permitir la unión del cebador utilizado en la transcriptasa reversa. Existen diversas variantes para dicho paso, como desfosforilar antes del ligamiento los ARNs de pequeño tamaño evitando de esta manera la recircularización de miARNs. También el adaptador 3' puede preadenilarse, evitando desfosforilar los ARNs pequeños. Otra alternativa es que la unión del adaptador 3' puede sustituirse si se le añade una cola de poli (A) a los ARNs de pequeños tamaños usando una polimerasa poli(A).

Previamente a la transcripción reversa, el adaptador 5' se liga al producto de ligamiento del adaptador 3' purificado en gel. Posteriormente los cADNs amplificados por PCR se clonan en vectores para incrementar la longitud de la secuencia informativa.

Para incrementar el número medio de *tags* (pequeñas secuencias nucleotídicas de un segmento) de ARNs de pequeños tamaños se emplea el análisis en serie de expresión génica (SAGE), el cual reduce los costos de secuencias de las librerías de ARN de pequeño tamaño e incrementa el rendimiento.

Las técnicas de secuenciación convencionales pueden remplazarse por secuenciación masiva (109).

Predicción bioinformática de genes de miARN

A partir del clonado de las secuencias el siguiente desafío consiste en realizar una predicción informática. Para dicha predicción se han desarrollado numerosas aproximaciones que pueden ser agrupadas en base a: conservación filogenética, estructura secundaria, estabilidad termodinámica de las horquillas, etc.

Los primeros métodos de predicción se basan en el criterio de conservación. Mediante el *software MirScan* se identificaron y alinearon horquillas conservadas en base a su similitud con miARNs. Otro *software* basa en la conservación es *Snarloop*, utilizado para estimar 214 candidatos de miARN en *C. elegans*. Mediante el *software miR-Seeker* se estimaron 48 candidatos de miARN.

Xie *et. al* encontraron en regiones 3' UTR de los genes motivos conservados y altamente representados que algunos corresponden con secuencias *seed* de los miRNA. Dichas secuencias están constituidas por siete u ocho nucleótidos del miARN y son de gran importancia

en la interacción de estos y su diana. Dichos investigadores usaron motivos que no emparejaron con miARNs conocidos y estimaron 129 nuevos candidatos en humanos.

El *software RNAz* combina la estabilidad termodinámica y la conservación de la estructura secundaria para predecir ARNs no codificantes.

Actualmente hay varios métodos basados en alineamientos, para identificar homólogos de miARN ya conocidos. Dichos métodos buscan secuencias genómicas que puedan alinearse con los miARN, tanto a nivel estructural como de secuencia (109).

Tipos de miRNA

El primer miARN descubierto fue Lin-4, el cual regula la transición de las fases de desarrollo del nematodo *Caenorhabditis elegans*. El descubrimiento de Lin-4 y la diana que inhibe la traducción de forma específica, puso en manifiesto un nuevo mecanismo, de regulación genética durante el desarrollo. A pesar del intento de encontrar otros miARNs homologos, no se produjo hasta varios años después, con el descubrimiento de Let-7(110, 111). Los integrantes de la familia miRs let-7 se caracterizan como genes supresores tumorales, reprimiendo oncogenes como ras, myc y HMGA2(112). Su expresión se ve disminuida en el cáncer de pulmón (113).

La forma de expresión de los miARNs depende del tipo celular y tejido¹⁷. Dichas moléculas participan activamente en la regulación de procesos celulares tales como la proliferación, diferenciación y apoptosis.

Hay evidencias que indican que la expresión de dichas moléculas pueden verse alterada en cáncer y que ciertos cambios están implicados en el proceso de carcinogénesis, donde actúan a veces como oncogenes (oncomiRs) y supresores tumorales (114).

La evidencia inicial de participación de los miRNAs en cáncer se observó en la leucemia linfocítica crónica de linfocitos (B-CLL), debido a que en más de la mitad de los pacientes con este tipo de cáncer presentan una deleción cromosómica, que codifica para dos transcritos que corresponden a los miR-15 y miR-16 (codificados en la región cromosómica 13q14). Dichos miRNAs se encuentran ausentes o sub-expresados en tejidos de pacientes con B-CLL (115). Además se identificó que dichos marcadores tenían como blanco de acción la región 3' UTR del transcripto del gen BCL2 (potente inhibidor de

la apoptosis), sugiriendo una actividad supresora de tumores para ambos miRNAs.

Gran cantidad de los miRNAs son propensos a sufrir amplificaciones, deleciones o re-arreglos en tumores malignos, reforzando la hipótesis de la importancia de estos en la patogénesis cáncer. Numerosos estudios indican que los miRNAs se expresan de forma anormal en diferentes tipos de cánceres humanos (poner el cuadro). Además, más del 50% de los genes que transcriben para estos RNAs, se ubican en sitios de inestabilidad genómica asociados al desarrollo de cáncer (116).

Por lo tanto la función como tumor supresor de un miARN se da cuando la proteína que controla es una oncoproteína, y el miARN se expresa e inhibe la traducción de la oncoproteína. En cambio la función como oncogen de un miARN (oncomiRs), se da cuando el miARN controla la expresión de una proteína supresora de tumores y se expresa e inhibe la traducción del supresor de tumores (117).

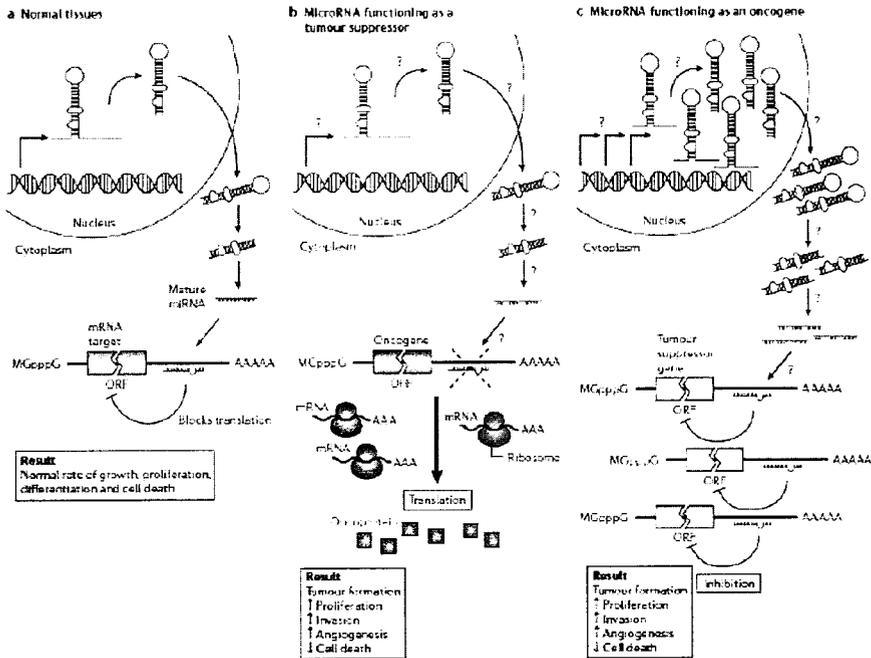


Figura 3- mARNs actuando como supresores de tumores o como oncogenes.

Además de miR-15 y miR-16 existen otros miR que se ven disminuidos en las células tumorales. Por ejemplo, el miR-143 y miR-145 en cáncer colorrectal; miR-145 en cáncer de mama; let-7 en cáncer de pulmón; miR-29 en LLC y en la leucemia mieloide aguda (LMA);etc (118).

La familia del miR let-7 se encuentra conservada en varias especies como *C. elegans*, *Drosophila* y vertebrados. Su expresión se encuentra disminuida en tejido tumoral y la expresión de la proteína RAS se encuentra incrementada en relación al tejido normal.

Otro blanco de let-7 es el transcripto del gen HMGA2, que tiene un conocido papel oncogénico en varios tumores (119).

Como se mencionó anterioremente, además de actuar como supresores de tumores puede actuar como oncogenes (oncomiRs). Como es el caso del miR-155, miR-21, los miembros del cluster miR 17-92, etc.

El miR-155 se encuentra aumentado en linfomas de Burkitt, linfoma difuso de células B grandes, linfoma mediastínico y linfoma de Hodgkin. Estacodificado en la región terminal del gen BIC, aparentemente relacionado con la inflamación, cáncer e inmunidad, como también con el mal pronóstico del cáncer de pulmón (118).

El miR-21 se encuentra sobre-expresado en cáncer de mama y se relaciona con la supervivencia y proliferación celular, que regula los genes supresores de tumores PTEN, PDCD4 y TMP1. Tambien está sobre-expresado en ovario, pulmón y glioblastoma. En cáncer de colon y páncreas se ha relacionado con la baja supervivencia y poca respuesta a los tratamientos (110).

El grupo o cluster miR-17-92 codifica a siete miRNAs. Constituido por el miR-17-5p, miR-17-3p, miR-18, miR-19a, miR-19b-1, miR-20 y miR-92. Están localizados en un intron dentro de la región del cromosoma humano 13q31. 3 y frecuentemente está amplificado en diversos tipos de linfomas y tumores sólidos (119, 120). Los miR-17-5p y miR-20 regulan la traducción de E2F1, un conocido factor de transcripción nuclear (118).

También Liu et. al han demostrado el rol de miR-31 como oncomiR en el CPCNP, donde actúan reprimiendo genes supresores de tumor (121).

El oncomiR-21 presenta niveles incrementados en cáncer de pulmón tanto en pacientes fumadores como no fumadores. Actúa en el crecimiento celular e inhibe la apoptosis, favoreciendo el crecimiento tumoral y metástasis (122).

Aparentemente el papel principal de los miRNAs oncogénicas sería regular negativamente a genes supresores de tumores y de esta manera favorecer los procesos invasivos y de metástasis.

Algunos de los miARNs relacionados con el cáncer pueden sintetizarse en la siguiente tabla (123).

miR-15a, miR-16-1	Cromosoma 13q14	Deleccionado o infrarregulado en LLC B; regulación negativa del gen BCL-2	TS
miR-143, miR-145	Cromosoma 5q32-33	Disminuido en CCR; infrarregulado en CM, próstata, cérvix y linfoide: miR-145 está disminuido en CM.	TS
miR-21	Cromosoma 17q23.2	Factor anti-apoptótico, suprarregulados en GBM y CM.	OG
Familia let-7	Múltiples loci	Regulación negativa del oncogen RAS. Disminuido en CP	TS
BIC/miR-155	Cromosoma 21q21	Suprarregulado en linfoma de burkitt, Hogdkin, primario mediastínico y difuso de células B y en CM.	OG
Cluster miR-17-92	Cromosoma 13q31-32	Suprarregulado por MYC; Modula negativamente al oncogen E2F1; LOH en hepatocarcinoma; sobrexpresado en linfomas B.	TS/OG

UTILIDAD DE LOS MIARNs

Uno de los retos actuales sería correlacionar la expresión de los miRNAs en diversas neoplasias, así como encontrar su papel como biomarcadores y evaluar su valor terapéutico.

Para el estudio de dichas moléculas se han utilizado diferentes estrategias como generación de mutaciones puntuales, desarrollo de microarreglos específicos para conocer su perfil de expresión, sondas antisentidos para bloquear las funciones, etc (124, 125).

A partir de su descubrimiento se han postulado diversas aplicaciones de los microARNs. La mayoría de las veces un solo miARN regula la expresión de varios genes con funciones relacionadas y así modifican procesos biológicos complejos. Dichas moléculas estarían implicadas en la fisiopatología de muchas enfermedades asociadas a proliferación celular y apoptosis. Reprimiendo la expresión de genes tanto proapoptóticos como antiapoptóticos.

Actualmente se está evaluando si los microARNs pueden usarse como marcadores de progresión de las enfermedades, como factores pronósticos y para estratificar el riesgo, principalmente en el área de la oncología ya que podrían comportarse como supresores de tumores y oncogenes (126).

También se está evaluando su relación con diferentes clases de tumores como cáncer de próstata, carcinomas escamosos de cabeza y cuello, cáncer de mama, leucemia linfoblástica aguda, mesoteliomas malignos, entre otros (127, 128).

Estudios recientes con miR-26a, demostró un efecto antiproliferativo inducido en la línea celular HepG2 de humano. En ratones, se evidenció que en el 80% de los casos desapareció el tumor al introducir la secuencia de dicho miRNA, en 20% de ellos el tumor se redujo de tamaño. Por lo tanto, la re-expresión de miR-26a puede tener una aplicación clínica como desarrollo de estrategia terapéutica (129).

Sin embargo, para poder utilizar dichas moléculas como agentes terapéuticos se requiere dilucidar claramente su función y sus mecanismos de acción tanto *in vitro* como *in vivo*.

También existe una gran expectativa sobre la utilización en el desarrollo de estrategias terapéuticas en el cáncer de pulmón. La resistencia a la quimio y radioterapia son una uno de los principales problemas actuales del tratamiento. La expresión algunos miRs ha sido implicada en mecanismos de resistencia terapéutica en el cáncer de pulmón, dejando abierta no solo la posibilidad de orientar el tratamiento en base el perfil de miRs, sino también la eventual modulación de los mismos para incrementar la sensibilidad del tumor a la quimioterapia (130).

Cabe resaltar que en la mayoría de los estudios se basan en la detección de los miARNs en los tejidos pero también pueden ser detectados en sangre periférica y podrían ser usados como biomarcadores potenciales.

Los microARNs se han convertido rápidamente en un objeto farmacológico para el tratamiento de enfermedades vasculares. El descubrimiento de los anti-miR (oligonucleótidos antisentido con la secuencia reversa complementaria a los miARN) y los miARN- imitación (ARN sintético en el que una hebra es idéntica al mi-ARN maduro y está destinada a imitarlo) han permitido inhibir la actividad de los miRs individuales in vitro e in vivo (131, 132).

Aspectos Moleculares del Envejecimiento celular

Prof. Dr. Raúl Pisabarro

Prof. Agregada Dra. Ana Mariño

Sebastián Rodríguez

El envejecimiento es un proceso irreversible que afecta de forma heterogénea a las células que conforman los seres vivos, las cuales, con el paso del tiempo, se ven sometidas a un deterioro morfofuncional y molecular que genera el proceso apoptótico y lleva a la muerte de la célula individual y en su conjunto en los diferentes órganos y tejidos. (133). En el Uruguay la expectativa de vida al nacer de la población total es de 76, 41 años, hombres: 73, 27 años, mujeres: 79, 66 años (2011) Las bases que sustentan este proceso involutivo son mediadas por factores tanto ambientales, dietéticos y genético moleculares. (134, 135, 136). Según algunas de las teorías más reconocidas sobre el envejecimiento, los seres vivos han sido diseñados para reproducirse, luego involucionar hasta su extinción dado que la evolución ha optado por favorecer la reproducción frente a la inmortalidad. (136). Esto es debido a que la expectativa de vida en los humanos no cruza más allá de la séptima década y, además, a que son muchas las personas de edad que desafortunadamente sufren, en mayor o menor medida, un deterioro de sus capacidades físicas e intelectuales, sobre todo cuando el envejecimiento se acompaña de enfermedades neurodegenerativas como las demencias vasculares, la enfermedad de Parkinson o la de Alzheimer, cuya incidencia aumenta exponencialmente en función de la edad. El envejecimiento no es una enfermedad, y eso explica en parte la resistencia de esta

etapa de la vida a ser definida en forma categórica. Los pacientes de edad avanzada sucumben a enfermedades, entre las cuales cabe destacar las cardiovasculares, las demencias, cáncer, etc. Estas son enfermedades asociadas al envejecimiento, ya que el proceso de deterioro de la capacidad funcional deja al individuo expuesto a que se manifiesten los síntomas característicos de ellas. Finalmente, es importante destacar que la calidad de vida se encuentra desmedrada además por otros factores biológicos tales como la falta de resistencia a infecciones debido a la llamada "inmunosenescencia", (137, 138). El aumento rápido y acelerado de la longevidad es un fenómeno que se está observando a nivel mundial, y no sólo en los países más desarrollados. De hecho, los grupos etarios que demuestran el mayor crecimiento proporcional son justamente aquellos de individuos mayores de 65 años e incluso aquellos mayores a 85 años.

No hay consenso en cuanto a las vías moleculares involucradas, pero al menos en levaduras, se ha propuesto que parte del mecanismo podría incluir la activación de sirtuinas (deacetilasas dependientes de NADH).

Además de la restricción calórica, hay otras vías de estudio en la que el uso de modelos animales puede ser provechoso. Una de ellas es la biología comparada. Interesantemente, el proceso de envejecimiento ocurre de manera similar en muchas especies. *Oryzomys glaberrimus* (naked mole rats) y los murciélagos son mamíferos de tamaño y fisiología similares a los ratones, y sin embargo, tienen una longevidad cercana a los 40 años, más de 10 veces la longevidad de un ratón de laboratorio. El mecanismo que usan para mantener esa longevidad es actualmente desconocido. Hay muchos casos similares en los que el estudio de biología comparada podría dar luces importantes sobre el envejecimiento. La vía genética mejor caracterizada respecto a su efecto en el envejecimiento es la vía de IGF (139). Es así como se ha encontrado que mutaciones en gran parte de los genes que median la transducción de señales a partir de IGF llevan consigo un aumento de la longevidad (media y máxima). Estos resultados han sido confirmados en ratones, aunque aún no ha sido esclarecido si el efecto es realmente a través de IGF, o a través de insulina. Diferentes subpoblaciones de linfocitos T modifican su fenotipo durante el envejecimiento (140), incrementando la proporción de linfocitos T de memoria, esto como una consecuencia de la experiencia inmunológica que se adquiere conforme se incrementa la edad. Este cambio se presenta, tanto en linfocitos T CD4+ como en linfocitos T CD8+. La expresión de marcadores asociados con memoria como CD44 y CD62L (L-selectina) también puede ser modificada. Aunque los linfocitos T con fenotipo de memoria se incrementan con la edad, existe poca evidencia que sugiera que su función es alterada. Sin embargo, uno

de los cambios cualitativos más relevantes que se han descrito en la población de linfocitos T de memoria es la aparición de múltiples expansiones clonales dentro de los linfocitos T CD8+. Asimismo, de manera interesante se ha observado que estas células pierden moléculas co-estimuladoras como CD40L y CD28. La disminución en la expresión de CD28 refleja una respuesta compensatoria que establece el sistema inmunitario durante el envejecimiento para enfrentar la continua estimulación antigénica. El acortamiento en la longitud de los telómeros, así como la pobre respuesta proliferativa, son otras de las características que podemos observar en los linfocitos T CD8+ que han perdido moléculas co-estimuladoras. Linfocitos B, los cambios inmunológicos en el repertorio y desarrollo de los linfocitos B que se han asociado al proceso del envejecimiento incluyen cambios en las especificidades de los anticuerpos, de antígenos extraños hacia autoantígenos, cambios en los isotipos de los anticuerpos, por ejemplo, de inmunoglobulina G (IgG) a inmunoglobulina M (IgM), y cambios en las afinidades de los anticuerpos, de alta a baja afinidad (140).

El hecho de que la producción de anticuerpos dirigidos contra antígenos extraños o exógenos es menor en el adulto mayor que en los individuos jóvenes, llevó a generar la idea de que en la vejez se desarrolla un estado de inmunodeficiencia. Sin embargo, esta inmunodeficiencia no es secundaria a una menor producción de anticuerpos, sino a que los anticuerpos producidos contra antígenos exógenos se encuentran disminuidos, mientras que la producción de anticuerpos dirigidos contra antígenos propios está incrementada. A pesar de la presencia de estos defectos en la inmunidad humoral hacia antígenos exógenos, no se han encontrado alteraciones en la concentración sérica de las inmunoglobulinas (141).

TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO TEORÍA DE RADICALES LIBRES

1. Propuesta por Harman en 1956. La teoría es simple, y estipula que el envejecimiento ocurre como consecuencia del daño acumulativo producido por los radicales libres que se liberan como resultado de la respiración. Hay una extensa literatura que sugiere la validez de dicha teoría, y efectivamente se ha visto en una variedad de modelos animales, que el tratamiento con antioxidantes es beneficioso para la salud del animal, o el desarrollo de enfermedades asociadas al envejecimiento (142). Por otro lado, estudios genéticos no han sido concluyentes, y principalmente negativos respecto a un efecto sobre la longevidad misma. Trabajos iniciales por Sohal y cols. mostraron que en *Drosophila*, la sobreexpresión de superóxido dismutasa más

catalasa lleva a un aumento en la longevidad. Estos estudios han sido difíciles de repetir, incluso por el mismo grupo que los publicó inicialmente. Los radicales libres parecen jugar un rol importante en la patología y fisiología del individuo anciano. Sin embargo, ellos no parecen jugar un rol en el envejecimiento en sí, ya que con algunas excepciones, su manipulación en general no lleva a cambios en la vida media o máxima. El estrés oxidante puede generar un ambiente muy adverso o condiciones extremas en los sistemas biológicos. Un rápido indicador de que el sistema se encuentra en estrés oxidante es el incremento en la respuesta antioxidante y/o un incremento en los niveles de ERO endógenos (141).

2. Senescencia celular, telómeros. En los años 60, L. Hayflick observó que las células de mamífero tenían una longevidad limitada, lo que lo llevó a proponer que ese fenómeno representaba el envejecimiento a nivel celular. Específicamente, el fenómeno observado por Hayflick es que las células en cultivo se pueden multiplicar un número fijo de veces (60-70 en humanos, 8-10 en ratones), y luego de eso se mantenían vivas, pero eran incapaces de proliferar nuevamente. Ahora sabemos que este llamado "fenómeno de Hayflick" o "senescencia celular" ocurre como resultado del acortamiento gradual de los telómeros, que ocurre cada vez que una célula se divide.

3. Células madre y células troncales. Se ha propuesto que el envejecimiento y el descenso en la capacidad de regeneración y respuesta a estrés, podrían ser debidos a un agotamiento en las células troncales (144). Es un tema muy vigente, sobre el cual solamente empezamos a conocer. Muchos tejidos responden a injurias mediante la activación de células troncales locales, tales como las células satelitales del músculo, lo que lleva a la reposición de células dañadas y eliminadas, por ejemplo por apoptosis. Otros tejidos, como el páncreas y el hígado, parecen utilizar un mecanismo diferente, a través del cual células diferenciadas son capaces de desdiferenciarse, proliferar, y re-diferenciarse. Aun en otros casos, tejidos como el corazón son capaces de regenerarse luego de un infarto mediante el reclutamiento de células troncales de la médula ósea. Citogenéticamente, el envejecimiento celular está asociado con cambios celulares importantes, donde se incluyen arresto del ciclo celular, tamaño celular aumentado y/o heterogéneo y una frecuencia elevada de células con aberraciones cromosómicas. Varios estudios han demostrado que las anormalidades cromosómicas, incluyendo la frecuencia de micronúcleos, aumentan progresivamente con la edad en las células somáticas. También es interesante el hecho de que las enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, presenten frecuencias mucho más altas de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica (134).

MANIFESTACIONES DEL ENVEJECIMIENTO A NIVEL CITOGÉNÉTICO

En el caso de la enfermedad de Alzheimer, existe también evidencia de que la frecuencia de células con trisomía 21 es elevada.

La técnica de FISH permite poner de manifiesto acortamiento de telómeros, detección de daños en el ADN. Las principales ventajas de FISH incluyen una alta sensibilidad, una relativa facilidad de realización y el gran número de metafases y/o núcleos interfásicos que se pueden analizar en un corto tiempo. Una forma de encontrar posibles genes relacionados al envejecimiento es la búsqueda de las diferencias genéticas entre los individuos centenarios y los de mediana edad. La mayoría de estos trabajos se han centrado en estudiar genes candidatos genotipificación por medio de polimorfismos de nucleótido simple o SNPs, por sus siglas en inglés y no en el análisis de todo su genoma. Aunque se han descrito diversos polimorfismos en individuos longevos, sólo dos de estos genes (FOXO3A y APOE) se han visto asociados consistentemente con la longevidad en diversas poblaciones (143). La epigenética se define como los cambios en la expresión génica independientes de modificaciones en la secuencia del ADN, y que son potencialmente heredables. A diferencia de la genética donde la entidad de estudio que marca las características de los seres vivos – los genes– se mantiene constante durante el ciclo de vida, los cambios epigenéticos son dinámicos y reversibles. Estos estudios llevarán a la identificación de nuevos biomarcadores que pudieran ser utilizados como índices de la edad fisiológica.

Obesidad y cáncer. Aspectos moleculares

Prof. Dr. Raúl Pisabarro

Prof. Agregada Dra. Ana Mariño

Sebastián Rodríguez

PRÓLOGO

El principal legado de la epidemiología del cáncer parece ser el reconocimiento de que un conjunto de exposiciones exógenas son responsables de la mayoría de los cánceres (Doll y Peto, 1981).

Más de 1 billón de individuos tienen sobrepeso a nivel mundial, y más de 300 millones son obesos, estos datos de la Organización Mundial de la Salud 2003 ya señalaban la importancia de la pandemia de obesidad (1).

Uruguay no escapa a la pandemia. Los datos de la última encuesta nacional de sobrepeso y obesidad (ENSO II, 2009) señalan que más de la mitad de la población tiene sobrepeso y 1 de cada 5 adultos es obeso (2). El ENSO niños subraya que 1 de 4 niños tiene sobrepeso y 1 de cada 10 es obeso (3).

La obesidad es causa conocida de cáncer. Es interesante, que exceptuando el cáncer de mama, el cáncer vinculado a la obesidad predomina en el abdomen, donde predomina la grasa intrabdominal o grasa metabólica, promotora de inflamación crónica, piso de las epidemias cardiometabólicas vinculadas a la insulinoresistencia (4).

En el 2003 investigadores de la Sociedad Americana de Cáncer analizaron datos de obesidad y cáncer en 900, 000 adultos, monito-

rizados durante 16 años (5). Los resultados fueron que la mayoría de las mujeres obesas presentaban un incremento de 62% de morir por cáncer y los hombres un 52%. El rango de cánceres incluyó colorectal, hígado, vesicular biliar, páncreas, esófago, riñón, próstata, mama, útero y ovario. La conclusión fue que el sobrepeso se asociaba a casi el 20% de todas las muertes por cáncer en Estados Unidos.

Tanto en animales como en humanos el cáncer se comporta más agresivamente que en los individuos delgados, esta observación ha llevado a la hipótesis de que la grasa determina un microambiente que facilita su desarrollo.

Es bien conocido que el tejido adiposo expandido determina un estado inflamatorio crónico con reclutamiento de moléculas del sistema inmune que a su vez estimulan el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos para el aporte de oxígeno y nutrientes (6). Este microambiente estimula el crecimiento del cáncer.

En este momento una de las puntas de investigación en obesidad y cáncer es entender más este microambiente para poder bloquear su facilitación en el desarrollo del cáncer.

Investigaciones en el bloqueo de elementos claves de crecimiento del tumor "mamífero", el bloqueo de elementos derivados del adipocito con inflamación: los factores endotróficos, en citoquinas, en pericitos y adipocitos donde crece el tumor. Los avances son promisorios, en los próximos años veremos varios fármacos que combatirán ese microambiente obesógeno promotor y acelerador del cáncer.

INTRODUCCIÓN AL TEMA

La obesidad y el sobrepeso se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud (145). El índice de masa corporal (IMC) es una indicación simple de la relación entre el peso en kg y la talla en metros cuadrados, se utiliza frecuentemente para identificar el sobrepeso y la obesidad en los adultos, tanto a nivel individual como poblacional. Es considerada como uno de los problemas sanitarios más importantes en los países desarrollados (145). Se vincula en forma directa con la aparición de distintas enfermedades como diabetes mellitus tipo 2 y con el incremento del riesgo cardiovascular a través del mecanismo de resistencia a la acción de la insulina, y también con ciertas formas de cáncer (146).

Algunos factores que se han relacionado con el aumento de la incidencia de cáncer en poblaciones obesas, son el metabolismo de azúcar, como por ejemplo, el aumento de la resistencia insulínica, la

hiperinsulinemia crónica y otros factores relacionados con el metabolismo de hormonas esteroideas; y el microambiente inflamatorio del tumor. Por lo tanto, comprender dichos mecanismos nos aportará una nueva visión de la patogénesis del cáncer (147).

Se ha establecido que el sobrepeso, el sedentarismo y su resultado en aumento de la adiposidad corporal, aumenta el riesgo de muchos cánceres. Los mecanismos por los cuales la obesidad afecta la mortalidad y la incidencia del cáncer son mal comprendidos. Sin embargo, se conoce que los adipocitos no solo acumulan energía, sino que también secretan una gran variedad de sustancias bioactivas que pueden afectar los procesos proliferativos. Los elevados acúmulos de grasa corporal también promueven la resistencia insulínica que puede aumentar las hormonas sexuales y puede aumentar el riesgo de padecer cánceres sensibles a hormonas.

MECANISMOS QUE RELACIONAN OBESIDAD Y RIESGO DE CÁNCER

El tejido adiposo constituye un órgano endocrino y metabólicamente activo, que ejerce su efecto en la fisiología de otros tejidos. (148) Entre sus funciones, el tejido adiposo libera ácidos grasos libres, hormonas peptídicas como leptina, adiponectina, resistina y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).

La liberación de estas sustancias produce un aumento en la resistencia a la insulina (un estado metabólico caracterizado por una respuesta reducida por parte del tejido - músculo, hígado, tejido adiposo - a la insulina) y a una hiperinsulinemia compensatoria (149). Existe evidencia creciente epidemiológica y experimental que indica que la exposición crónica a niveles plasmáticos elevados de insulina, aumenta el riesgo de cáncer de colon (150, 152) y endometrio (152), y probablemente otros tumores (por ejemplo, tumores de páncreas o de riñón) (153, 154). Los niveles séricos de factor de crecimiento similar a la insulina - 1 (IGF1); una hormona peptídica que regula la proliferación celular en respuesta a la disponibilidad energética proveniente de la dieta y de las reservas del organismo - también se asocian con diferentes formas de cáncer. Sin embargo, no existe una relación simple directa entre los niveles circulantes de IGF1 y el grado de adiposidad. (155) Además, el tejido adiposo expresa varias enzimas metabolizantes de hormonas esteroideas, siendo una fuente importante de estrógenos circulantes en las mujeres posmenopáusicas. Estos estrógenos se sintetizan a partir de precursores andrógenos, secretados por las gónadas o por las glándulas suprarrenales. El IMC está directamente relacionado a los niveles circulantes de estrona y estradiol (156, 157, 158). En adición a este fenómeno, los

niveles elevados de insulina pueden aumentar la síntesis ovárica y suprarrenal de andrógenos. Este fenómeno de aumento de hormonas esteroideas puede explicar el aumento de riesgo de cáncer de endometrio en todas las mujeres independientemente de su estado estrogénico y de cáncer de mama en mujeres posmenopáusicas. En estos dos tipos específicos de tumores, la experimentación ha demostrado el importante rol de los estrógenos y la progesterona en la regulación celular de la diferenciación, proliferación y la inducción de apoptosis (159, 160). Entre un 4 a 8 % de mujeres posmenopáusicas que tienen obesidad y un incipiente perfil de insulinorresistencia pueden causar o agravar los síndromes del exceso de andrógenos ováricos (síndrome de ovario poliquístico) y deficiencia crónica de progesterona, existe una evidencia sólida de que estos síndromes así como una reducida producción de progesterona aumentan el riesgo de cáncer endometrial.

Actualmente existen numerosos estudios con el fin de verificar la existencia de una vinculación entre estados de obesidad y ciertos tipos de cáncer (161, 162). En base a distintos estudios, la obesidad constituye un factor de riesgo importante para el desarrollo de ciertos tumores malignos como adenocarcinoma de próstata y cáncer colorectal en varones y el de endometriõ, mama y ovario en mujeres (163). La alteración de un interruptor molecular recién descubierto en células de grasa blanca permitió a los ratones de un experimento llevar una dieta alta en calorías, sin llegar a ser obesos o desarrollar resistencia a la insulina, según han publicado en *Cell* científicos del Instituto del Cáncer Dana-Farber. Los investigadores afirman que estos resultados constituyen el primer eslabón molecular conocido entre la termogénesis (quema de calorías para producir calor) y el desarrollo de la inflamación en las células grasas. Los investigadores, dirigidos por Bruce Spiegelman, descubrieron que la proteína TRPV4 es altamente expresada en las células de grasa blanca - que almacenan el exceso de calorías y se congestionan en personas obesas. Los investigadores encontraron que los animales obesos que habían tenido crías con hembras de peso normal mostraban señales moleculares en sus espermios que conducían a la obesidad y a la diabetes hasta dos generaciones después, incluso si la descendencia comía de forma saludable. Es importante tener en cuenta que las características genéticas de la raza humana se han modificado muy poco desde la era paleolítica, desde entonces no se han producido cambios importantes en el genoma, lo que indica que nuestros genes son semejante a los del hombre de esa época. Si tenemos en cuenta este hecho debemos recordar que las situaciones ambientales sí han cambiado sensiblemente así como la elaboración y procesamiento de los alimentos, lo cual parecería estar más vinculado a la aparición de enfermedades crónicas que a una alteración marcada del genotipo.

INFLAMACIÓN, OBESIDAD Y CÁNCER

El ácido araquidónico (AA) es un ácido graso poliinsaturados (AGPI). Se libera por hidrólisis de los lípidos de la membrana por las diferentes isoformas de la fosfolipasa A2. El AA es metabolizado a compuestos biológicamente activos llamados eicosanoides. Los eicosanoides son una familia de mediadores lipídicos biológicamente activos, principalmente generada por dos tipos de enzimas: las ciclooxigenasas y lipoxigenasas. Los eicosanoides son usados para modular ciertos procesos fisiológicos y patológicos. Juegan un papel importante en la Familia de las ciclooxigenasas, vía de la COX, y vía del ácido araquidónico. La COX cataliza la unión de dos moléculas de oxígeno y la formación de endoperoxidos cíclicos, es la enzima limitante en la biosíntesis de prostaglandinas y eicosanoides. La actividad de las enzimas COX-1 y COX-2 se ha demostrado que modulan el crecimiento de tumores al influir en la expresión de moléculas angiogénicas. La COX-2 es sobreexpresada en varios tumores malignos como por ejemplo el cáncer de mama. Tres formas de las enzimas COX están expresadas en los tejidos de mamíferos que son COX-1, COX-2 y COX-3. La COX-1 está implicado en diversos procesos fisiológicos y por lo tanto se llama enzima del "hogar". Mediadores inflamatorios como las citoquinas, factores de crecimiento y endotoxinas bacterianas rápidamente pueden inducir la síntesis de la COX-2, que normalmente es indetectable en los tejidos normales. Sin embargo, la COX-2 se expresa constitutivamente en los riñones, el estómago y el cerebro COX-1 y COX-2 tienen alrededor del 60% de homología. Las longitudes respectivas de los genes de la COX-1 y COX-2 son de 22 Kb y 8.3 kb. El ARN m de la COX-1 tiene una longitud de unos 2,8 Kb, que de la COX-2 aproximadamente 4,0 Kb. La ciclooxigenasa (COX) o también conocida como prostaglandina H sintasa (PGHS), pertenece a la familia de las oxigenasas que son enzimas que catalizan la transferencia y la incorporación directa del oxígeno en una molécula de sustrato. Las COX son glicoproteínas diméricas con un grupo hemo, es una proteína integral de membrana del retículo. La COX cataliza la unión de dos moléculas de oxígeno y la formación de endoperoxidos cíclicos como el PGH que se convierte en las prostaglandinas D, E y F así como el tromboxano (TXA₂) y la prostaciclina (PGI), la COX es la enzima limitante en la biosíntesis de prostaglandinas y eicosanoides. La PGSH posee dos actividades enzimáticas, una actividad ciclo-oxigenasas y una actividad peroxidasa, la COX-3 es una nueva isoforma acetaminofeno-sensibles de la familia de las COX con diferentes propiedades farmacológicas que se han descrito para la COX-3 en comparación con el COX-1 y COX-2, muchos investigadores creen que es una variante de empalme (splicing) de la COX-1. Así, la COX-3 es un producto del gen COX-1, pero conserva un intrón en su ARNm. La COX-3 es una glicoproteína.

Estudios realizados en animales, comparando la actividad de COX-3 con la de la COX-1 y COX-2 indican que los analgésicos como el paracetamol, inhiben selectivamente COX-3, y algunos medicamentos anti-inflamatorios son potentes inhibidores de COX-3. Por lo tanto, la inhibición de la COX-3 podría representar un mecanismo por el cual posiblemente estos medicamentos reduzcan el dolor y la fiebre, carcinogénesis, la proliferación, la adhesión y la angiogénesis celular, la permeabilidad vascular, la inflamación crónica, el aumento de la densidad de las estructuras vasculares linfáticas y el estancamiento de la linfa con una mayor difusión de la misma lo cual tendría un efecto sensiblemente protector y regulador en los pacientes con obesidad. Haremos una breve descripción de los distintos tipos de cánceres y sus relaciones con la obesidad.

CÁNCER DE MAMA

Estudios desde 1970 relacionaban ya las medidas antropométricas y el cáncer de mama (164). Según Veronesi y colaboradores (2005), la edad de la menarquia constituye otro factor de riesgo fundamental en este tipo de tumores. Esto se debe al incremento de adiposidad necesaria para el inicio de la menstruación, que constituye un factor de riesgo de padecer cáncer de mama entre las chicas (165). Por lo tanto, en chicas con sobrepeso y obesidad mórbida dicho riesgo se verá incrementado. Los cambios endocrinos en la obesidad podrían ser causantes del incremento de la prevalencia de neoplasias mamarias en las mujeres obesas (166). Con respecto a la acción de las hormonas, existe una importante asociación entre valores elevados de estrógenos circulantes (característico de individuos obesos) y ciertas neoplasias. Como ya se hemos mencionado, se ha sugerido que la exposición prolongada de ciertas hormonas, principalmente estrógenos e insulina en mujeres obesas, puede ser un factor decisivo. Después de la menopausia, las mujeres obesas presentan un mayor riesgo de padecer cáncer de mama en comparación con aquellas mujeres no obesas. Posiblemente esto se deba a los altos niveles de estrógenos en mujeres obesas, ya que dichos niveles son 50-100% más elevados. Después de la menopausia los ovarios dejan de producir estrógenos, por lo que el tejido adiposo es la principal fuente de hormona. Por lo tanto, tejidos sensibles a los estrógenos, como el parénquima mamario, quedan expuestos a un mayor estímulo en mujeres obesas. De esta manera se aumenta el riesgo de desarrollar neoplasias (167). Otro factor relacionado con la tasa de mortalidades más elevadas por cáncer de mama en mujeres obesas es la dificultad para detectar el tumor, el cual generalmente es detectado en etapas más avanzadas en pacientes con un IMC de 27 kg/m² que en pacientes delgadas (168).

CÁNCER DE COLON

La obesidad podría asociarse con un 30 a un 60 % de riesgo mayor de cáncer colorrectal, donde los mecanismos que asocian a la obesidad y cáncer no están bien entendidos. Tres sistemas hormonales han sido planteados como posibles candidatos: la insulina y el factor de crecimiento (IGF-1), alteraciones de las hormonas sexuales (estrógenos, progesterona y andrógenos) y adipocinas (leptina y adiponectina). Estudios realizados han demostrado que la medición del perímetro de la cintura resulta una medida antropométrica que se comporta como predictor independiente de cáncer de colon por encima del Índice de masa corporal (IMC) (169). El aumento de la circunferencia de la cintura y la relación cintura- cadera (RCC), indicadores de obesidad abdominal, se han asociado fuertemente con riesgo de cáncer en hombres y mujeres (170).

Diversos estudios apoyan el hecho de que la obesidad además de asociarse con el riesgo de cáncer de colon en ambos sexos, también se relaciona con el hecho de que la lesión primaria tenga diámetros de mayor tamaño (adenomas de colon) (171, 172).

Estudios recientes indican que aquellas personas con una dieta rica en fibras, frutas y verduras, tiene menor frecuencia de cáncer de colon. Mientras que las grasas saturadas y el sedentarismo son factores que aumentarían el riesgo.

CÁNCER DE PRÓSTATA

A pesar no poder establecer una estrecha relación entre obesidad y cáncer de próstata, se ha demostrado que los hombres obesos presentan enfermedad avanzada, enfermedad más agresiva, enfermedad recurrente post-prostatectomía radical y tienen mayor riesgo de morir por esta patología (173, 174). Diferentes grupos de investigadores han examinado algunos factores biológicos que estarían relacionados con la obesidad y CaP. Por ejemplo, factores de crecimiento similares a la insulina (IGF1), leptina, adiponectina y otras hormonas. Dichos factores estarían relacionados con la iniciación, progresión y promoción del CaP.

CÁNCER DE ENDOMETRIO

La primera evidencia que planteo una relación entre cáncer y obesidad fue en cáncer de endometrio. Existe evidencia precisa y convincente proveniente de estudios de cohortes controlados que los asocian fuertemente (175). Existe una relación lineal entre el riesgo de desarrollar cáncer endometrial y el aumento de peso o del IMC.

CÁNCER DE CUELLO UTERINO

Estudios recientes encontraron que el riesgo de contraer adenocarcinoma de cérvix aumenta en personas obesas, no así el carcinoma de células escamosas. Además se ha observado que en las mujeres más obesas las consultas ginecológicas tienden a disminuir, por lo que aumenta el riesgo de detectar cáncer en estadios más avanzados (176).

CÁNCER ESOFÁGICO

La obesidad se ha asociado con el aumento de riesgo de desarrollar adenocarcinoma de esófago, no así el de células escamosas. Una posible explicación que se ha propuesto es que la obesidad aumenta el riesgo al asociarse con aumento en la incidencia de reflujo gastroesofágico, sin embargo, otros estudios han demostrado que la asociación entre la obesidad y el adenocarcinoma es independiente del reflujo gastroesofágico (177, 178).

CÁNCER DE HÍGADO

Existen cuatro reportes de una asociación positiva y cinco estudios que reportan lo contrario. Tomándolos en conjunto los resultados de estos estudios indican que la obesidad aumenta el riesgo de cáncer hepático, sin embargo la magnitud del riesgo relativo no es consistente con esta conclusión (162).

CÁNCER DE VESÍCULA BILIAR

La neoplasia de Vesícula biliar aunque es bastante rara. Se ha encontrado consistentemente que la obesidad aumenta su riesgo, ya que la obesidad aumenta el riesgo de coledocistitis, la cual a su vez, causa inflamación crónica. La coledocistitis crónica aumenta el riesgo de cáncer de las vías biliares (162, 179).

CÁNCER GÁSTRICO

Se han realizado asociaciones entre la obesidad y la incidencia de cáncer gástrico en la región cardial, aunque no de una forma tan importante como el adenocarcinoma de esófago, además se desconoce su etiología. No se ha observado un aumento en otras regiones del estómago (180, 181).

Esteatohepatitis no Alcohólica EHNA-(NASH)

Prof. Dr. Raúl Pisabarro

Prof. Agregada Dra. Ana Mariño

Sebastián Rodríguez

En la actualidad, la enfermedad de Hígado Graso No-Alcohólico (EHNA -NASH) es la causa más importante de enfermedad hepática crónica relacionada al aumento en la incidencia de obesidad y diabetes mellitus tipo 2 en la población. Se caracteriza por la presencia de esteatosis simple, depósito graso a nivel de la célula hepática o acumulación intracelular de triacilglicéridos (TAGs), que puede progresar en la evolución y presentar inflamación hepática, diverso grado de movilización fibroblástica con formación de septos fibrosos y cirrosis (181). Se la considera como la manifestación hepática del síndrome metabólico, y su prevalencia en la población general alcanza el 15-20%, con una incidencia del 3% de NASH. En la población obesa es de 76 a 90%, de los cuales alrededor del 35% desarrollará EHNA. La biopsia hepática es un factor clave para el diagnóstico del HGNA, que permite distinguir entre esteatosis simple, EHNA y grado de fibrosis. Para su diagnóstico se debe descartar hepatitis de causa tóxica por drogas, autoinmune, virales, factores hereditarios o metabólicos con depósitos patológicos de diversa índole a nivel de la célula hepática, drogas y toxinas. El desarrollo de la resistencia a la insulina (RI) y del estrés oxidativo se consideran como los principales factores patogénicos del HGNA, los cuales, con la concurrencia de factores nutricionales, pueden determinar el inicio de la esteatosis y su progresión a la EHNA. Los mecanismos implicados en la acumulación de TAGs a nivel hepático y el subsiguiente daño hepatocelular son de carácter multifactorial. En condiciones normales, los ácidos grasos (AGs) son

el principal combustible para el hígado. Sin embargo, en patologías como la obesidad, la gran afluencia de hidratos de carbono y lípidos induce cambios significativos en el metabolismo intermediario en el hígado. Los elevados niveles de insulina (hiperinsulinemia) no son capaces de suprimir el flujo de AGs, mostrando un importante nivel de resistencia periférica a la acción de la insulina. El aumento en el pool de AGs circulantes es uno de los principales factores determinantes en la patogénesis del HGNA (182, 183, 184). En efecto, en forma relativa a los valores controles, el hígado de los pacientes obesos presenta: Disminución en el potencial antioxidante (menor actividad de superóxido dismutasa y contenido de glutatión), aumento en la actividad pro-oxidante (mayor lipoperoxidación, contenido de hidroperóxidos y oxidación de proteínas) (185, 183). Activación de las células de Kupffer (mayor producción del radical superóxido y tasa lipoperoxidativa), parámetros asociados a la disminución de la capacidad antioxidante del plasma e incremento en los niveles de F2-isoprostanos séricos (productos de la peroxidación del ácido araquidónico). Los eicosanoides son mediadores de la inflamación, como la Prostaglandina E2 (PGE2). La observación de que muchos tumores, así como los pacientes obesos con enfermedad hepática esteatótica tienen altas tasas de eicosanoides es un argumento para la función del metabolismo del ácido araquidónico en la oncogénesis y confirma el interés de las enzimas dianas y los receptores responsables de estrategias terapéuticas contra el cáncer. Vía del ácido araquidónico: El ácido araquidónico (AA) es un ácido graso poliinsaturados (AGPI). Se libera por hidrólisis de los lípidos de la membrana por las diferentes isoformas de la fosfolipasa A2. El AA es metabolizado a compuestos biológicamente activos llamados eicosanoides. Los eicosanoides son una familia de mediadores lipídicos biológicamente activos, principalmente generada por dos tipos de enzimas: las ciclooxigenasas y lipoxigenasas. Los eicosanoides son usados para modular ciertos procesos fisiológicos y patológicos. Juegan un papel importante en la carcinogénesis, la proliferación, la adhesión y la angiogénesis celular, la permeabilidad vascular y la inflamación.

Vía de la ciclooxigenasa: Tres formas de las enzimas COX están expresadas en los tejidos de mamíferos que son COX-1, COX-2 y COX-3. La COX-1 está implicado en diversos procesos fisiológicos y por lo tanto se llama enzima del "hogar". Mediadores inflamatorios como las citoquinas, factores de crecimiento y endotoxinas bacterianas rápidamente pueden inducir la síntesis de la COX-2, que normalmente es indetectable en los tejidos normales. Sin embargo, la COX-2 se expresa constitutivamente en los riñones, el estómago y el cerebro. COX-1 y COX-2 tienen alrededor del 60% de homología. Las longitudes respectivas de los genes de la COX-1 y COX-2 es 22 kb y 8.3 kb. El ARNm de la COX-1 tiene una longitud de unos 2,8

kb, que de la COX-2 aproximadamente 4, 0 kb. La ciclo-oxigenasa (COX) ó también conocida como prostaglandina H sintasa (PGHS), pertenece a la familia de las oxigenásas que son enzimas que catalizan la transferencia y la incorporación directa del oxígeno en una molécula de sustrato. Las COX son glicoproteínas dimericas con un grupo hemo, es una proteína integral de membrana del retículo. La COX cataliza la unión de dos moléculas de oxígeno y la formación de endoperoxidos cíclicos como el PGH que se convierte en las prostaglandinas D, E y F así como el tromboxano (TXA2) y la prostaciclina (PGI), la COX es la enzima limitante en la biosíntesis de prostaglandinas y eicosanoides. La PGSH posee dos actividades enzimáticas, una actividad ciclo-oxigenasa y una actividad peroxidasa. La COX-3 es una nueva isoforma acetaminofeno-sensibles de la familia de la COX con diferentes propiedades farmacológicas que se han descrito para la COX-3 en comparación con el COX-1 y COX-2, muchos investigadores creen que es una variante de empalme(splicing) de la COX-1. Así, la COX-3 es un producto del gen COX-1, pero conserva un intrón en su ARNm. La COX- 3 es una glicoproteína. Estudios realizados en animales, comparando la actividad de COX-3 con la de la COX-1 y COX-2 indican que los analgésicos como el paracetamol, inhiben selectivamente COX-3, y algunos medicamentos anti-inflamatorios son potentes inhibidores de COX-3. Por lo tanto, la inhibición de la COX-3 podría representar un mecanismo por el cual posiblemente estos medicamentos reduzcan el dolor, la fiebre y la inflamación crónica. La inflamación crónica es un fenómeno acompañante en la esteatohepatitis que se manifiesta desde infiltrado inflamatorio leve hasta la presencia de células bi o trinucleadas con depósito graso y formación de lipogranulomas. Esto indica la implicancia de la vía de la ciclooxigenas en este proceso inflamatorio. El desbalance redox observado en pacientes obesos representa un fenómeno de estrés oxidativo nutricional, que resulta de la ingesta excesiva y prolongada de combustibles metabólicos (carbohidratos y lípidos) y/o suministro inadecuado de antioxidantes dietarios. El desarrollo de la esteatosis hepática en el paciente obeso es el resultado de múltiples alteraciones metabólicas que ocurren en condiciones de desbalance dietario y que involucran la inducción de estrés oxidativo, RI, junto con niveles alterados de ciertas adipoquinas capaces de influir en la sensibilidad a la insulina, y que puede progresar hacia la EHNA. El diagnóstico de esteatohepatitis solo es posible hacerlo mediante el estudio histológico y es esencial para la evaluación valorar los siguientes para metros histopatológicos: - Esteatosis macrovesicular, - Asociada a infiltrado inflamatorio lobular o portal con o sin cuerpos de Mallory, con o sin fibrosis o cirrosis. En1999 se publica por E. M. Brunt un método para analizar semi-cuantitativamente las lesiones de las esteatohepatitis no alcohólica, que permite la valoración de la actividad necroinflamatorias (grado de actividad) y la extensión de la fibrosis

con o sin cambios de la arquitectura (estadio). Sistema de Grados: GRADO I LEVE: Esteatosis hasta el 30 % de hepatocito vacuolados, balonamiento celular ocasional de la zona 3, escasos linfocitos en el lobulillo y leve o ausente inflamación portal. GRADO II MODERADO: Esteatosis del 34 al 66 %, balonamiento celular de zona 3, leve a moderado, con infiltrado inflamatorio de leve a moderado en el lobulillo y en espacio porta. GRADO III

SEVERO: Esteatosis que ocupa todo el lobulillo, de más del 66%, desarreglo celular evidente a predominio de la zona 3, inflamación crónica del lobulillo o de leve a moderada en espacios porta. Hoy día en la práctica médica diaria, la biopsia hepática es imprescindible La utilidad de la biopsia hepática en la esteatohepatitis no alcohólica, no se limita a su diagnóstico inicial, es fundamental para gradar la intensidad necroinflamatoria y el grado o presencia de septos fibrosos y además permite la valoración de una terapéutica al poder comparar la magnitud de las lesiones. (181)

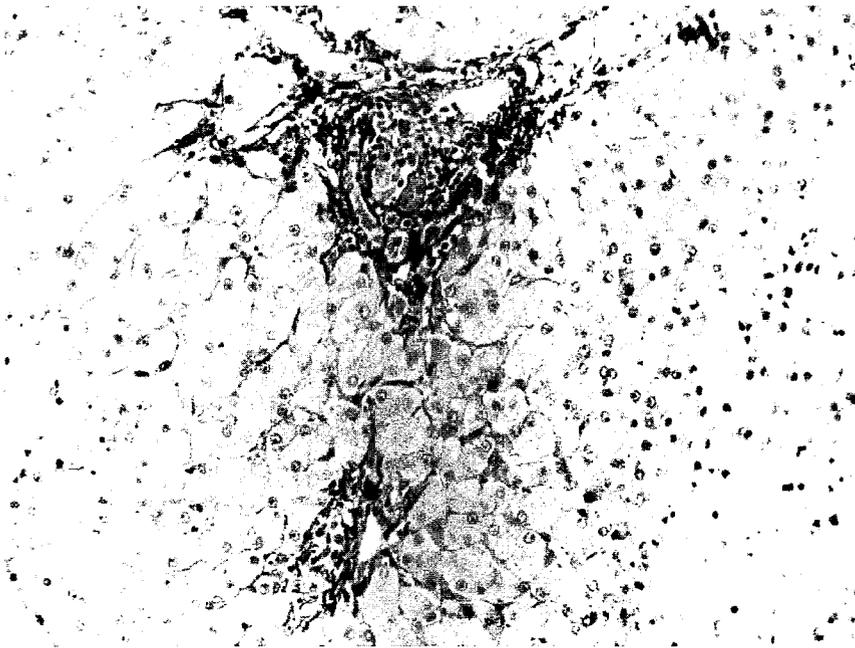
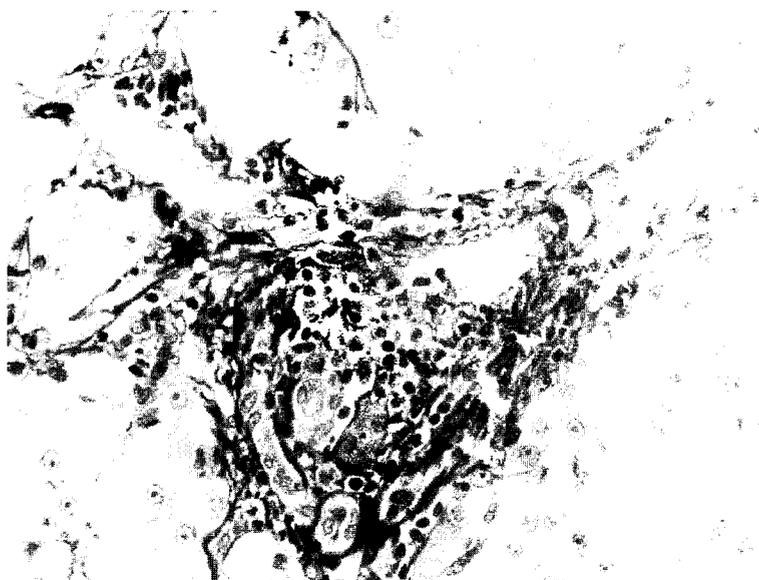
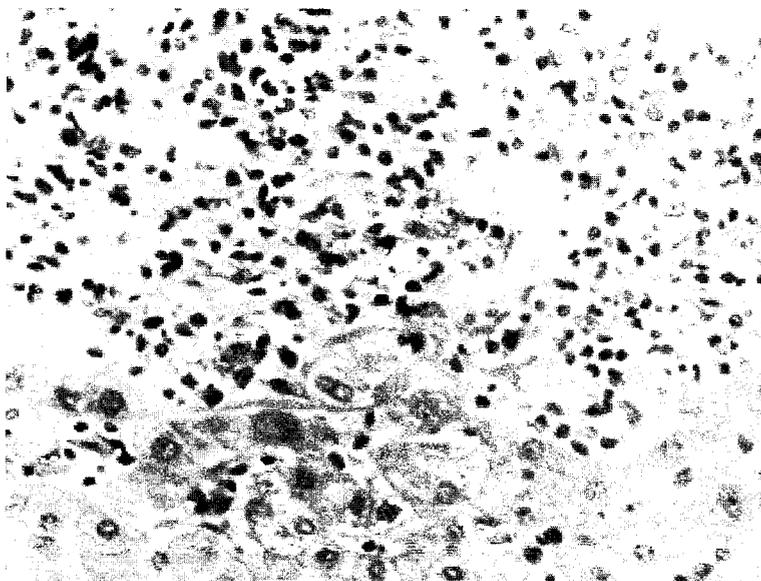


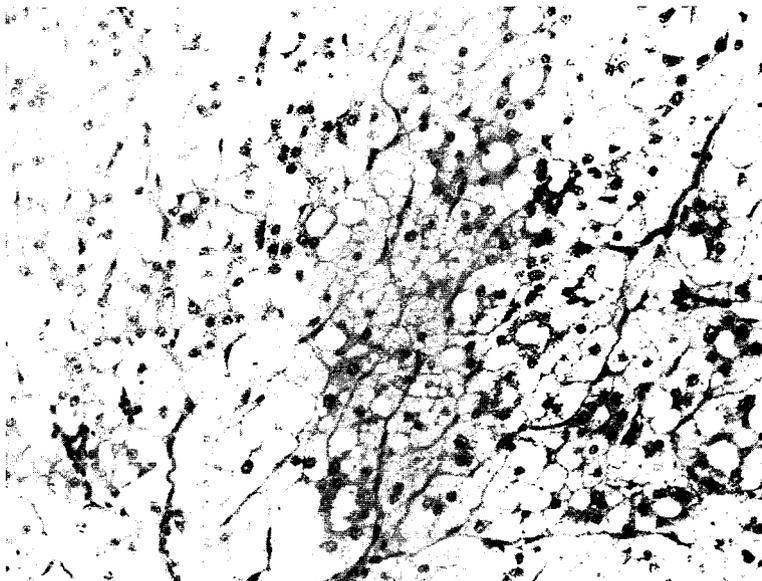
Figura 1 Infiltrado inflamatorio mixto LMN portal con fibrosis de los espacios porta.



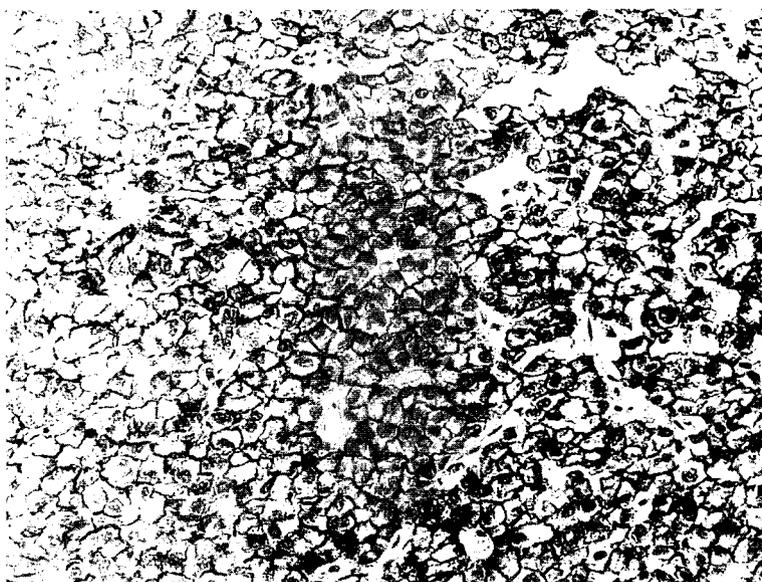
Microfotografía 2 Septos fibrosos de inicio a nivel portal



Microfotografía 3 Necrosis inflamatoria a nivel del espacio porta y lobulillo



Microfotografía 4 Esteatosis Severa NASH



Microfotografía Inmunohistoquímica para lipo A.

Bibliografía

1 - Andreasson, P., Johansson, B., Billstrom, R., Garwicz, S., Mitelman, F., and Hoglund, M. Fluorescence in situ hybridization analyses of hematologic malignancies reveal frequent cytogenetically unrecognized 12p rearrangements. *Leukemia*, 12: 390-400, 1998.

2 - Barrans SL, Evans PA, O'Connor SJ, Owen RG, Morgan GJ, Jack AS. The detection of t(14;18) in archival lymph nodes: development of a fluorescence in situ hybridization (FISH)-based method and evaluation by comparison with polymerase chain reaction. *J Mol Diagn* 2003; 5: 168-175.

3 - Beyer, V., Castagne, C., Muhlematter, D., Parlier, V., Gmur, J., Hess, U., Kovacsovics, T., Meyer-Monard, S., Tichelli, A., Tobler, A., Jacky, E., Schanz, U., Bargetzi, M., Hagemeijer, A., de Witte, T., van Melle, G., and Jotterand, M. Systematic screening at diagnosis of -5/del(5)(q31), -7, or chromosome 8 aneuploidy by interphase fluorescence in situ hybridization in 110 acute myelocytic leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome patients: concordances and discrepancies with conventional cytogenetics. *Cancer Genet. Cytogenet*, 152: 29-41, 2004.

4 Brizard, F., Brizard, A., Guilhot, F., Tanzer, J., and Berger, R. Detection of monosomy 7 and trisomies 8 and 11 in myelodysplastic disorders by interphase fluorescent in situ hybridization. Comparison with acute non-lymphocytic leukemias. *Leukemia*, 8: 1005-1011, 1994.

5 - Cherry, A. M., Brockman, S. R., Paternoster, S. F., Hicks, G. A., Neuberg, D., Higgins, R. R., Bennett, J. M., Greenberg, P. L., Miller, K., Tallman, M. S., Rowe, J., and Dewald, G. W. Comparison of interphase FISH and metaphase cytogenetics to study myelodysplastic syndrome: an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) study. *Leuk.Res.*, 27: 1085-1090, 2003.

6 - Dierlamm J, Baens M, Stefanova-Ouzonova M, y cols. Detection of t(11;18)(q21;q21) by interphase fluorescence in situ hybridization using API2 and MLT specific probes. *Blood* 2000; 96: 2251-2258.

7 - Greenberg, P., Cox, C., LeBeau, M. M., Fenau, P., Morel, P., Sanz, G., Sanz, M., Vallespi, T., Hamblin, T., Oscier, D., Ohyashiki, K., Toyama, K., Aul, C., Mufti, G., and Bennett, J. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 89: 2079-2088, 1997.

8 - Haferlach T, Kern W, Schnittger S, Schoch C. Modern diagnostics in acute leukemias. *Rev Oncol Hematol* 2005; 56(2):223-34.

9 - Haralambieva E, Banham AH, Delsol G, y cols. Detection by the fluorescence in situ hybridization technique of MYC translocations in paraffin-embedded lymphoma biopsy samples. *Br J Haematol* 2003; 121: 49-56.

10 - Haralambieva E, Kleiverda K, Mason DY, Schuurin E, Kluin P. Detection of three common translocation breakpoints in non-Hodgkin's lymphomas by fluorescence in situ hybridization on routine paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol* 2002; 198: 163-170.

11 - Haralambieva E, Schuurin E, Rosati S, y cols. Interphase fluorescence in situ hybridization for detection of 8q24/MYC breakpoints on routine histologic sections: validation in Burkitt lymphomas from three geographic regions. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 40: 10-18.

12 - Hiroaki Takeuchi, Hiroshi Fujita, Fumio Iwasaki, Takako Takeuchi, Ken-Ichi Imadome, Toshika Okumiya, Tomohiro Matsui, and Mutsuo Takahashi. A Case of Epstein-Barr Virus (EBV)-Associated Thymic Carcinoid and Investigation of Existence of EBV-Infected Cells in Thymus and Thymic Tumors. *J. Clin. Microbiol.* 2004 42: 2850-2854.

13 - Jotterand, B. M., Parlier, V., Muhlematter, D., Grob, J. P., and Beris, P. Three new cases of chromosome 3 rearrangement in bands q21 and q26 with abnormal thrombopoiesis bring further evidence to the existence of a 3q21q26 syndrome. *Cancer Genet.Cytogenet.*, 59: 138-160, 1992.

14 - Jüttner, S., M. Vieth, S. Miehle, W. Schneider-Brachert, C. Kirsch, T. Pfeuffer, N. Lehn, and M. Stolte. 2004. Reliable detection of macrolide-resistant *Helicobacter pylori* via fluorescence in situ hybridization in formalin-fixed tissue. *Mod.Pathol.* 17:684-689

15 - Kearney L, Horsley SW. Molecular cytogenetics in haematological malignancy: current technology and future prospects. *Chromosoma.* 2005 114(4):286-94.

16 - Ketterling, R. P., Wyatt, W. A., VanWier, S. A., Law, M., Hodnefield, J. M., Hanson, C. A., and Dewald, G. W. Primary myelodysplastic syndrome with normal cytogenetics: utility of 'FISH panel testing' and M-FISH. *Leuk. Res.*, 26: 235-240, 2002.

17 - Landstrom AP, Tefferi A. Fluorescent in situ hybridization in the diagnosis, prognosis, and treatment monitoring of chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2006 47(3):397-402.

18 - Long H. M., Haigh T. A., Gudgeon N. H., Leen A. M., Tsang C.-W., Brooks, E. Landais, Houssaint E., Lee S. P., Rickinson A. B., and Taylor G. S. CD4+ T-Cell Responses to Epstein-Barr Virus (EBV) Latent-Cycle Antigens and the Recognition of EBV-Transformed Lymphoblastoid Cell Lines. *J. Virol.* 2005 79: 4896-4907.

19 - Martín-Subero JI, Gesk S, Harder L, Grote W, Siebert R. Interphase cytogenetics of haematological neoplasms under the perspective of the novel WHO classification. *Anticancer Res* 2003; 23: 1139-48.

20 - Matsumoto Y, Nomura K, Matsumoto S, y cols. Detection of t(14;18) in follicular lymphoma by dual-color fluorescence in situ hybridization on paraffin-embedded tissue sections. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; 150: 22-26.

21 - Mecucci C, Falzetti D, La Starza R. Metaphase FISH, microdissection, and multicolour FISH. Applications in haematology. *Haematologica*. 1999;84 Suppl EHA-4:98-101.

22 - Nomura K, Yoshino T, Nakamura S, y cols. Detection of t(11;18) (q21;q21) in marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue by using fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 140: 49-54.

23 - Petersen BL, Sorensen MC, Pedersen S, Rasmussen M. Fluorescence in situ hybridization on formalin- fixed and paraffin-embedded tissue: optimizing the method. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004; 12: 259-265.

24 - Rüssmann, H., V. A. J. Kempf, S. Koletzko, J. Heesemann, and I. B. Autenrieth. 2001. Comparison of fluorescent in situ hybridization and conventional culturing for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. *J. Clin. Microbiol.* 39:304-308

25 - Sanz, G. F., Sanz, M. A., and Greenberg, P. L. Prognostic factors and scoring systems in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, 83: 358-368, 1998.

26 - Servi J. C. Stevens, Sandra A. W. M. Verkuijlen, Bambang Hariwiyanto, Harijadi, Jajah Fachiroh, Dewi K. Paramita, I. Bing Tan, Sophia M. Haryana, and Jaap M. Middeldorp. Diagnostic Value of Measuring Epstein-Barr Virus (EBV) DNA Load and Carcinoma-Specific Viral mRNA in Relation to Anti-EBV Immunoglobulin A (IgA) and IgG Antibody Levels in Blood of Nasopharyngeal Carcinoma Patients from Indonesia. *J. Clin. Microbiol.* 2005 43: 3066-3073.

27 - Sole, F., Torrabadella, M., Granada, I., Florensa, L., Vallespi, T., Ribera, J. M., Irriguible, D., Milla, F., and Woessner, S. Isochromosome 17q as a sole anomaly: a distinct myelodysplastic syndrome entity? *Leuk.Res.*, 17: 717-720, 1993.

28 - Steensma, D. P., Dewald, G. W., Hodnefield, J. M., Tefferi, A., and Hanson, C. A. Clonal cytogenetic abnormalities in bone marrow specimens without clear morphologic evidence of dysplasia: a form fruste of myelodysplasia? *Leuk.Res.*, 27: 235-242, 2003.

29 - Sun T, Nordberg ML, Cotelingam JD, Veillon DM, Ryder J. Fluorescence in situ hybridization: method of choice for a definitive diagnosis of mantle cell lymphoma. *Am J Hematol* 2003; 74: 78-84.

30 - Trebesius, K., K. Panthel, S. Strobel, K. Vogt, G. Faller, T. Kirchner, M. Kist, J. Heesemann, and R. Haas. 2000. Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent in situ hybridization. *Gut* 46:608-614

31 - Van Den, B. H. and Michaux, L. 5q-, twenty-five years later: a synopsis. *Cancer Genet.Cytogenet.*, 94: 1- 7, 1997.

32 - Van Den, B. H., Cassiman, J. J., David, G., Fryns, J. P., Michaux, J. L., and Sokal, G. Distinct haematological disorder with deletion of long arm of no. 5 chromosome. *Nature*, 251: 437-438, 1974.

33 - van Dijk, J. P. and de Witte, T. Monitoring treatment efficiency in MDS at the molecular level; possibilities now and in the future. *Leuk. Res.*, 28: 101-108, 2004.

34 - Vassallo JA & Barrios E. II Atlas de Mortalidad por Cáncer en el Uruguay. Comparación de dos quinquenios 1989-1993 y 1994-1998. Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer, Montevideo, 1999.

35 - Naber SP, Smith LL, Wolfge HJ. Role of the frozen tissue bank in molecular pathology. *Diag Mol Pathol* 1992; 1:73-79.

36 - Naber SP. Continuing the role of a frozen-tissue bank in molecular pathology. *Diag Mol Pathol* 1996; 5:253-259.

37 - Haimowitz MD. Practical issues in tissue banking. *Am J Clin Pathol* 1997; 107(Suppl):S75-S81.

38 - Grizzle WE, Aamodt RL, Clausen K, LiVolsi V, Pretlow TG and Qualman S. Providing human Tissue for Research, *Arch Pathol Lab Med* 1998; 122:1065-1076.

39 - Kant, JA, Sobel, M. Genetic research using archival samples: An uncertain future?. *Mol Diag* 1996; 1: 79- 82.

40 - Clausen KP, Grizzle WE, LiVolsi V, Newton WA Jr. and Aamodt R. The Cooperative Human Tissue Network. *Cancer* 1989; 63:1452-1455.

41 - LiVolsi V, Clausen K, Grizzle W, Newton W, Pretlow TG and Aamodt R. The Cooperative Human Tissue Network - An Update. *Cancer* 1993; 71; 1391-1394.

42 - Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology (ADASP). Use of tissue blocks for research. *Human Pathol* 1996; 27: 519-520.

43 - Merz JF, Sankar P, Taube SE, Livolsi V. Use of Human tissues in reseach: Clarifying clinician and researcher roles and information flows. *J Invest Med* 1997, 45: 252-257.

44 - Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, Weiss RA, Liotta LA. Laser capture microdissection. *Science* 1996; 274: 998-1001.

45 - Fink L, Seeger W, Ermert L, Hanze J, Stahl U, Grimminger F, Kummer W, Bohle RM. Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Nature Med* 1998; 4:1329-1333.

46 - Barr FG, Galili N, Holick J, Biegel JA, Rovera G, Emanuel BS. Rearrangement of the PAX3 paired box gene in the paediatric solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat Genet.* 1993;5:15-21.

47 - Galili N, Davis RJ, Fredericks WJ, Mukhopadhyay S, Rauscher FJ, Emanuel BS, et-al. Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat Genet.* 1993;5:230-5.

48 - Panagopoulos I, Mertens F, Isaksson M, Limon J, Gustafson P, Skytting B, et-al. Clinical impact of molecular and cytogenetic findings in synovial sarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2001;31:362-72..

49 - Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Yoshida K, Hida T, Tsuboi M, et-al. Analysis of epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib. *Clin Cancer Res*. 2006;12:5764-9.

50 - Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et-al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004;350:2129-39.

51 - Jackman DM, Yeap BY, Sequist LV, Lindeman N, Holmes AJ, Joshi VA, et-al. Exon 19 deletion mutations of epidermal growth factor receptor are associated with prolonged survival in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib or erlotinib. *Clin Cancer Res*. 2006;12:3908-14.

52 - Cortes-Funes H, Gómez C, Rosell R, Valero P, Garcia-Giron C, Velasco A, et-al. Epidermal growth factor receptor activating mutations in Spanish gefitinib-treated non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol*. 2005;16:1081-6.

53 - Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, et-al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med*. 2009;361:958-67.

54 - Mitsudomi T, Kosaka T, Endoh H, Horio Y, Hida T, Mori S, et-al. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene predict prolonged survival after gefitinib treatment in patients with non-small-cell lung cancer with postoperative recurrence. *J Clin Oncol*. 2005;23:2513-20.

55 - Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et-al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004;304:1497-500.

56 - Morita S, Okamoto I, Kobayashi K, Yamazaki K, Asahina H, Inoue A, et-al. Combined survival analysis of prospective clinical trials of gefitinib for non-small cell lung cancer with EGFR mutations. *Clin Cancer Res*. 2009;15:4493-8.

57 - Li D, Shimamura T, Ji H, Chen L, Haringsma HJ, McNamara K, et-al. Bronchial and peripheral murine lung carcinomas induced by T790M-L858R mutant EGFR respond to HKI-272 and rapamycin combination therapy. *Cancer Cell*. 2007;12:81-93.

58 - Taylor CR. The WHO classification of lymphomas: cost effective Immunohistochemistry using a deductive reasoning "Decision Tree" approach. Review Part I. *Appl Immunohistochem Mol Morph*. 2009. In press.

59 - Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO classification of tumors of the haematopoietic and lymphoid tissues. IARC. Geneva: WHO Press; 2008.

60 - Lee Y, Terry R, Lukes RJ. Lymph node biopsy for diagnosis: a statistical study. *J Surg Oncol*. 1980;14:53-60.

61 - Robb-Smith AHT, Taylor CR. Lymph Node Biopsy. Oxford: Oxford University Press; 1980.

62 - Isaacson PG. Haematopathology practice: the commonest problems encountered in consultation practice. *Histopathology*.2007;50:821-834.

63 - Yousen S, Weiss L, Warnke R. Primary mediastinal nonHodgkin´s lymphomas: a morphologic and immunologicstudy of 19 cases. *Am J Clin Pathol* 1985; 83: 676-80.

64 - Suster S. Primary large-cell lymphomas of the mediastinum. *Semin Diagn Pathol* 1999; 16: 51-64.

65 - Davis R, Dorfman R, Warnke R. Primary large-celllymphoma of the thymus: a diffuse B-cell neoplasmpresenting as primary mediastinal lymphoma. *Hum Pathol* 1990; 21: 1262-8.

66 - Sander C, Jaffe E, Gebhardt F, Yano T, Medeiros L. Mediastinal lymphoblastic lymphoma with an immatureB-cell immunophenotype. *Am J Surg Pathol* 1992; 16:300-5.

67 - Petersdorf S, Wood D. Lymphoproliferative disorderspresenting as mediastinal neoplasms. *Semin ThoracCardiovasc Surg* 2000; 12: 290-300.

68 - Sankaranarayanan R, Budukh AM, Rajkumar R. Effective screening programmes for cervical cancer in low- and middle-income developing countries. *Bull World Health Organ* 2001; 79: 954-962.

69 - Hutchinson ML, Lapidus SN, Inhorn SL, Papillo J. A perspective on modern quality control methods.*Acta Cytol* 1996; 40: 837-841.

70 - Hutchinson ML. Assessing the costs and benefits of alternative rescreening strategies. *Acta Cytol* 1996; 40: 4-8.

71 - Ashton PR. American Society of Cytotechnology quality assurance survey data: Summary report. *Acta Cytol* 1989; 33: 451-454.

72 - Naryshkin S. The false-negative fraction for Papanicolaou smears: How often are "abnormal" smears not detected by a "standard" screening cytologist? *Arch Pathol Lab Med*1997; 121: 270-272.

73 - Eren, E.; Aytac, U.; Tetik, E.; Akman, O.; Kansu, E.; Gunduz, U. Detection of BCR-ABL gene rearrangement and the elimination of rearranged clone in chronic myelocytic leukemia patients. *Am. J. Hematol.*, 63:85-9, 2000.

74 - Faderl, S.; Talpaz, M.; Estrov, Z.; O'Brien, S.; Kurzrock, R. & Kantarjian, H. The biology of chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 341:164-172, 1999.

75 - Heisterkamp, N.; Stam, K.; Groffen, J.; De Klein, A.; Grosveld, G. Structural organization of the BCR gene and its role in the Ph translocation. *Nature*, 315:758-61, 1985.

76 - Kawaguchi, Y.; Jinnai, I.; Nagai, K.; Yagasaki, F.; Yakata, Y.; Matsuo, T.; Kuriyama, K. & Tomonaga, M. Effect of a selective Abl tyrosine kinase inhibitor, ST1571, on in vitro growth of BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia.*, 15:590-4, 2001.

77 - Laurent, E.; Talpaz, M.; Kantarjian, H. & Kurzrock, R. The BCR gene and Philadelphia chromosome positive leukemogenesis. *Cancer Res.*, 61:2343-55, 2001.

78 - Lisker, R. El cromosoma Philadelphia. En: Ruiz-Argüelles GJ, San Miguel JF. Actualización en Leucemias. México, Panamericana, 1996. pp97-106

79 - MING SC: Adenocarcinoma and other Malignant Epithelial Tumors of the Stomach. In Ming and Goldman (ed): *PATHOLOGY OF THE Gastrointestinal TRACT* W. Saunders Philadelphia 1992; 584 - 374.

80 - REGISTRO DE CÁNCER DE LIMA METROPOLITANA (ed) Cáceres G. V.II 1998 pp 41 - 43 3. EL CÁNCER EN TRUJILLO (ed) Albuja P. Inf III pp 8 - 11 Talleres del Centro Papelero del Norte S.A.

81 - ONCOLOGÍA Manual de la Sociedad Americana del Cancer. Segunda Edición (eds) Murphy G, Laurence W, Lenhard R. 1996; 8 - 9

82 - YOSHIDA S. Endoscopic Diagnosis and Treatment of Early Cancer in the Alimentary Tract *Digestion* 1998; 59: 502 - 508

83 - ARENAS J, MONTALVO I, Y TEJADA A, CARCINOMA GÁSTRICO Y OTROS TUMORES MALIGNOS DEL ESTÓMAGO. En Berenguer J, (ed) *Gastroenterología y Hepatología ELSEVIER SCIENCE* Madrid 2002; 204 - 215.

84 - Tierney L, McPhee SJ, Papadakis MA y col. Tumores malignos del estómago. Diagnóstico clínico y tratamiento. 35ª ed. p.585-586. 85 - Corral VB. Cáncer gástrico, estado actual. *Cirujano General*.1999; 21.

85 - Flejou JF, Paraf F, Muzeau F, et al. Expression of c-erbB-2 oncogene product in Barrett's adenocarcinoma: pathological and prognostic correlations. *Journal of Clinical Pathology* 1994;47(1):23-26.

86 - Brien TP, Odze RD, Sheehan CE, McKenna BJ, and Ross JS, Her-2/neu gene amplification by FISH predicts poor survival in Barrett's esophagus-associated adenocarcinoma. *Human Pathology* 2000;31(1):35-39.

87 - OSTERLIND A. Epidemiology on malignant melanoma in Europe. *Acta Oncol* 1992; 31: 903-908.

88 - RODENAS JM, DELGADO M, HERRANZ MT, TERCEDOR J, SERRANO S. Sun exposure pigmentary traits and risk of cutaneous malignant melanoma: a case-control study in a Mediterranean population. *Cancer Causes Control* 1996; 7: 275-283.

89 - BOYLE P, MAISONNEUVE P, DORÉ FJ. Epidemiology of malignant melanoma. *Br Med Bull* 1995; 51: 523-547.

90 - SWERLICK RA, CHEN S. The melanoma epidemic: more apparent than real? *Mayo Clin Proc* 1997; 72: 559-564.

91 - GREENE MH. The genetics of hereditary melanoma and nevi. 1998 update. *Cancer* 1999; 86: 1644- 1657.

92 - Alonso O. Impacto clínico de la tomografía de emisión por positrones (PET) en pacientes oncológicos y su potencial aplicación en el contexto sanitario y académico nacional. *Rev Med Urug* 2006; 22: 169-178.

93 - Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116:281-97.

94 - Angulo M, Lecouna E, Sznajder J. Rol de los microARN en las enfermedades pulmonares. *Arch Bronconeumol*. 2012;48(9):325-330.

95 - Prado D, Aparicio A. El papel de los micro ARN en el cancer.

96 - RNA de interferencia y su potencial terapéutico en cáncer. *Revista clínica/ vol 62, Num 1./ Enero- Febrero,2010/pp 81-90*.

97 - Vázquez-Ortiz G, Piña-Sánchez P, Salcedo M. Grandes alcances de los RNAs pequeños, RNA de interferencia y microRNA. *Rev Invest Clín* 2006; 58: 335-49.

98 - Baulcombe D. RNA silencing in plants. *Nature* 2004; 431: 356-63.

99 - Cai X., Hagedorn C.H., Cullen B.R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function mRNAs. 2004. *RNA*. 10, 1957-1966

100 - Kim V.N. Micro RNA biogénesis: coordinated cropping and dicing. 2005. *Nat. Rev. Mol. Cell boil*. 6, 376 - 385.

101 - Lund E., Guttinger S., Calado A., Dahlberg J.E., Kutay U. Nuclear export of micro RNA precursors.2004. *Science*, 303, 95-98.

102 - Salido-Guadarrama I., Rangel-Escareño C., Garcia-Tobilla P., Solorzano-Rosalea S., Miranda-Ortiz H., Rodriguez-Dorante M. Papel de los androgenos en el desarrollo de cancer de prostate.

103 - Ro S., Park C., Young D., Sanders K.M., Yan W. Tissue-dependent paired expression of miRNAs. 2007. *Nucleic Acids Res*. 35, 5944-5953.

104 - Brennecke J., Stark A., Russell R.B., Cohen S.M., Principles of microRNA-target recognition. *PLoS.Biol*. 3, e85.

105-Rajewsky N., Socci N.D. Computational identification of microRNA targets. *Dev.Biol*. 267,529-535.

106 - Filipowicz W., Bhattacharyya S.N. Mechanism of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat.Rev.Genet*.9, 102-114.

107 - Liu J., Valencia-Sanchez M.A., Hannon J.G., Parker R. Micro RNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian p-bodys. 2005. *Nat. Cell Biol*. 7, 719-723.

108 - Vasudevan S., Tong Y., Steitz J.A. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. 2007. *Science* 318, 1931-1934.

109 - Prado D., Aparicio A. El Papel de los micro ARNs en el Cancer: desarrollo y potencialidad terapéutica. Buenos Aires; Madrid: Medica Panamericana. cop.2010 X, 128 p. ISBN 978-84-9835-315-0.

110 - Iorio M.V., Croce C.M. MicroRNAs in Cancer: small molecules with a huge impact. 2009. *Journal of Clinical Oncology*. 27, 5848-5856.

111 - He L., Hannon G.J. MicroRNAs: Small RNAs With a Big Role in Gene Regulation. 2004. *Nat. Rev.Genet.* 5,522-531.

112 - Lin P.Y., Yu S.L, Yang P.C. MicroRNA in lung cancer. 2010. *Br J Cancer.* 103, 1144-1148.

113 - Takamizawa J., Konishi H., Yanagisawa K., Tomida S., Osada H., Endoh H., et. al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. 2004. *Cancer Res.* 64, 3753-3756.

114 - Cowland, J. B.; Hother, C. H. R. I.; Gronbaek, K. I. R. S. MicroRNAs and Cancer. *APMIS* 2007, 115, 1090-1106.

115 - Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down- regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia.*Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 15524-9.

116 - Visone R, Croce CM. MiRNAs and Cancer. *Am J Pathol* 2009; 174: 1131-8.

117 - Esquela-Kerscher, A.; Slack, F. J. Oncomirs [Mdash] MicroRNAs With a Role in Cancer. *Nat Rev Cancer* 2006, 6, 259-269.

118 - Cowland, J. B.; Hother, C. H. R. I.; Gronbaek, K. I. R. S. MicroRNAs and Cancer. *APMIS* 2007, 115, 1090-1106.

119 - Johnson S.M., Grosshans H., Shingara J., Byrom M., Jarvis R., Cheng A., Labourier E., Reinert K.L., Brown D., Slack F.J. The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res.*67,7713-7722.

120 - Hayashita Y., Osada H., Tatematsu Y., Yamada H., Yanagisawa K., Tomida S.,Yatabe Y., Kawahara K., Sekido Y., Takahashi T. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.* 65, 9628-9632.

121 - Liu X, Sempere LF, Ouyang H, Memoli VA, Andrew AS, Luo Y, et al. MicroRNA-31 functions as an oncogenic microRNA in mouse and human lung cancer cells by repressing specific tumor suppressors. *J Clin Invest.* 2010;120:1298-309.

122 - Seike M, Goto A, Okano T, Bowman ED, Schetter AJ, Horikawa I, et al. MiR-21 is an EGFR-regulated anti-apoptotic factor in lung cancer in never smokers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:12085-90

123 - Esquela-Kerscher, A.; Slack, F. J. Oncomirs [Mdash] MicroRNAs With a Role in Cancer. *Nat Rev Cancer* 2006, 6, 259-269.

124 - Hutvágner G, Simard MJ, Mello CC, Zamore PD. Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol* 2004; 2(4): E98.

125 - Meister G, Landthaler M, Dorsett Y, Tuschl T. Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA- induced RNA silencing. *RNA* 2004; 10: 544-50.

126 - Wang Z. MicroRNA: A matter of life or death. *World J Biol Chem.* 2010 Apr;1(4):41-54. PubMed PMID: 21537368. Pubmed Central PMCID: PMC3083949. eng.

127 - Wong TS, Liu XB, Wong BY, Ng RW, Yuen AP, Wei WI. Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. *Clin Cancer Res.* 2008 May;14(9):2588-92. PubMed PMID: 18451220. eng.

128 - Zhu W, Qin W, Atasoy U, Sauter ER. Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects. *BMC Res Notes.* 2009;2:89. PubMed PMID: 19454029. Pubmed Central PMCID: PMC2694820. eng.

129 - Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, Wentzel EA, Montgomery CL, Hwang HW, et al. Therapeutic microRNA Delivery Suppresses Tumorigenesis in a Murine Liver Cancer Model *Cell* 2009; 137: 1005-17.

130 -Skrzypski M, Dziadziuszko R, Jassem J. MicroRNA in lung cancer diagnostics and treatment. *Mutat Res.* 2011;717:25-31.

131 - Small EM, Frost RJ, Olson EN. MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease. *Circulation.* 2010 Mar;121(8):1022-32. PubMed PMID: 20194875. Pubmed Central PMCID: PMC2847432. eng.

132 - Morrissey EE. The magic and mystery of miR-21. *J Clin Invest.* 2010 Nov;120(11):3817-9. PubMed PMID: 20978356. Pubmed Central PMCID: PMC2964999. eng.

133 - Warner HR, Hodes RJ, Pocinki K. What does cell death have to do with aging? *JAGS* 1997; 45: 11406.

134 - Peinado MA. Histology and histochemistry of the aging cerebral cortex:an overview. *Microscopy Res Tech* 1998; 43: 17.

135 - Nagley P, Wei YH. Ageing and mammalian mitochondrial genetics. *Trends Genet* 1998; 14: 5137.

136 - Jazwinski SM. Genetics of longevity. *Exp Gerontol* 1998; 33:77383.

137 - Jazwinski SM. The RAS genes: a homeostatic device in *Saccharomyces cerevisiae* longevity. *Neurobiol Aging* 1999; 20: 4718.

138 - Kirkwood TB, Rose MR. Evolution of senescence: late survival sacrificed for reproduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1991;332: 1524.

139 - Rose MR. Can human aging be postponed? *Sci Am* 1999; 281:5. Barzilai A. The contribution of the DNA damage response to neuronal viability. *Antioxid Redox Signal*,2007;9:211-218.6. Budanov AV, Sablina AA, Feinstein E, Koonin EV, Chumakov PM. Regeneration of peroxiredoxins by p53- regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. *Science*, 2004;304:596-600.

140 - Chen SK, Hsieh WA, Tsai MH et al. Age-associate decrease of oxidative repair enzymes, human 8-oxoguanine DNA glycosylases (hOgg1), in human aging. *J Radiat Res*, 2003;44: 31-35.6. Yu S, Abel L, Globerson A. Thymocyte progenitors and T cell development in aging. *Mech Ageing Dev* 1997;94:103-111.

141 - Pérez V, Sierra F. Biology of aging. 2009. *Revista Médica de Chile* v.137: 296-302.

142 - Cadenas E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors*, 1997;6:391-397.

143 - Chung HY, Cesari M, et al. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age related disease. *Ageing Res Rev*, 2009;8 (1):18-30.

144 - Ruzankina Y, Brown EJ. Relationships between stem cell exhaustion, tumour suppression and ageing. *Br J Cancer* 2007; 97: 1189-93.

145 - Organización Panamericana de la Salud. *Obesidad y sobrepeso. Report of a WHO Consultation on Obesity. World Health Organization (WHO). Nota descriptiva No. 311; 2000.*

146 - Bray GA. *Obesidad. Organización Panamericana de la Salud, Instituto Internacional de Ciencias de la Vida. Conocimientos actuales sobre nutrición. Washington, DC: OPS, ILSI; 1997. p. 27-33.*

147 - Zosia Chustecka, Désirée Lie. Excess Body Weight Increases Risk for Many Cancers CME/CE. *Lancet*. 2008;1371:536-7.

148 - Monge T.S., Sanchez E.L. *Obesidad y cáncer: Un enfoque epidemiológico. 2009. Revista Medica De Costa Rica Y Centroamerica LXVI (587) 27-32.*

149 - Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(8):579-591.

150 - Rajala MW, Scherer PE. Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 2003; 144(9):3765-3773.

151 - Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2000; 21(6):697-738.

152 - Giovannucci E. Insulin and colon cancer. *Cancer Causes Control* 1995; 6(2):164-179.

153 - Keown-Eyssen G. Epidemiology of colorectal cancer revisited: are serum triglycerides and/or plasma glucose associated with risk? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3(8):687-695.

154 - Kaaks R, Lukanova A, Kurzer MS. Obesity, endogenous hormones, and endometrial cancer risk: a synthetic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11(12):1531-1543.

155 - Lindblad P, Chow WH, Chan J et al. The role of diabetes mellitus in the aetiology of renal cell cancer. *Diabetologia* 1999; 42(1):107-112.

156 - Weiderpass E, Partanen T, Kaaks R et al. Occurrence, trends and environment etiology of pancreatic cancer. *Scand J Work Environ Health* 1998; 24(3):165-174.

157 - Kaaks R, Lukanova A. Energy balance and cancer: the role of insulin and insulin-like growth factor-I. *Proc Nutr Soc* 2001; 60(1):91-106.

158 - Key TJ, Allen NE, Verkasalo PK, Banks E. Energy balance and cancer: the role of sex hormones. *Proc Nutr Soc* 2001; 60(1):81-89.

159 - Key TJ, Appleby PN, Reeves GK et al. Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(16):1218-1226.

160 - Tchernof A, Despres JP. Sex steroid hormones, sex hormone-binding globulin, and obesity in men and women. *Horm Metab Res* 2000; 32(11-12):526-536.

161 - Dickson RB, Stancel GM. Estrogen receptor-mediated processes in normal and cancer cells. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2000;(27):135-145

162 - Key TJ, Pike MC. The dose-effect relationship between 'unopposed' oestrogens and endometrial mitotic rate: its central role in explaining and predicting endometrial cancer risk. *Br J Cancer* 1988; 57(2):205-212.

163 - Remesar X, Rafecas I, Alemany M, Fernández López JÁ. La obesidad ¿factor de riesgo para el cáncer? *Nutrición y Obesidad* 2000; 3: 194-01.

164 - Bray George. The underlying basis for obesity: relationship to cancer. *The Journal of Nutrition* 2002; 132: 3451S-455S.

165 - Aguilar M.^a J, González J, Garcia A.P, Álvares F, Padilla C.A, Guisado R, Rizo M. *Nutr Hosp.* 2011;26(4):899-903 ISSN 0212-1611.

166 - Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003; 348(17):1625-1638.

167 - Crum C, Lester S, Cotran R. Aparato genital femenino y la mama. Robbins S. Kumar V., Cotran R. *Patología Humana 6ª edición.* México D.F. Mc Graw Hill, 1998; 679-704.

168 - Amaral P, Miguel R, Mehdad A, Cruz C, Monteiro Grillo I, Camilo M, Ravasco P. Body fat and poor diet in breast cancer women. *Nutr Hosp* 2010; 25: 456-61.

169 - Beral V. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 2003; 362 (9382): 419-27.

170 - Chagpar A.B, McMasters K.M, Saul J, Nurko J, Martin RC 2nd, Scoggins C.R, Edwards M.J. Body mass index influences palpability but not stage of breast cancer at diagnosis. 2007. *American Surgery* 73(6): 555-60.

171 - Calle E.E. Obesity and cancer. *BMJ.* 2007;335:1107-8.

172 - Frezza EE, Wachtel MS, Chiriva-Internati M. Influence of obesity on the risk of developing colon cancer. *Gut.* 2006;55:285-91.

173 - Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(8):579-591. (3)

174 - Amling CL, Riffenburgh RH, Sun L et al. Pathologic variables and recurrence rates as related to obesity and race in men with prostate cancer undergoing radical prostatectomy. *J Clin Oncol* 2004; 22(3):439-445.

175 - Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Height, body weight, and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6(8):557-563.

176 - Kaaks R, Lukanova A, Kurzer MS. Obesity, endogenous hormones, and endometrial cancer risk: a synthetic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11(12):1531-1543.

177 - Lew EA, Garfinkel L. Variations in mortality by weight among 750,000 men and women. *J Chronic Dis* 1979; 32(8):563-576.

178 - Chow WH, Blot WJ, Vaughan TL et al. Body mass index and risk of adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90(2):150-155.

179 - Lagergren J, Bergstrom R, Adami HO, Nyren O. Association between medications that relax the lower esophageal sphincter and risk for esophageal adenocarcinoma. *Ann Intern Med* 2000; 133(3):165-175.

180 - Lew EA, Garfinkel L. Variations in mortality by weight among 750,000 men and women. *J Chronic Dis* 1979; 32(8):563-576.

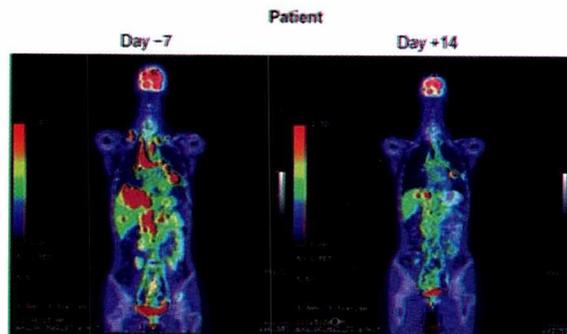
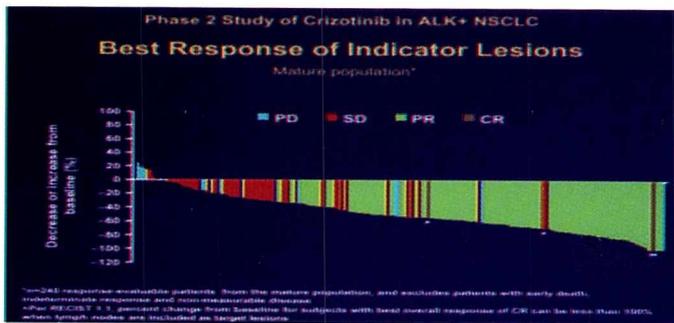
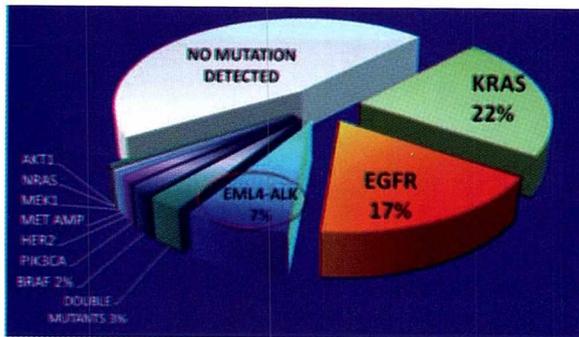
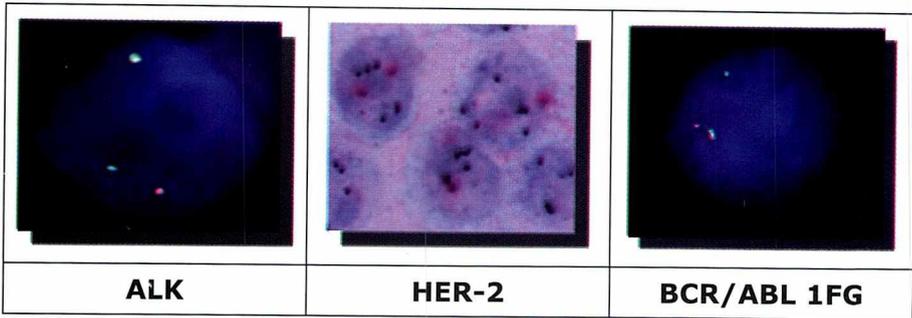
181 - Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology*. 2006 Feb;43(2 Suppl 1):S99-S112. | CrossRef | PubMed |

182 - Videla LA, Rodrigo R, Araya J, Poniachik J. Insulin resistance and oxidative stress interdependency in non-alcoholic fatty liver disease. *Trends Mol Med*. 2006 Dec;12(12):555-8. Epub 2006 Oct 17. | CrossRef | PubMed |

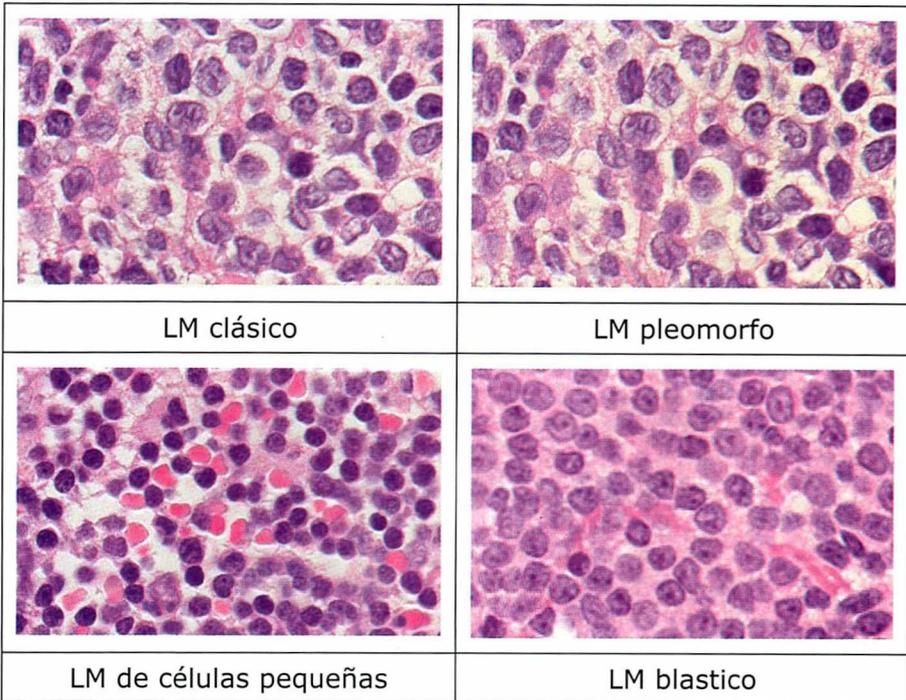
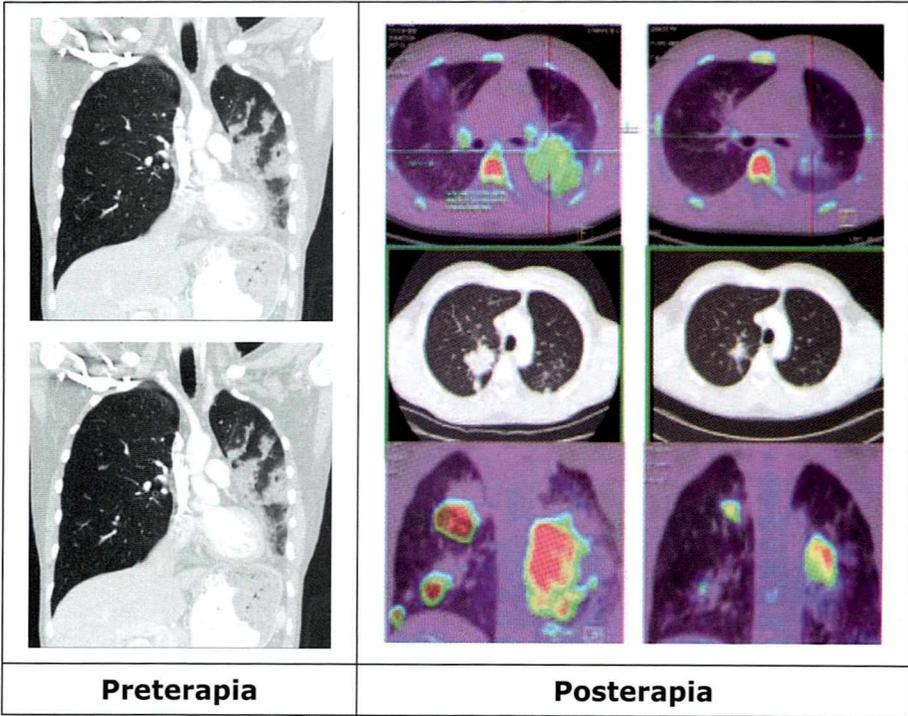
183 - Clarke SD. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. I. Molecular mechanism for polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001 Oct;281(4):G865-9. | PubMed

184 - Anderson N, Borlak J. Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis. *Pharmacol Rev*. 2008 Sep;60(3):311-57. | CrossRef | PubMed |

185 - Aronis A, Madar Z, Tirosh O. Mechanism underlying oxidative stress-mediated lipotoxicity: exposure of J774.2 macrophages to triacylglycerols facilitates mitochondrial reactive oxygen species production and cellular necrosis. *Free Radic Biol Med*. 2005 May 1;38(9):1221-30. | CrossRef | PubMed |

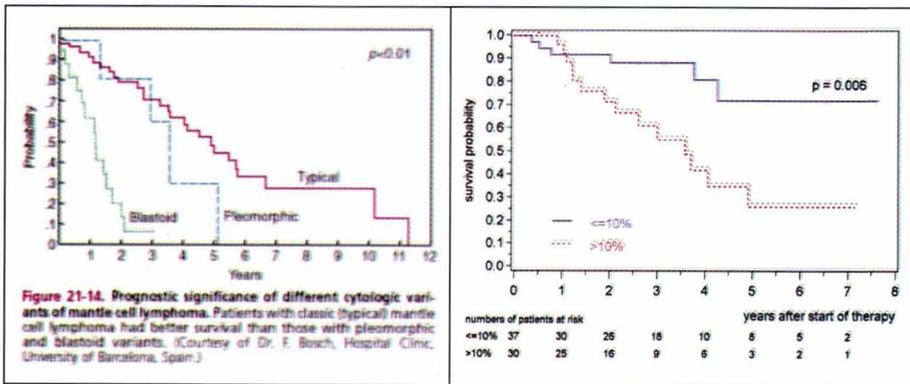


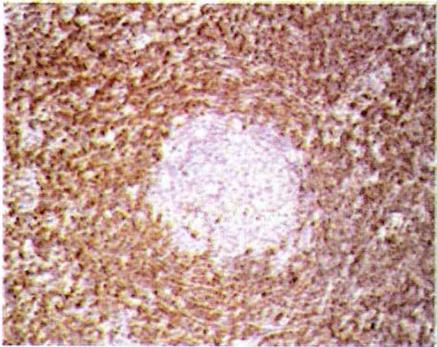
* 3D dramatic response to crizotinib in ALK+ metastatic NSCLC patient.



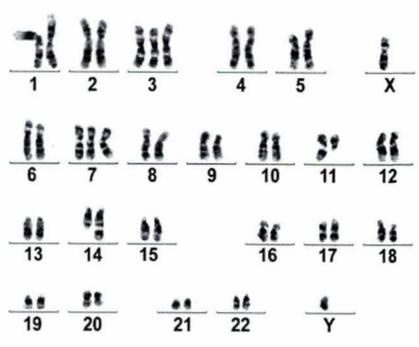
Fotos: Dr. Wolfran Klaper, de Kiel.

LINFOMA DEL MANTO SOBREVIDA

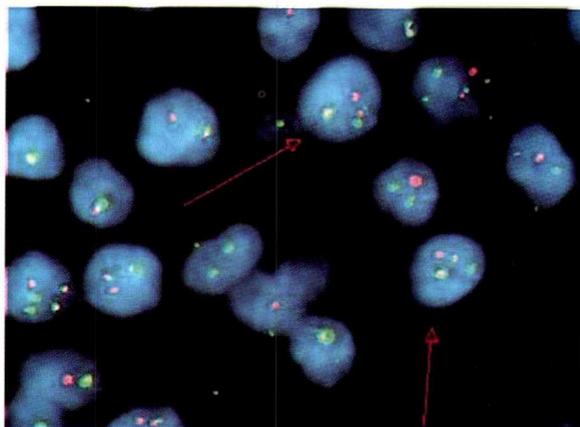




Histología del LM

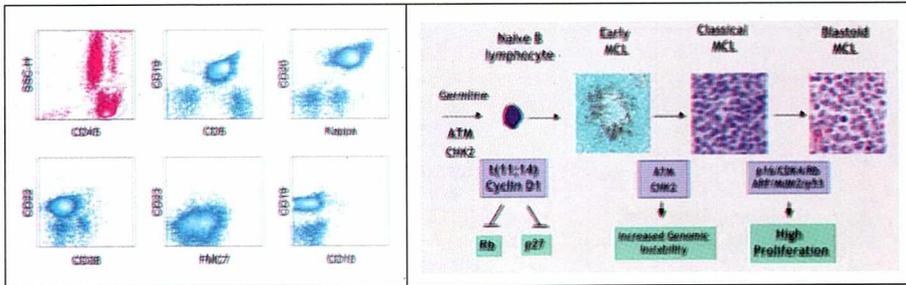


TRASLOCACION t(11;14) en LM

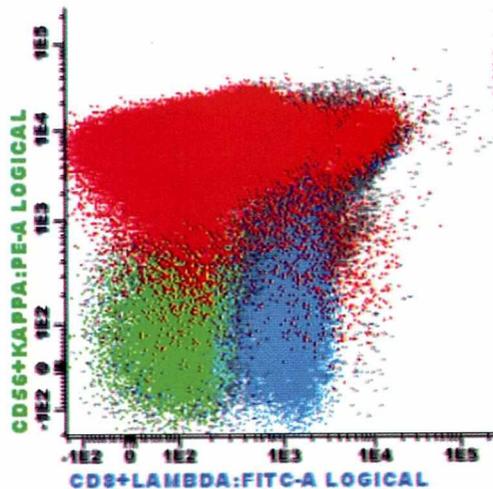
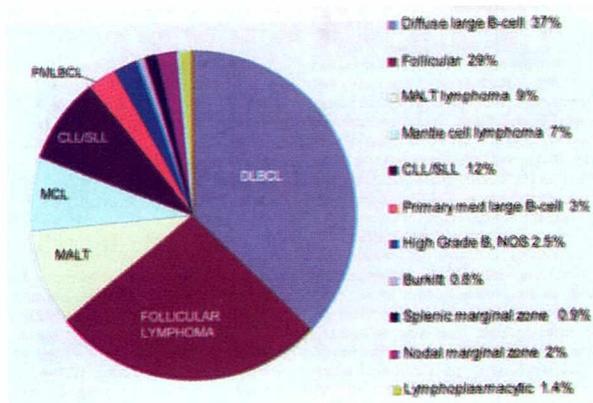


Técnica de FISH t(11;14)

Citometría de flujo (esquema)



Linfomas representados según su frecuencia



Translocación de los cromosomas 9 y 22

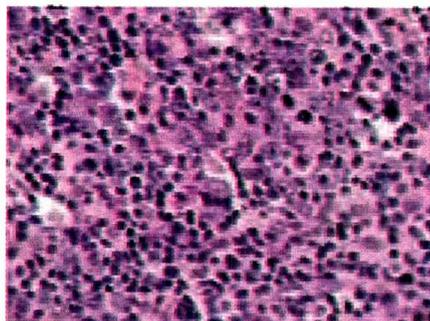
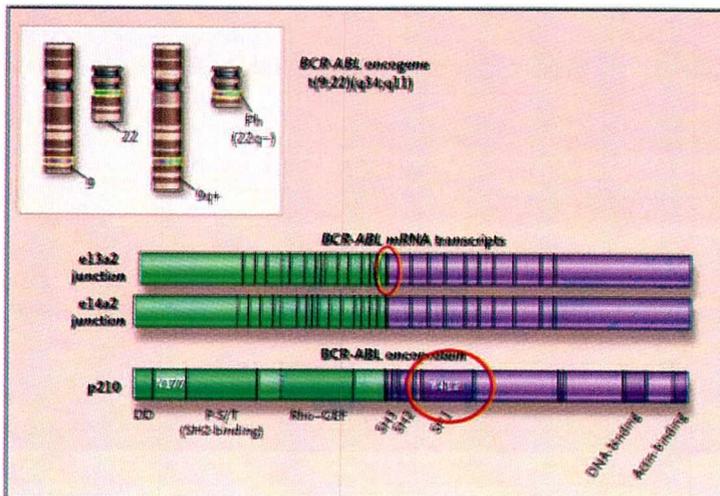
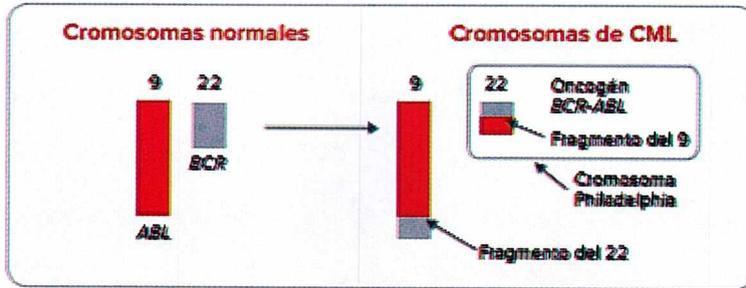


Figura 1 - CARCINOMA POBREMENTE DIFERENCIADO

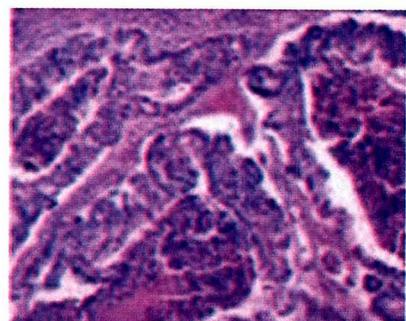


Figura 2 - CARCINOMA BIENDIFERENCIADO

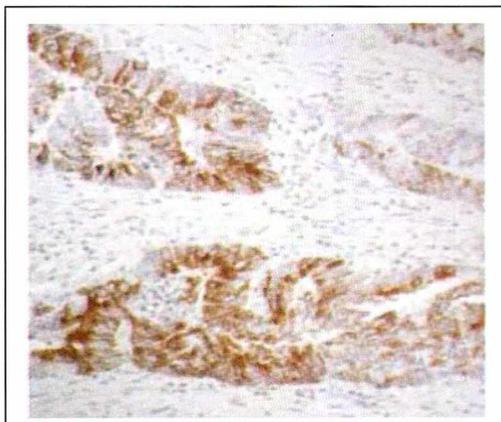
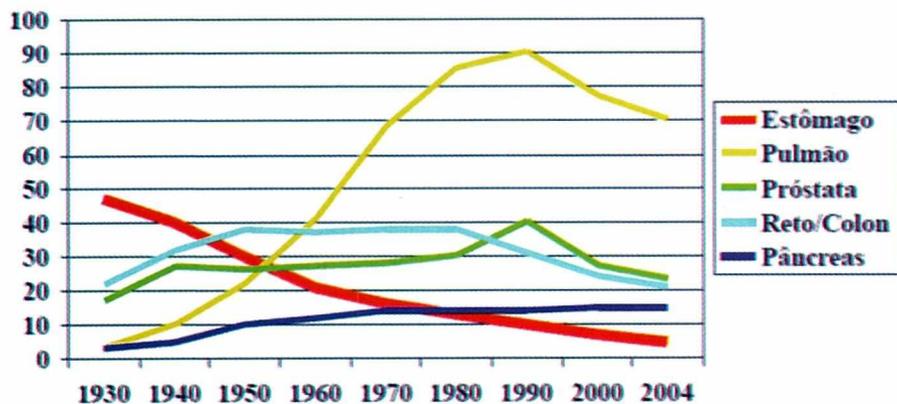
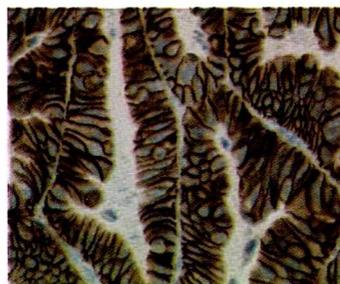


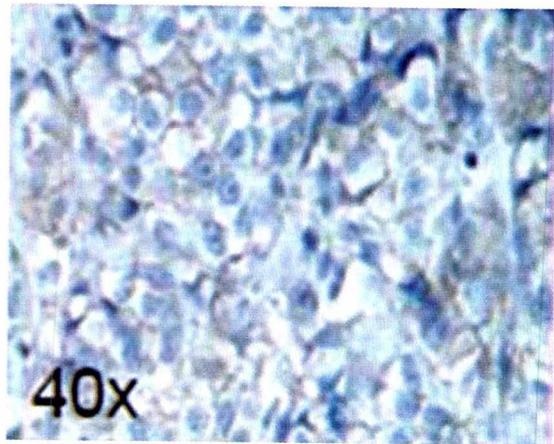
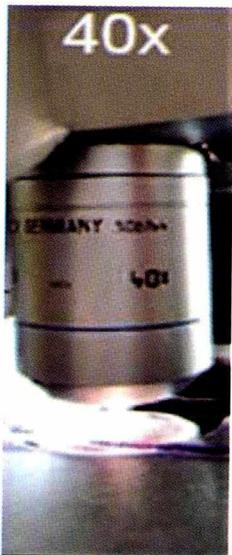
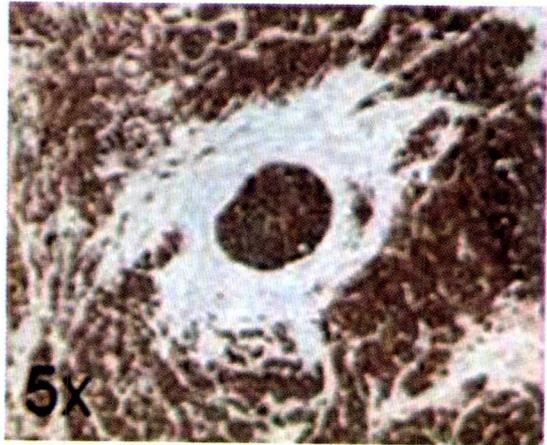
Figura 3 - CITOQUERATINA 20+

EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER GÁSTRICO- DISTRIBUCIÓN MUNDIAL



La tinción puede ser circunferencial,
lateral o basolateral





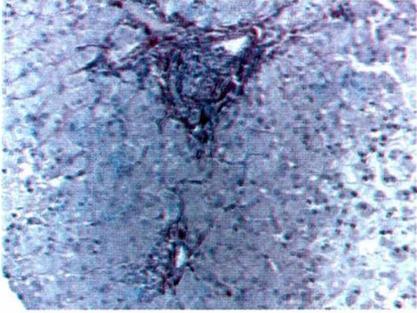
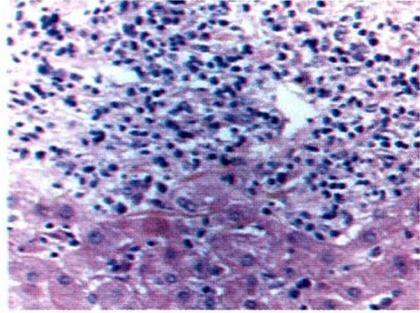
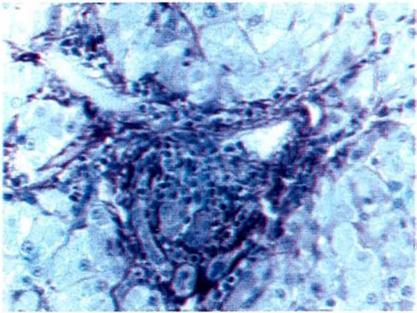


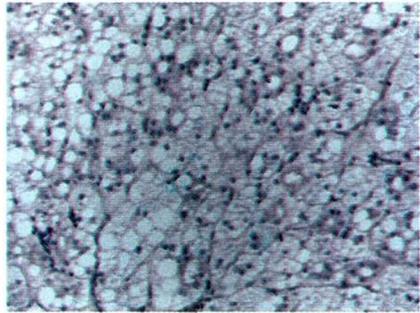
Figura 1 Infiltrado inflamatorio mixto LMN portal con fibrosis de los espacios porta.



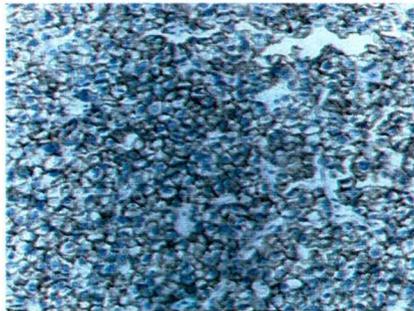
Microfotografía 3 Necrosis inflamatoria a nivel del espacio porta y lobulillo



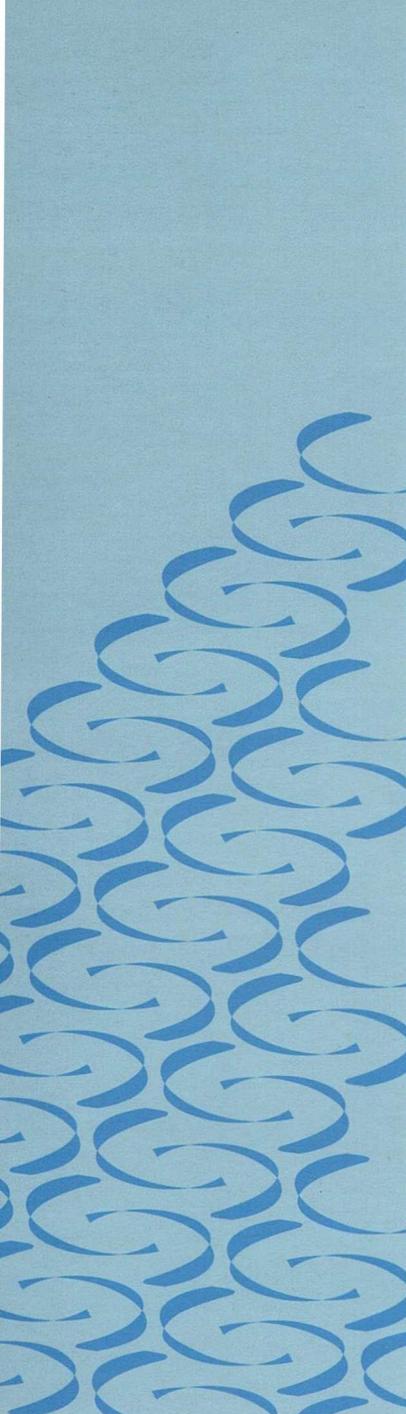
Microfotografía 2 Septos fibrosos de inicio a nivel portal



Microfotografía 4 Esteatosis Severa NASH



Microfotografía Inmunohistoquímica para lipo A.



En este texto abordamos la Patología General y Molecular de las Enfermedades Oncológicas, Obesidad y Envejecimiento. La Patología Molecular es una disciplina a través de la cual podemos investigar qué tipo de tumor tiene un paciente determinado, fenotipo del tumor y comportamiento evolutivo. La genética molecular también se aplica a la Patología degenerativa vascular, a las enfermedades neurodegenerativas, a las diferentes enfermedades metabólicas como la obesidad y la diabetes o a aspectos o vías vinculadas con el envejecimiento celular.

Exploramos las enfermedades oncológicas, el diagnóstico patológico, técnicas de medicina nuclear, y la posibilidad que algunos tumores presentan de ser incorporados dentro de una Clasificación Molecular para poder agruparlos y de esa manera estudiar su comportamiento, pronóstico y evolución.

Se analiza la tumorigénesis y la epigenética en cáncer así como vías complementarias que participan en enfermedades metabólicas brindando una información accesible al lector.

CO-EDITORES Y AUSPICIANTES DE LA PUBLICACIÓN

SD



HOSPITAL DE CLÍNICAS
DR. Manuel Quintela

ISBN 978-9974-0-0973-8



9 789974 009738