

NEOPLASIAS 3

Dr. Francisco Mucientes

Agentes Cancerígenos

Aunque se sabe de agentes que son capaces de producir tumores malignos, estamos lejos de saber con certeza los factores etiopatogénicos de esta enfermedad. Algunas asociaciones etiológicas son establecidas por estadística. Otras por la identificación de agentes virales en las neoplasias. Otros por factores genéticos, hormonales, ambientales. Así para algunas neoplasias conocemos factores etiológicos. Ejemplo, cáncer broncopulmonar y hábito de fumar; cáncer colorectal y factores dietarios; el cáncer de la piel y radiación ultravioleta, cáncer de cuello uterino y virus papiloma humano. A pesar de la falta de conocimiento en este campo, el estudio de los factores conocidos como agentes físicos, químicos, virales y bacterianos, permitirá buscar mecanismos oncogénicos para los tumores en que estos factores son desconocidos.

1. Carcinogénesis Química

Se sabe desde muchos años la asociación de cáncer con agentes químicos. Así se demostró el cáncer del escroto en los deshollinadores y el cáncer en los conejos al pintarles la oreja con alquitrán. Muchos agentes químicos se han demostrado como potentes cancerígenos, pero estos son relativamente inertes en cuanto a su reactividad química. Esta paradoja se explicó en la década de los sesenta cuando se demostró que una mayoría aunque no todos los agentes carcinógenos químicos requieren activación metabólica antes que puedan reaccionar con los constituyentes celulares (agentes de acción indirecta). Es el caso del benzopireno formado en la combustión a altas temperaturas del tabaco de los cigarrillos o de los hidrocarburos policíclicos que se forman a partir de las grasas animales al cocinar la carne o ahumar el pescado.

Estos agentes actúan con diferencias en sexo, edad, dosis, forma de exposición y muchas otras incluyendo la idiosincrasia de la persona. Son importantes las vías enzimáticas que actúan en la activación metabólica de los diferentes agentes. La de mayor importancia es la monooxigenasa dependiente del citocromo p450 que genera mutágenos intermedios a partir de numerosos carcinógenos. La susceptibilidad a la carcinogénesis química dependería en parte de la forma alélica heredada de esta enzima.

Un ejemplo clásico a citar es la carcinogénesis en el ratón. Al aplicar en la piel un agente carcinógeno, no se produce carcinoma. Pero si se aplica luego un segundo agente irritante químico no carcinógeno, se producirá el tumor. El primer paso es un proceso irreversible pero no detectable donde la población celular ha sido sometida al proceso de **INICIACION**. La acción del segundo agente se llama **PROMOCION** (las células de alguna manera permanecen dependientes del factor promotor). Luego viene la **PROGRESION** (células autónomas del promotor) y finalmente **CANCER** (células con capacidad de invasión y metástasis). Este proceso que tiene al menos dos pasos, se ha extendido a múltiples pasos dependiendo del tumor y de los agentes químicos involucrados.

Algunos agentes químicos actúan directamente y no necesitan una conversión metabólica para actuar como cancerígenos (agentes de acción directa), son carcinógenos débiles pero su importancia radica en que algunos de estos agentes son usados como fármacos antineoplásicos. Es el caso de los agentes alquilantes que pueden producir más tarde una segunda forma de cáncer, en general leucemias.

Agentes Químicos

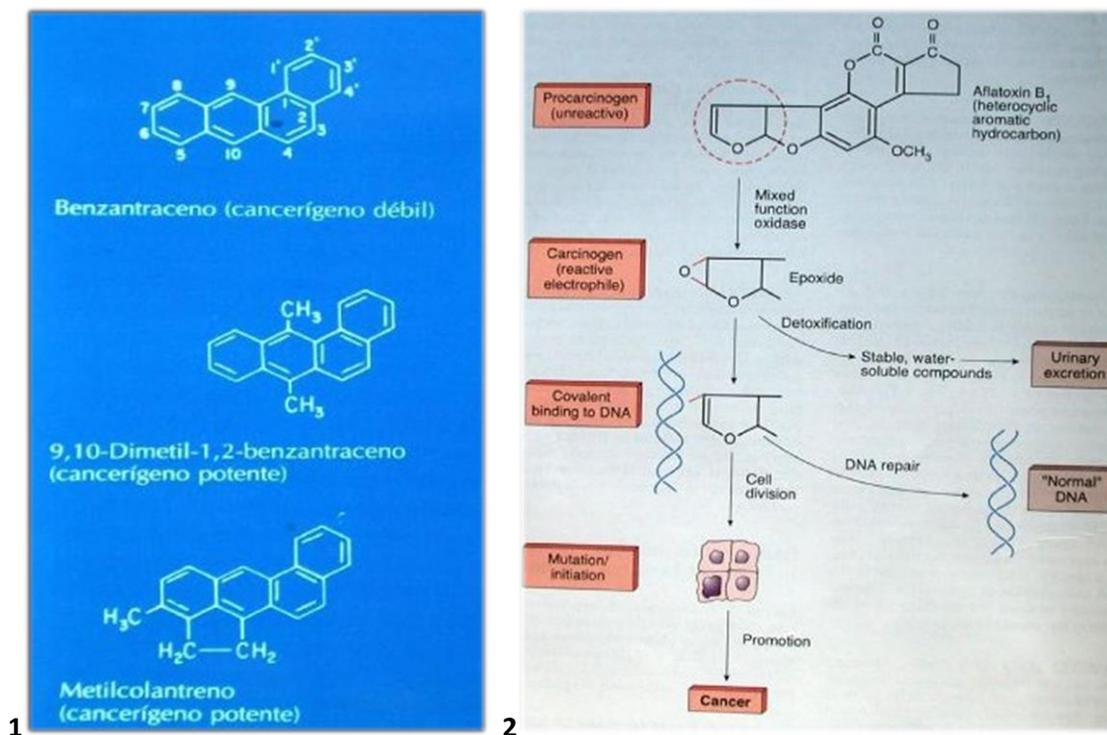
De acción directa:

Alquilantes: antineoplásicos como ciclofosfamida, clorambucilo, nitrosoureas. Se asocian a producción de leucemias.

De acción indirecta:

Hidrocarburos policíclicos aromáticos: Benzantraceno, Benzopireno, 3-metilcolantreno, dibenzantraceno. Producen cáncer en el sitio de aplicación. El tipo específico de cáncer varía según vías de administración. Incluyen tumores de piel, mama y partes blandas. También probablemente en cáncer de pulmón. El cloruro de vinilo usado en la síntesis de plásticos como polivinilo se metaboliza a epóxido. Trabajadores expuestos al monómero cloruro de vinilo tardíamente pueden hacer angiosarcoma hepático (imagen 1).

Productos de microorganismos y plantas naturales (aflatoxina, griseofulvina, Nuez de betel). La Aflatoxina es un componente natural del hongo aspergillus flavus que se encuentra con frecuencia se encuentra en cereales y frutos secos húmedos mal almacenados. Es un potente carcinógeno hepático especialmente asociada al virus de la hepatitis B. Se lo relaciona con el carcinoma hepatocelular (imagen 2)



Aminas, amidas y colorantes azoicos aromáticos: No son muy cancerígenos en el punto de aplicación. Producen tumores hepáticos y vesicales (exposición laboral a aminas aromáticas en la forma de anilinas produce cáncer vesical). Ambas aminas son metabolizadas en el hígado. Anilinas aminoazoicas son agentes cancerígenos que se encuentran en el amarillo de mantequilla, usada para colorear la margarina. Las cerezas marrasquino son coloreadas con rojo escarlata que contiene O-aminoazotolueno.

Nitrosaminas: conocidos carcinógenos gastrointestinales en animales de experimentación. Los nitritos usados como fertilizantes y preservantes se descomponen por acción bacteriana a

nitrosaminas. Dietas altas en nitrosaminas como las usadas en algunas partes de China, explican la gran cantidad de cáncer esofágico en algunas provincias de ese país. Lo mismo se ha considerado en el cáncer gástrico.

Metales: Níquel, cadmio, plomo, cobalto son metales electrofílicos y pueden reaccionar con macromoléculas. El arsénico se ha asociado con cáncer de la piel.

Cada día hay nuevos agentes químicos siendo necesario saber su potencial cancerígeno. El poder mutágeno de los agentes químicos permite estimar su capacidad cancerígena. Para este fin se usa el test de Ames que permite estudiar la aparición de mutaciones en un cultivo bacteriano de *Salmonella sp.*

2. Carcinogénesis física

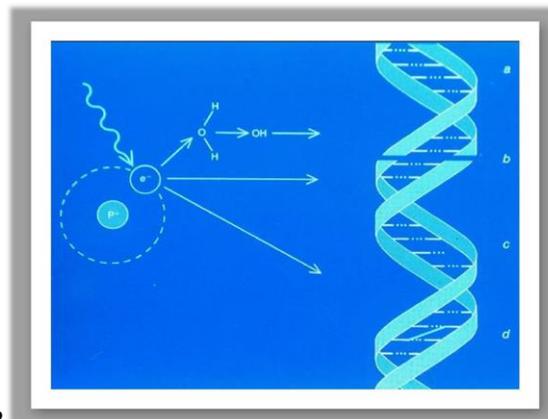
Radiación ultravioleta

Es la porción de onda corta del espectro electromagnético adyacente a la región violeta de la luz visible. No sólo produce deterioro físico de la piel sino que induce cáncer. La era del dorado solar pos vacaciones como señal de salud va en franca retirada, más aún si se considera la menor protección actual por la disminución de la capa de ozono.

El carcinoma basocelular, el carcinoma escamoso y el melanoma, atribuidos a la exposición solar, son cánceres principalmente de la gente de piel blanca. Las personas de piel negra están protegidas por el pigmento melánico que absorbe la luz ultravioleta. Las ondas entre 290-320 nm se asocian con daño tisular. El efecto incluye desactivación enzimática, inhibición de la división celular, mutagénesis, muerte celular y cáncer. El mecanismo bioquímico más importante es la formación de dímeros de pirimidina en el DNA relacionados con la reparación de esta estructura. Esto se hace muy evidente en el xeroderma pigmentosum, que es una enfermedad autosómica recesiva con falla en la reparación del DNA dañado por la luz ultravioleta y que muestra alta incidencia de cáncer a la piel.

Radiaciones ionizantes

Se mencionan por separado las radiaciones de alta energía como rayos X y rayos gamma. El daño celular genético es causado por la absorción directa de la energía por el DNA (teoría blanco) o por mecanismo indirecto por la reacción del DNA con los radicales libres generados por la radiación (imagen 3). Se expresa como mutación o falla reproductiva. Altas dosis de radiación producen cáncer: Ej: cáncer de piel, cáncer hematológico, cáncer de mama, pulmón, tiroides, gastrointestinales etc. Las dosis bajas son cuestionables. Ej. Las personas expuestas a una mamografía o radiografía de tórax probablemente tendrían un leve riesgo de hacer neoplasias.



Asbestos

Se puede inhalar fibras de asbestos en las minas y áreas de elaboración de materiales usados como aislantes. En el aire vecino a las fábricas de asbestos, edificios sometidos a reparaciones o demoliciones, en la ropa aislante al fuego de los trabajadores. Las fibras grandes de asbestos se quedan el tracto respiratorio más alto, las fibras pequeñas en los alvéolos y atrios aéreos. Se cubren con complejos de hierro formando cuerpos ferruginosos, sin embargo la mayor parte permanecen no cubiertos y por lo tanto invisibles al microscopio convencional. Se asocia a la aparición de mesotelioma pleural con períodos sobre 20 años de latencia. Las fibras son transportadas a las cavidades serosas por vía linfática. El mecanismo tumoral es oscuro y tiene relación con el tamaño de las fibras. Recientemente se ha establecido también una fuerte asociación del cáncer pulmonar, asbestos y el hábito tabáquico.

Cuerpos extraños y parásitos

El ser humano es altamente resistente a la aparición de cáncer asociado a cuerpo extraño. A diferencia, la sólo implantación de discos de carbón en ratas produce sarcomas. Esto tiene relación con alta especificidad-especie.

Algunos informes han mencionado aparición de tumores en vecindad de un cuerpo extraño, pero se ha dicho que se debería a la cicatriz fibrosa. No hay tampoco evidencia que un simple traumatismo lleve a la aparición de cáncer. Muy actual es la asociación de implantes de silicona en prótesis mamarias y la aparición de cáncer en el sitio.

La asociación de cáncer vesical escamoso con Schistosoma haematobium se ha asociado con la metaplasia escamosa que produce el parásito. Cáncer de vía biliar se ha asociado a clonorchis sinensis. La asociación con estos parásitos puede deberse a fenómeno de cuerpo extraño o efecto carcinógeno del parásito.

3. Carcinogénesis viral

En animales existen varios tipos virales asociados a especies diferentes y que producen neoplasias. El Linfoma-leucemia en aves fue resuelto con la primera vacuna anti viral que permitió erradicar este tipo de cáncer que tuvo en jaque a este sector económico. Virus del Sarcoma de Rous, Shope papiloma, Pox Virus DNA, Bitter virus RNA, DNA Virus polioma, SV-40 DNA, son virus productores de sarcomas y carcinomas en ratas.

En humanos son cinco virus los asociados con neoplasias, cuatro de tipo ADN y uno ARN. Aunque no están totalmente aclarados los mecanismos, existe fuerte evidencia de su participación en la oncogénesis humana.

Virus papiloma humano (HPV): Se reconocen muchas cepas diferentes. Es un virus DNA de doble hélice circular con 8000 pares de bases. En el cuello uterino las cepas 6 y 8 se han asociado con lesiones preneoplásicas de bajo riesgo mientras que las cepas 16,18 se asocian con lesiones de alto riesgo y carcinoma invasor. También se asocia al carcinoma anal, vulvar y del pene. El potencial oncogénico se asocia a dos genes víricos precoces el E6 y E7. Produce efectos similares a la pérdida de genes supresores de cáncer, activa ciclinas, inhibe la apoptosis y activa la telomerasa.

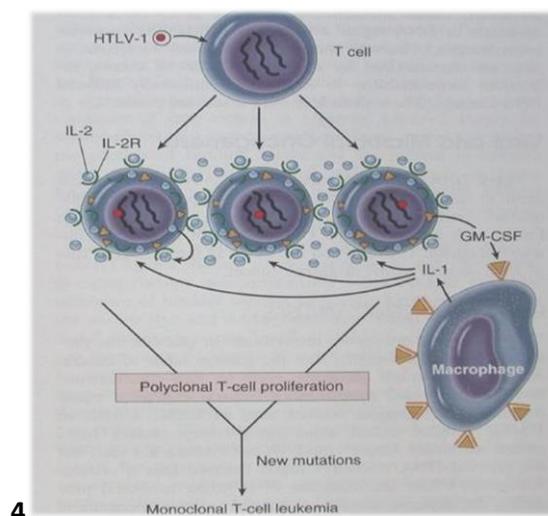
Virus Epstein-Barr (EBV): Es virus DNA de doble cadena lineal con 170 mil pares de bases. Presente en un 90% de la población. Infecta a linfocitos B y a epitelios. El virus inmortaliza a los linfocitos y probablemente a las células epiteliales. Se lo asocia a diversas neoplasias linfáticas

como el linfoma de Burkitt, enfermedad linfoproliferativa post trasplante, linfoma primario del SNC en SIDA, un subgrupo de Hodgkin, carcinomas linfoepiteliales de localización variada que incluyen el nasofaríngeo en particular y recientemente al carcinoma gástrico convencional. El virus a través de sus proteínas de membrana LMP1 y el gen EBNA-2 frena la apoptosis. Este virus tiende a esconderse de la respuesta inmune normal. Al parecer necesita de otros elementos para producir la neoplasia como falla en la inmunidad o infecciones de otra naturaleza.

Virus Hepatitis B: Se ha establecido su asociación con carcinoma hepatocelular (HCC). El mecanismo de este virus DNA podría ser por su capacidad de inducir daño hepático crónico o su expresión genética que puede alterar la orquesta genética de los hepatocitos. El genoma viral no codifica ninguna proteína transformadora y no existe un patrón constante de integración a los hepatocitos. Sin embargo el virus está integrado en el 90% de los pacientes con HCC y los tumores son clonales respecto a estas inserciones. Hay tres mecanismos involucrados: la necrosis y regeneración constante predispone a mutaciones; el elemento HBx altera la transcripción de varios genes de crecimiento; la activación de vías citosólicas de transmisión de señales. El carcinoma hepatocelular se entiende actualmente como la etapa final de la historia natural de la infección por virus B. Se piensa también que el virus de la hepatitis C (HCV) pudiera estar involucrado en la génesis del HCC.

Virus Herpes Humano tipo HHV-8: Virus DNA asociado al Sarcoma de Kaposi en su forma esporádica y en el SIDA. De allí su denominación con la sigla KSHV. Es el tumor más frecuente en esta población, siendo más frecuente entre homo y bisexuales que entre drogadictos. Puede aparecer en etapas iniciales o tardías de la enfermedad. También se lo ha asociado a linfomas B de cavidades serosas. Se postula una fuerte interacción al virus herpes tipo 8, expresión y respuesta alterada a las citoquinas, modulación del crecimiento celular por productos del virus.

HTLV-1: Este es el único virus RNA asociado con leucemia-linfoma T en Japón y región del Caribe. Esto se explica por la demostración de transcriptasa reversa, que es una enzima viral que sintetiza DNA a partir del genoma RNA viral. Infecta a linfocitos T CD4+. Se transmite por vía sexual, hemoderivados y leche materna. La leucemia aparece el 1% de los infectados y con períodos de latencia de 20-30 años. Se ha propuesto la existencia de proto-oncogenes que juegan un rol crítico en la génesis de esta neoplasia. El HTLV-1 no tiene oncogenes conocidos y no se integra a sitios específicos del genoma del huésped. La proteína TAX esencial para la replicación viral, también participa en los procesos de transformación neoplásica inhibiendo genes supresores de cáncer como el p16 y p53 (imagen 4).



4. Carcinogénesis bacteriana

El *Helicobacter Pylori* se ha establecido como agente etiológico en el linfoma y adenocarcinoma gástrico diferenciado. Esta bacteria, a través de linfocitos T, estimula la aparición y proliferación policlonal de linfocitos B. De esta población reactiva de linfocitos B, con el tiempo y por la aparición de mutaciones en genes reguladores del crecimiento y la translocación t(11;18), se genera un tumor monoclonal asociado al tejido linfático de la mucosa (MALTomas o linfoma B de las células de la zona marginal). Se ha logrado la desaparición de MALTomas pequeños, de bajo grado, de formas incipientes con la terapia antibiótica antihelicobacter.

Para el adenocarcinoma gástrico se ha involucrado a la producción de gastritis crónica por parte del *Helicobacter*, luego la aparición de gastritis atrófica y metaplasia intestinal. En este ambiente aparece la displasia glandular y luego adenocarcinoma. Este proceso ocurre en décadas y en un porcentaje bajo de la población general infectada por *Helicobacter*.

INMUNOVIGILANCIA ANTITUMORAL

El cáncer es heterogéneo en todas sus facetas. Esto en parte se explica por la inestabilidad genética y la selectividad clonal. La célula neoplásica es genéticamente más inestable que la célula normal. La palabra variabilidad ilustra sin duda la característica más importante del cáncer. Este hecho también involucra a la parte antigénica, el tumor cambia todos los días y es una de las razones del escape tumoral a la defensa inmune. Se ha establecido que frecuentemente se producen en el humano células transformadas. La mayor parte de estos microtumores son eliminados en forma rápida antes de su detección clínica mediante mecanismos de vigilancia inmunológica.

Es conocido que los pacientes con inmunocompetencia baja como en la deficiencia congénita o asociada al SIDA, hacen tumores con mayor frecuencia que la población normal. Por otro lado la mayoría de las neoplasias afectan a personas sin una franca inmunodeficiencia. Dado la existencia de la inmunovigilancia antitumoral se han propuesto vías de evasión que permitan al tumor seguir proliferando.

La célula tumoral modifica, bloquea, enmascara y modula la expresión de sus antígenos a fin de frenar la respuesta antitumoral. Entre las vías de escape se ha propuesto el crecimiento selectivo de clones variantes sin antígenos, pérdida de expresión de antígenos de HLA, falta de coestimulación en el linfocito T que impide la sensibilización o simplemente causan anergia o apoptosis, inmunodepresión directa inducida por el tumor (Ej. TGF secretado por la neoplasia es un fuerte inmunodepresor).

Antígenos Tumorales

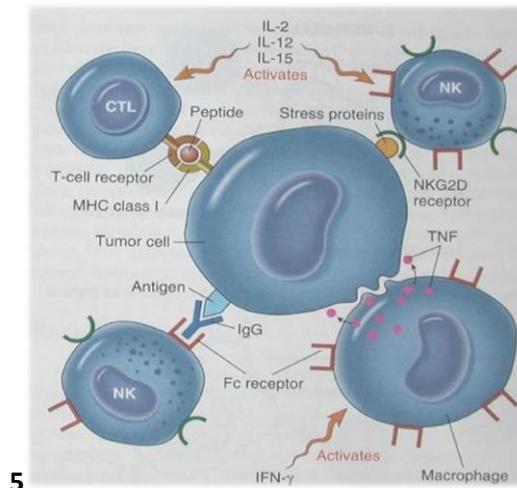
Se han descrito varios antígenos que producen respuesta inmune. Existen los antígenos específicos que sólo se encuentran en las células tumorales y los antígenos asociados a tumores que aparecen en células tumorales y normales. Los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ reconocen estos antígenos presentados por moléculas clase I del complejo de histocompatibilidad.

Los antígenos MAGE (se encuentran aunque sin expresión en el testículo) si bien no son indicadores de ningún tumor en particular, son antígeno-específico de tumores y se lo encuentra en el melanoma, cáncer de hígado, pulmón y estómago.

Las Proteínas MART-1, gp100 y tirosinasa son específicos de la diferenciación y se expresan en las células tumorales y en su contrapartida no transformada. Este hecho ocurre en los melanocitos y en los melanomas. Así los linfocitos citotóxicos dirigidos contra estas proteínas pueden destruir las células normales y las tumorales.

Antígenos de proteínas mutadas de tumores como productos de la catenina B, RAS, TP53, CDK4 pueden inducir respuesta inmune aunque no se observa una respuesta espontánea a estos agentes. El HER-2 (neu) que suele sobre expresarse en algunos tumores, no tiene una concentración adecuada para ser reconocido por linfocitos T citotóxicos.

A continuación se estudian las células de acción antitumoral más importantes y que interactúan en forma compleja en la acción antineoplásica (imagen 6).



Linfocitos T citotóxicos CD8+: Se los ha vuelto a considerar como células de función protectora, especialmente en neoplasias asociadas a agentes virales como el Burkitt, Usualmente los linfocitos T CD8+ no se forman espontáneamente y requieren que sean sensibilizados. Por esta razón se intenta desarrollar estas células con fines antitumorales inmunizando con células dendríticas estimuladas con antígenos tumorales.

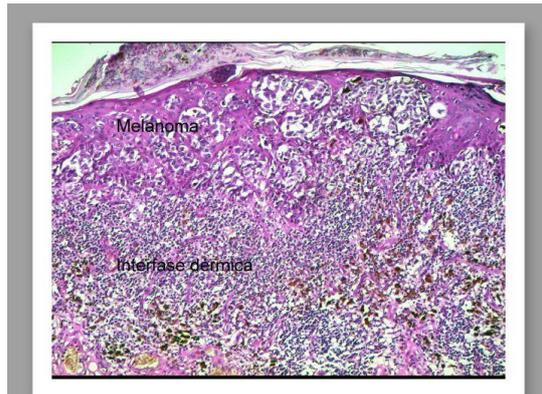
Linfocitos citolíticos naturales (natural killer cells NK): es un grupo de linfocitos periféricos (1-2% de esa población) que tienen actividad antitumoral importante, inespecífica, citolítica. No es necesario que el huésped haya sido expuesto a antígenos tumorales. Constituyen la primera defensa antineoplásica. Su producción está mediada por interferón e interleuquina 2 (IL-2).

Macrófagos: son células activadas del sistema retículo-endotelial. Tienen acción antitumoral específica con efecto citolítico y citotóxico. Deben ser expuestas previamente al tumor. Su acción es fuerte en cuanto a lisar la célula tumoral pero débil en cuanto al número de células tumorales sobre las que puede actuar. Funcionan independiente de los linfocitos T aunque también funcionan asociadamente, ya que el interferón gama secretado por Linfocitos T y NK es un potente activador de macrófagos.

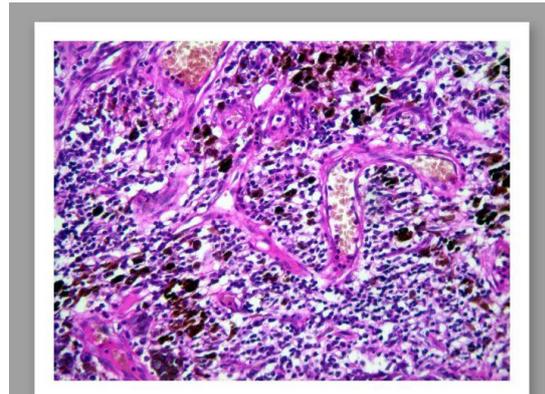
Anticuerpos naturales: algunos individuos tienen anticuerpos antitumorales. Su valor no es importante en la lucha antitumoral. Probablemente se debe a sensibilización frente a antígenos fetales u otros. Pueden actuar por activación del complemento o inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos por parte de NK.

Vigilancia antitumoral no inmunológica: hay glicoproteínas que impiden a la célula tumoral entrar en fase S. Hay lipoproteínas y antioxidantes que mediadas por reacciones químicas de peróxido y superóxido de Hidrógeno tienen acción antitumoral por acción química simple.

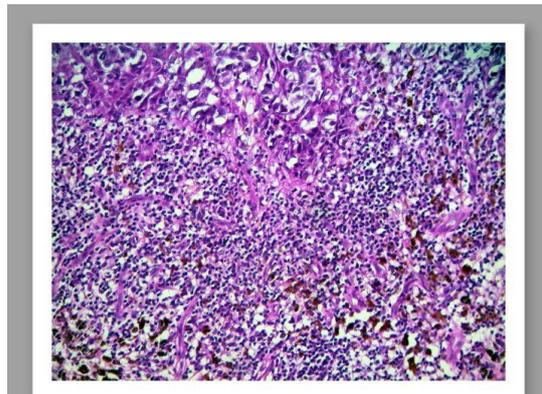
En las siguientes cuatro figuras (imágenes 6, 7, 8 y 9), se muestra la interfase de un melanoma maligno de la piel con la dermis subyacente. Se aprecia pigmento melánico fagocitado, células tumorales rodeadas por gran cantidad de células mononucleares y abundante capilares de neoangiogénesis. Se debe recordar que no todas estas células mononucleares que rodean al tumor tienen una acción defensiva sino que algunas son reclutadas por el tumor en apoyo de sus acciones invasoras.



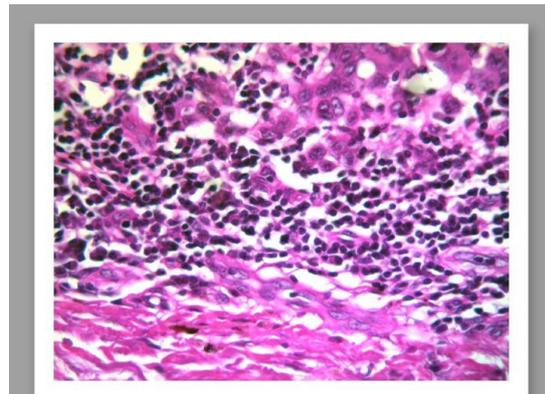
6



7



8



9

TUMOR DORMIDO

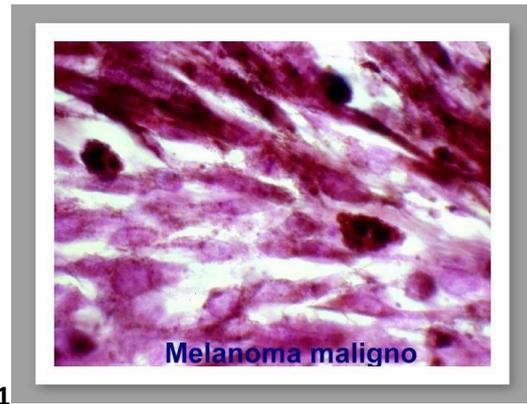
Es un estado en el cuál las células tumorales persisten en un huésped clínicamente normal, por un período de tiempo prolongado, bajo control de crecimiento y con escaso o sin aumento del tamaño tumoral en ese período.

Uno de los grandes problemas para curar el cáncer es la frecuente incapacidad para destruir todas las células tumorales del tumor primario o sus metástasis. Las células tumorales que sobreviven pueden crecer rápidamente o quedar en estado de tumor dormido por un período largo de remisión clínica. Luego de un tiempo pueden proliferar nuevamente y dar lugar a un tumor recurrente. Este estado puede ser explicado debido a control inmunológico celular y humoral o por ausencia de factores necesarios para la proliferación como son factores angiogénicos, hormonas etc. El estado de tumor dormido puede terminar con la destrucción total de las células neoplásicas o pasar a un proceso proliferativo.

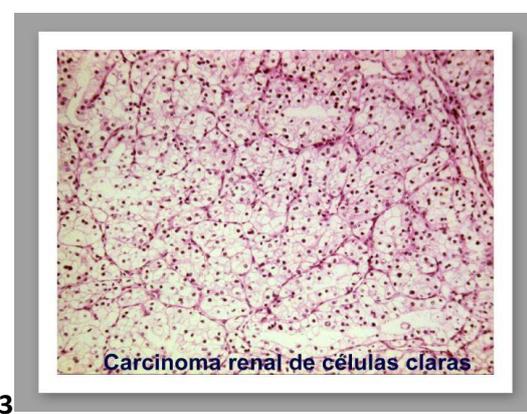
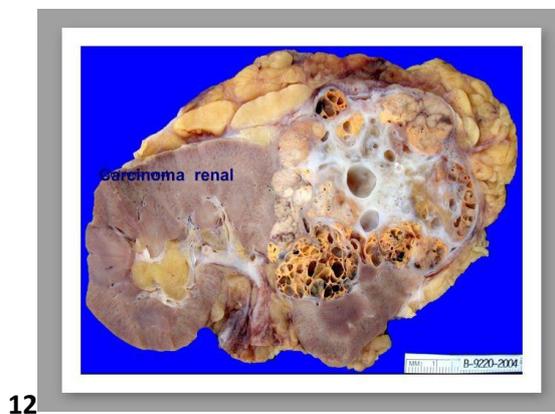
REGRESION ESPONTANEA

Se entiende por reducción de la talla o la desaparición completa de un tumor histológicamente identificado y sometido al análisis de un grupo de patólogos expertos, en ausencia de terapia que podría ser considerada adecuada o que altere en forma significativa el curso natural de la enfermedad. Algunos casos han sido precedidos por infección bacteriana o viral pero en la mayor parte no ha existido una asociación significativa. Son casos muy raros y esporádicos entre los que se cuenta:

Melanoma maligno: es el tumor que regresa con mayor frecuencia y este proceso se asocia a defensa inmunológica y endocrina (imágenes 10 y 11).

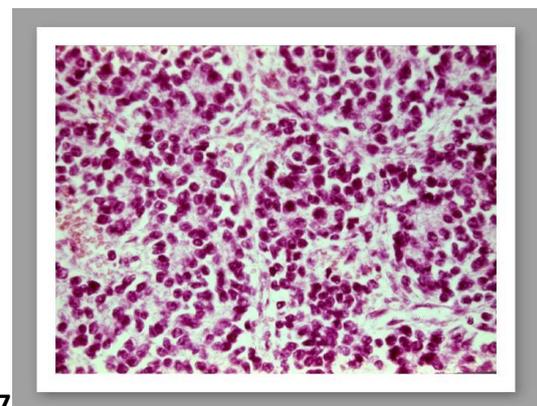
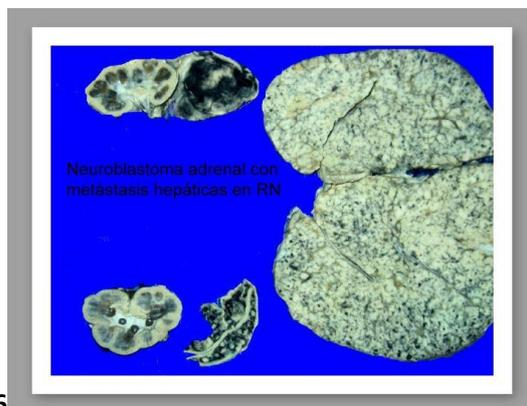
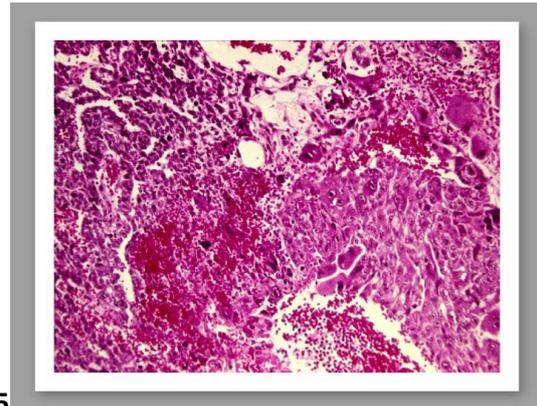


Carcinoma renal: se han reportado regresiones del tumor primario o a veces de las metástasis pulmonares luego de la nefrectomía debido a respuesta celular antitumoral (imágenes 12 y 13).

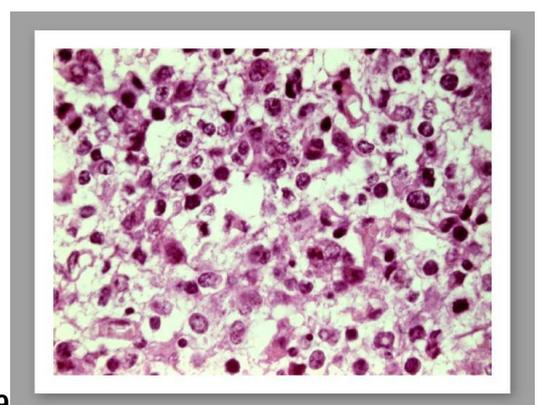


Coriocarcinoma: usualmente no se encuentra tumor en el útero en pacientes fallecidas por coriocarcinoma. Los casos de regresión pudieran ser homologados a rechazo similar al trasplante. Probablemente la regresión esté mediada por respuesta a antígenos HLA paternos (imágenes 14 y 15)

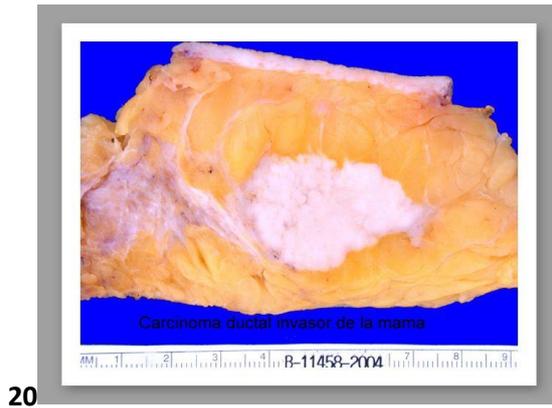
Neuroblastoma: probablemente se trata de una regresión vía maduración tumoral. Se transforma en ganglioneuroblastoma o ganglioneuroma (imágenes 16 y 17).



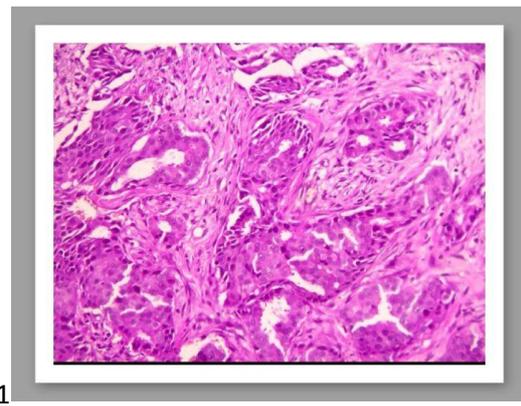
Linfoma: El tipo de Burkitt es el linfoma que regresa con más frecuencia. Sin embargo la regresión ha sido documentada en casi todos los tipos de linfomas y leucemias y se la ha explicado por respuesta inmunológica (imágenes 18 y 19).



Carcinoma de la mama: la regresión tiene que ver con dependencia constitutiva a hormonas y otros nutrientes (imágenes 20 y 21).



20



21

PATOLOGIA MOLECULAR DEL CANCER

Dra. Sonia Montenegro

BASES MOLECULARES DEL CANCER.

Hanahan y Weinberg proponen que para que el proceso oncogénico ocurra tendrían que alterarse 6 funciones esenciales de la fisiología celular:

1. La capacidad de regular las señales de crecimiento (proto-oncogenes).
2. Falta de respuesta a las señales inhibitorias de crecimiento celular (genes supresores de tumor).
3. Evasión de la muerte celular (apoptosis).
4. Potencial replicativo ilimitado.
5. Fomento sostenido de la angiogénesis.
6. Alteraciones en la adhesividad celular que permiten invasión tisular y metástasis.

Cada uno de estos cambios obedece a un conjunto de alteraciones genéticas, muchas de las cuales aún no están dilucidadas. Estos seis eventos generalmente tienen lugar en una célula que presenta cierto grado de inestabilidad genética. Estas alteraciones aparecen correlativamente en el tiempo, y no siempre en el mismo orden, aunque algunas predisponen a la aparición de otras. Además de la alteración de estas funciones, para que se desarrolle una neoplasia, el tumor debe escapar del sistema inmune.

El proceso oncogénico es un fenómeno abierto que está sometido, por su propia naturaleza, a constantes cambios moleculares tanto de naturaleza genética (alteraciones de la secuencia del ADN) como epigenética (conjunto de reacciones químicas especialmente a nivel de la cromatina que modifican la actividad del ADN pero sin alterar su secuencia). Los cambios epigenéticos más importantes son metilación del ADN, modificación de las histonas y el efecto de los ARN pequeños no codificantes.

Con toda probabilidad en cualquier tipo de cáncer, sea cual fuere su clasificación histológica, ocurre la secuencia de fenómenos oncogénicos mencionados. Sin embargo aún no se ha podido

establecer cuáles son las bases moleculares que conducen a la aparición de los diferentes fenotipos celulares, ni qué cambios genéticos pueden condicionar la evolución hacia un patrón de indiferenciación celular.

Actualmente el foco de la investigación está en el análisis de los cambios en la expresión génica de las células tumorales mediante técnicas de microarray, con el objetivo de buscar la asociación entre un patrón de expresión génica y los diferentes perfiles oncológicos de las células tumorales.

El proto-oncogen RAS es uno de los más analizados y las mutaciones que presenta se han implicado en las fases iniciales de desarrollo de diversos tipos tumorales lo que ocurre en aproximadamente el 10-15% de todos los carcinomas humanos. Existen tres tipos de protooncogenes RAS (H-RAS, K-RAS y N-RAS).

Probablemente la mutación activadora del RAS es un fenómeno temprano en la evolución de las neoplasias y propicia la predisposición de anomalías genómicas a gran escala. Existe cierta correlación entre la presencia de la mutación del RAS y la edad de presentación, pues son menos frecuentes en neoplasias de personas más jóvenes, mientras que su prevalencia aumenta conforme avanza la edad. En el caso de cáncer de tiroides por ejemplo, dicha mutación es más frecuente si ha existido el antecedente de radiación.

El proto-oncogen BRAF codifica una kinasa tipo serina-treonina que media la transducción de señales en la ruta MEK/ERK, una vía importante para la regulación celular, el crecimiento, la diferenciación y la promoción de la apoptosis. Esta mutación somática puntual se observa en alrededor del 7% de los cánceres humanos presentándose con mayor frecuencia en el melanoma (70%), en carcinoma papilar-tiroideo (35%-70%) y cáncer de colon.

Desde el punto de vista clínico se prioriza el análisis de alteraciones en genes que estarían asociados a mayor malignidad o a un tipo de terapia específica.

CARCINOMA DE TIROIDES Y MUTACIONES DE GEN BRAF

El cáncer de tiroides constituye el 1% de todas las neoplasias que se diagnostican cada año, y se estima que en Estados Unidos y en Europa existen alrededor de 26.000 y 16.000 casos por 100.000 habitantes/año, respectivamente. Aunque ésta es una enfermedad relativamente infrecuente, representa el tumor más común del sistema endocrino, siendo la histología dominante el carcinoma papilar que se encuentra en el 80% de los casos y con predominio en mujeres. En términos generales, tiene un buen pronóstico y alta tasa de supervivencia después del tratamiento quirúrgico inicial; sin embargo, se ha estimado que alrededor de un 30% de los pacientes desarrollan una recaída local o a distancia y con frecuencia hay metástasis a los ganglios linfáticos. El carcinoma papilar de tiroides puede ser consecuencia de mutaciones puntuales en el gen BRAF y los genes RAS y de reordenamientos en los genes RET y TRK1 que causan una activación desregulada de la ruta de señalización de proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK). Estas alteraciones genéticas son mutuamente excluyentes y se encuentran en el 80-90% de carcinomas papilares de tiroides. Las mutaciones en el gen BRAF prevalecen en el 45% de los casos, las mutaciones en el gen RAS en el 10-20%, los reordenamientos del gen RET en el 20% y los reordenamientos en el gen TRK1 en el 5-10% (ver tabla 1 y tabla 2).

Tabla1. Patología Molecular del Cáncer Papilar de Tiroides (CPT)

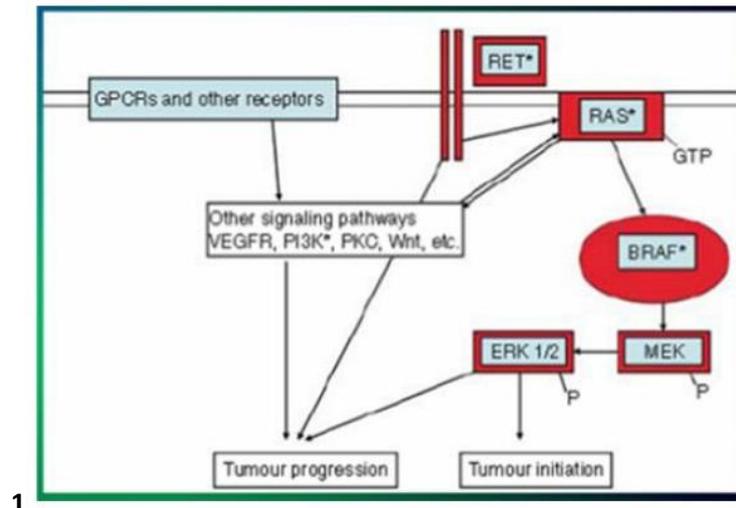
- El CPT sería consecuencia de mutaciones puntuales en el gen *BRAF*, genes *RAS* y de reordenamientos en los genes *RET* y *TRK1*.
- Estas alteraciones genéticas producen la activación desregulada de la ruta de señalización de proteínas kinasas activadas por mitógenos (*MAPK*). Son mutuamente excluyentes y se encuentran en el 80-90% de los CPT.
- Mutaciones *BRAF* en el 45% de CPT, mutaciones en *RAS* 10-20%, los reordenamientos en *RET* 20% y los reordenamientos en *TRK1* 5-10%.
- La mutación V600E del gen *BRAF* es un marcador molecular de valor diagnóstico, pronóstico y terapéutico en el manejo del CPT es.
- La mutación V 600 produce una activación constitutiva de la cascada intracelular con una actividad y proliferación celular descontroladas.
- Se presenta en el 60% de la variante clásica, en el 77% de la variante de células altas y en el 12% de la variante folicular.
- La actividad kinasa *BRAF* de la mutación V600E es 460 veces superior a la de *BRAF* fisiológica.

Tabla2. Patología Molecular del Cáncer de Tiroides

- Esta mutación está relacionada con una mayor agresividad de l CPT implicando, un estadio local más avanzado, mayor incidencia de metástasis ganglionares y menor respuesta al tratamiento con I131.
- Es un marcador pronóstico capaz de predecir la agresividad biológica y clínica del CPT para un paciente en concreto, ayudaría a realizar un tratamiento inicial individualizado y a disminuir el riesgo de recurrencia tumoral.
- Detección de mutación *BRAF* V600E en citologías indeterminadas (15-30%) puede ayudar a evitar tiroidectomías diagnósticas innecesarias. Prevalencia de *BRAF+* es del 16% en este tipo de citologías.

El gen BRAF se encuentra en el brazo largo del cromosoma 7(7q34) y codifica una kinasa serina/treonina citoplasmática de la familia RAF que, al igual que RAS, RET y TRK es un componente esencial de la ruta de señalización de proteínas kinasas. Más del 95% de las mutaciones en el gen BRAF ocurren en el nucleótido 1.799 y resultan en la sustitución de una valina por glutamato en el residuo 600 (V600E) (imagen 1). Esta mutación en el gen BRAF destruye el dominio kinasa, lo que se traduce en una activación constitutiva de la proteína activada por mitógenos que explica el potencial oncogénico. La proteína resultante de esta alteración genética tiene 10 veces más actividad kinasa que la proteína normal.

Fig.1: Vías moleculares de señalización en CPT

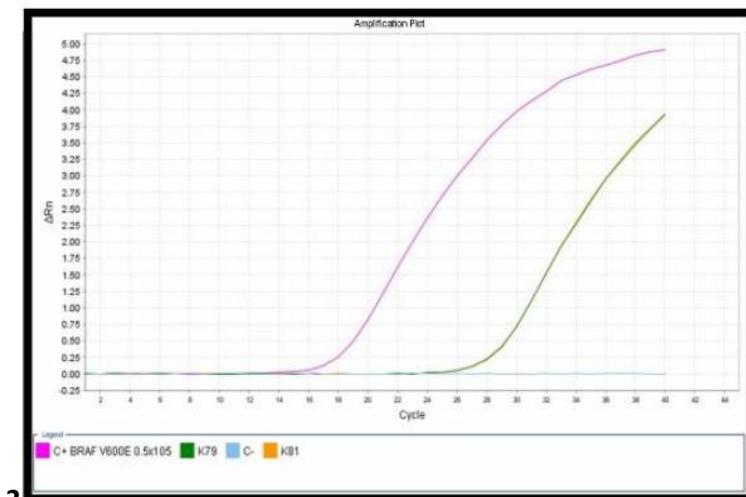


1

La importancia de esta mutación en cáncer de tiroides es porque numerosos estudios evidencian una asociación de la mutación BRAF V600 con carcinoma más agresivo: extensión extratiroidea, metástasis ganglionar, estadios más avanzados en TNM e incluso mayor mortalidad. Esta mutación estaría asociada al subtipo de células altas y columnares y menos a la variante folicular. El análisis de esta mutación sería un marcador molecular de agresividad y recidiva.

Las mutaciones puntuales en los genes RAS no quedan restringidas a carcinoma papilar de tiroides. Es decir, generan el 10-20% de los carcinomas papilares de tiroides, pero también pueden ser causa de carcinomas foliculares (40-50%) y adenomas foliculares (20-40%). La mutación BRAF se detecta mediante PCR a tiempo real alelo específico (imagen 2).

Fig. 2: PCR tiempo real alelo específico para detección de mutación BRAF



2

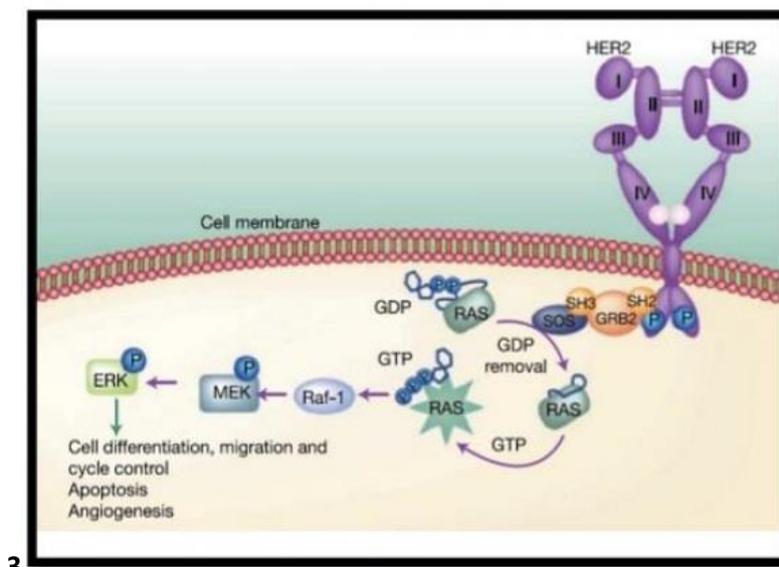
CARCINOMA DE MAMA /AMPLIFICACION GEN HER2/NEU POR HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE IN SITU (FISH)

La amplificación del gen HER 2 está bien documentada en cáncer de mama y se encuentra en el 10 a 30 % de los carcinomas invasores. Se asocia a un fenotipo de tumor agresivo, con características histológicas definidas (como alto grado nuclear, actividad mitótica aumentada y ausencia de receptores hormonales), mayor resistencia a los tratamientos convencionales de quimioterapia y terapia hormonal y una menor tasa de supervivencia. Sin embargo, responden mejor al tratamiento con trastuzumab, un anticuerpo monoclonal humanizado específico que se dirige contra el dominio extracelular del receptor HER2/neu de las células cancerígenas e impide que éstas reciban señales de crecimiento; desacelerando o interrumpiendo el crecimiento celular.

Gen HER2/neu

El oncogen Her2/neu (receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2) conocido también como ErbB2 es un protooncogen que codifica una glicoproteína de transmembrana con actividad tirosina kinasa. Puede activarse por dimerización debido a sobreexpresión del receptor o por transactivación por un receptor homólogo. Luego de la dimerización se activa la función tirosin-kinasa que esta mediada por las proteínas Ras, Raf, MEK, MAPK; esto causa una cascada de señales de transducción intracelular, que estimulan la actividad mitogenica importante para regular la proliferación, diferenciación, supervivencia celular y la angiogenesis (imagen 3). El gen Her2/neu cumple la función de regular el crecimiento, la proliferación, grado de invasividad y diferenciación en el cáncer de mama.

Fig.3: Vías de señalización de gen Her2/neu



3

La sobreexpresión del gen Her2/neu da como resultado anomalías en la amplificación del gen y un incremento en el número de copias; en las células epiteliales normales hay entre 20.000 y 50.000 receptores Her2/neu de membrana, mientras que en las células tumorales se encuentran sobreexpresadas hasta 2 millones de receptores de membrana Her2/neu. Se estima

que se sobreexpresa en aproximadamente 25-30% de las pacientes con cáncer de mama. Mediante la técnica FISH o hibridación in situ fluorescente y el uso de una sonda específica que hibride con el locus respectivo se puede determinar el número de copias que posee la paciente a partir de una biopsia de tejido.

Algoritmo diagnóstico para la detección de la sobreexpresión Her2/neu.

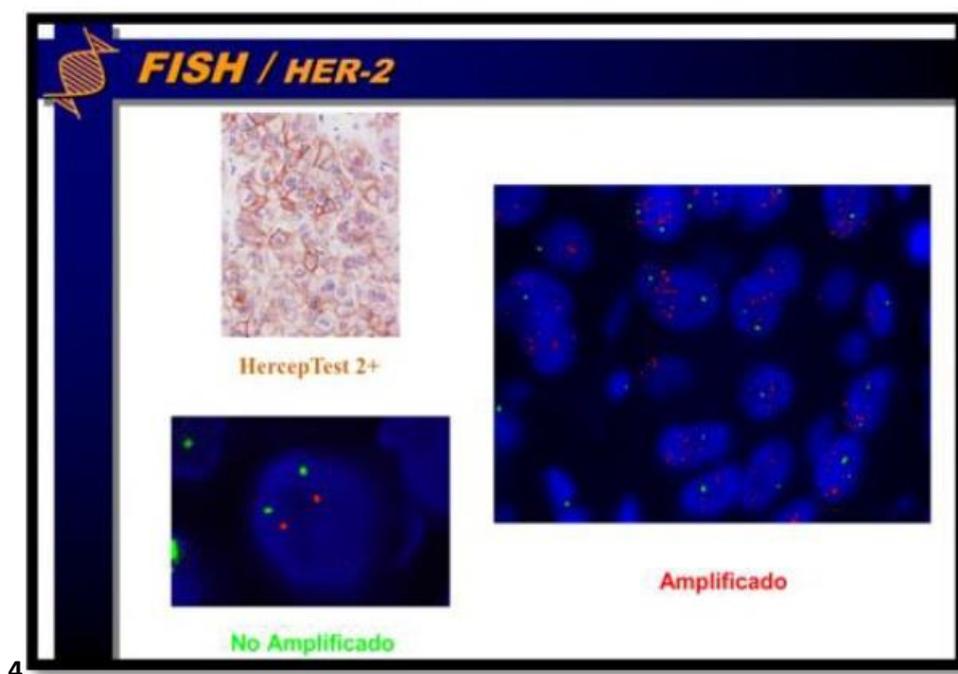
Tamizaje inicial con prueba de inmunohistoquímica (IHQ) que mide sobreexpresión de la proteína. Todas las pacientes con un puntaje de 2+ y 3+ deben confirmarse con FISH. Las pacientes confirmadas con amplificación mediante FISH son elegibles para tratamiento con trastuzumab.

Hibridación fluorescente in situ (FISH)-Sondas para el oncogén HER2/neu

FISH es un método molecular citogenético que permite cuantificar el número de copias de un gen, incluyendo amplificaciones, traslocaciones, deleciones y reordenamientos, los cuales pueden estar asociados con leucemias, tumores sólidos y otros desórdenes genéticos. Una célula normal en reposo contiene dos copias de cada gen y cuando se está dividiendo puede tener cuatro copias de un mismo gen. FISH es considerada el estándar de oro para evaluar la amplificación del HER2/neu, para predicción de respuesta al trastuzumab (sensibilidad 98% y especificidad 100%).

Debido a que es crítico evaluar solo carcinoma invasivo es necesario realizar el test de FISH en tejidos fijados a fin de preservar la arquitectura del tejido. El patólogo marca las áreas de carcinoma invasivo en la lámina de HE que se usa de guía para identificar el área de lesión. Se usa una sonda locus específica para el locus del gen HER2/neu (localizado en el cromosoma 17q11.2-q12) y una sonda centromérica del cromosoma 17 que permite valorar el número de copias de este cromosoma con independencia del estado de amplificación. Este sistema de dos sondas permite detectar la posibilidad de polisomía del cromosoma 17 y, por lo tanto, el resultado se expresa como una proporción del total de señales HER2/neu sobre el número de señales detectadas del centrómero del cromosoma 17 (imagen 4).

Fig.4: Técnica de FISH amplificación de gen Her2/neu



CARCINOMA COLORRECTAL Y MUTACIONES EN GENES RAS

La formación de un tumor se produce por el acúmulo de múltiples alteraciones en el genoma de las células neoplásicas que causan dos tipos de cambios:

1. Cambios epigenéticos, que afectan, no a los propios genes, sino a la expresión de los mismos. Existe por ejemplo el silenciamiento (ausencia de expresión) de genes debido a hipermetilación de las islas CpG localizadas en sus promotores.

2. Cambios a nivel de la secuencia del ADN:

- 2.1 Deleciones de regiones cromosómicas, que implican pérdida de genes que pueden estar relacionados con la regulación negativa del ciclo celular (genes supresores de tumores).

- 2.2 Mutaciones génicas que pueden activar o inactivar distintas proteínas.

- 2.3 Amplificaciones génicas que causan la sobreexpresión de genes específicos.

- 2.4 Pérdidas o ganancias de cromosomas enteros.

Uno de los cánceres más estudiados del punto de vista molecular es el cancer colorrectal (CCR) debido a su creciente incidencia en todo el mundo, donde ha llegado a alcanzar una tasa de mortalidad específica cercana al 33% en los países desarrollados. Esto ha hecho que el concepto actual de CCR no sea el de una única enfermedad, sino que el de un grupo heterogéneo de enfermedades causadas por un sustrato genético/epigenético diferenciado. El CCR surgiría de una progression guiada a través de multiples pasos que darán lugar a la transformación de la célula normal en neoplásica, causada por la acumulación de los cambios mutacionales que darán el fenotipo final.

Hay diversas clasificaciones del CCR: por localización tumoral, según evaluación anatomopatológica, pero cada vez con mayor frecuencia se clasifica en diferentes fenotipos, según sus perfiles moleculares. La clasificación molecular del CCR se realiza a partir de los eventos celulares predominantes:

1. Inestabilidad Cromosómica (IC); factor iniciador de la vía supresora.
2. Inestabilidad de Microsatélites (IMS); factor iniciador de la vía mutadora.
3. Fenotipo metilador de islotes CpG (FM); factor iniciador de la vía metiladora.

Se considera que los tumores con IC y aquellos que presentan IMS serían mutuamente excluyentes. En este grupo de CCR (CCR con IC) se encontrarían la mayor parte de los casos de CCR esporádicos (cerca del 85%), pero también aquellos casos de Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF) que presentan mutaciones a nivel germinal del gen APC como base genética.

Utilidad Clínica de los marcadores moleculares KRAS en CCR.

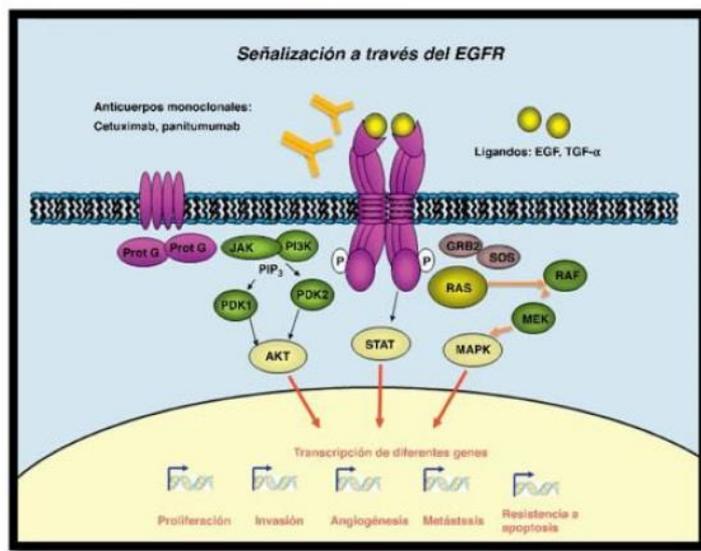
Existen otras alteraciones que son útiles para clasificar los CCR con el objetivo de predecir respuestas a terapias dirigidas (presencia de KRAS mutado o nativo en la respuesta al tratamiento con anticuerpos monoclonales frente a receptores del Factor de Crecimiento Epidérmico, cetuximab); la identificación de biomarcadores de utilidad clínica en relación al pronóstico o marcadores genéticos en casos de CCR hereditarios.

Las alteraciones genéticas determinan un fenotipo específico, que se acompaña de diferente comportamiento del cáncer en referencia al pronóstico (mayor o menor supervivencia) y con diferente respuesta ante ciertos tratamientos.

Vías de señalización de gen KRAS.

La familia de proto-oncogenes Ras tiene tres isoformas H- , N- y K-Ras, donde se encuentran mutaciones activantes en alrededor del 25% de los cánceres humanos. La gran mayoría ocurre en K-Ras y N-Ras. Las mutaciones activantes de Ras impiden su función correcta al hidrolizar el GTP a GDP, causando una permanente activación de la proteína. Las vías de señalización que activan a Ras incluyen principalmente receptores tirosina kinasas, como EGF y PDGF. Las proteínas oncogénicas Ras se alteran de tal modo que estimulan señales mitogénicas en las células afectadas sin necesidad de activar los receptores de membrana más arriba en el proceso de señalización. Esta independencia de las señales exógenas del crecimiento confiere a las células cancerosas una autonomía que rompe el control de la proliferación celular. A su vez, las proteínas Ras activan múltiples rutas de señales, siendo las de Raf-MEK-MAPK las más conocidas y relevantes en los procesos tumorales (imagen 5).

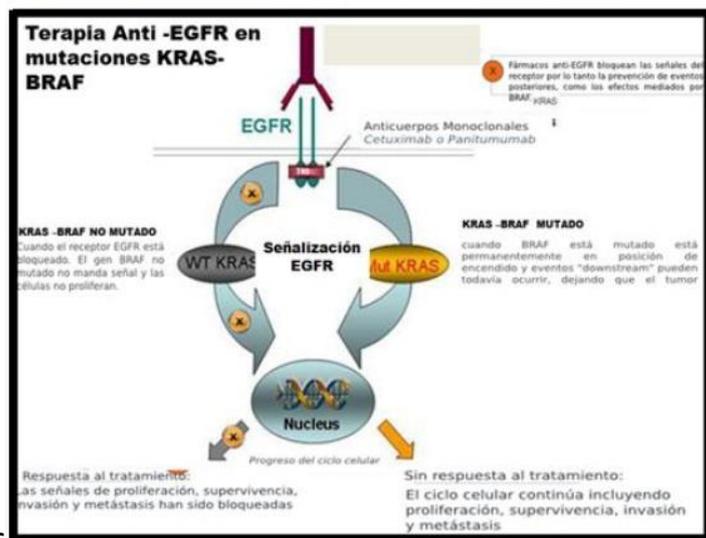
Fig.5: Vías de señalización gen KRAS



5

La identificación de las mutaciones del gen KRAS, ha sido el desarrollo más importante de los últimos años en el tratamiento del CCR metastático, ya que sería un factor predictivo de la respuesta a terapias específicas al EGFR (imagen 6).

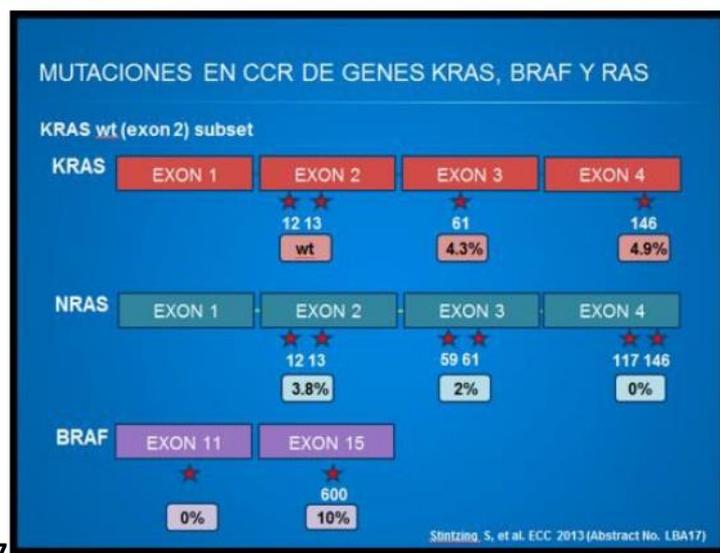
Fig.6: Terapia anti-EGFR con anticuerpos monoclonales



6

Cerca de un 40% de los pacientes con CCR metastático presentan una mutación somática de KRAS, que indicaría falta de respuesta a los inhibidores de EGFR, como el cetuximab, por lo que es necesario realizar la determinación de las mutaciones del gen KRAS antes de iniciar la terapia. El 60% restante de los pacientes tendría, KRAS no mutado. Hay otras alteraciones moleculares que también determinan falta de respuesta al cetuximab, como la presencia de mutaciones en el gen BRAF, que está mutado en el 8-10% de los CCR metastáticos. En forma menos frecuente han aparecido mutaciones en el gen NRAS que causarían el mismo efecto de falta de respuesta a la terapia anti-EGFR. Estas mutaciones son mutuamente excluyentes. La Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) ha recomendado que los pacientes que vayan a recibir terapia anti-EGFR, debieran previamente ser tamizados para la presencia de mutaciones en el gen KRAS, BRAF y NRAS (imagen 7).

Fig.7: Exones con presentación de mutaciones en genes RAS



La determinación de las mutaciones de los genes RAS se reconoce actualmente como un biomarcador de pronóstico en pacientes con CRC y como un factor de resistencia a la terapia anti-EGFR, es decir es un biomarcador predictivo negativo, al predecir cuando la terapia anti-EGFR es poco probable que funcione. La frecuencia de las mutaciones más comunes ya se ha determinado (ver tabla 3).

Tabla 3: Frecuencia de mutaciones de genes RAS en CCR

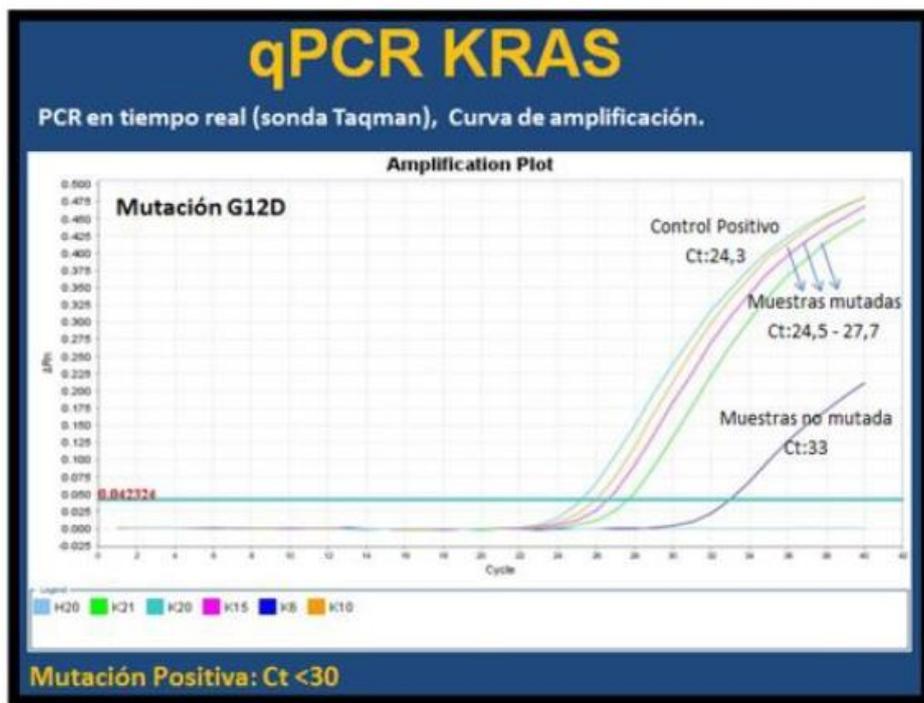
Frecuencia Mutaciones KRAS/BRAF en CCR	
Gen KRAS	Frecuencia
Codon 12	
• G12D	35.4%
• G12V	28,7%
• G12C	9.5%
• G12S	7.9%
• G12A	7.5%
• G12R	3.8%
Codon13	
• G13D	92% (en codón 13)
Gen BRAF	Frecuencia
• V600E	5-15%

Los genes RAS (HRAS, KRAS y NRAS) codifican proteínas que intervienen en la transducción de señales de crecimiento y diferenciación de los receptores tirosina kinasa. El gen NRAS se localiza en el brazo corto del cromosoma 1 (1p22-p32), mientras que los genes HRAS y KRAS se encuentran en el brazo corto de los cromosomas 11 (11p15.1-p15.5) y 12 (12p12.1), respectivamente. La secuencia codificante de los tres genes RAS está igualmente distribuida en cuatro exones.

En condiciones normales, las proteínas RAS se encuentran en equilibrio entre la forma activa (unida a GTP) y la forma inactiva (unida a GDP). Las formas mutadas de RAS pierden la capacidad de hidrolizar GTP y permanecen siempre en su forma activa. Las mutaciones más frecuentes en los genes RAS se localizan en los codones 12 y 13 (incrementan la afinidad por GTP) y en los codones 59 y 61 (inactivan la función autocatalítica GTPasa). Como consecuencia de estas mutaciones, aparece una proliferación celular descontrolada mediada por un ciclo celular en estado de síntesis permanente, favoreciendo el desarrollo tumoral.

Existen kits comerciales que determinan la presencia de las mutaciones más frecuentes para el gen KRAS y la mutación V600 para el gen BRAF que se basan en un PCR a tiempo real alelo específico (imagen 8).

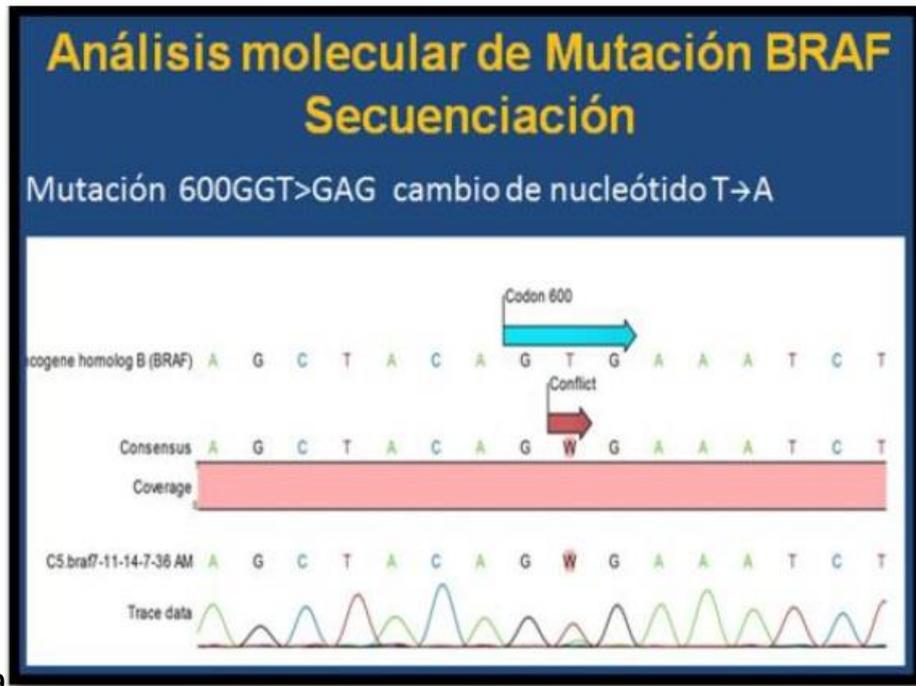
Fig. 8: PCR tiempo real alelo específico: Detección mutación KRAS



8

Estos kits usan sondas de hidrólisis acopladas a fluorocromos complementarios a las regiones de interés y que usan primers que son 100% complementarios a las variantes mutadas del gen en estudio. La Taq polimerasa solo amplifica el ADN que contienen un blanco complementario a la mutación. La mayor parte de los tumores contiene una mezcla de variantes mutadas y silvestres del gen, pero el ensayo está diseñado para amplificar preferentemente el ADN mutado, por lo que su sensibilidad es mayor que el de la secuenciación (imagen 9).

Fig. 9: Detección mutación BRAF: Secuenciación Sanger ABI 310

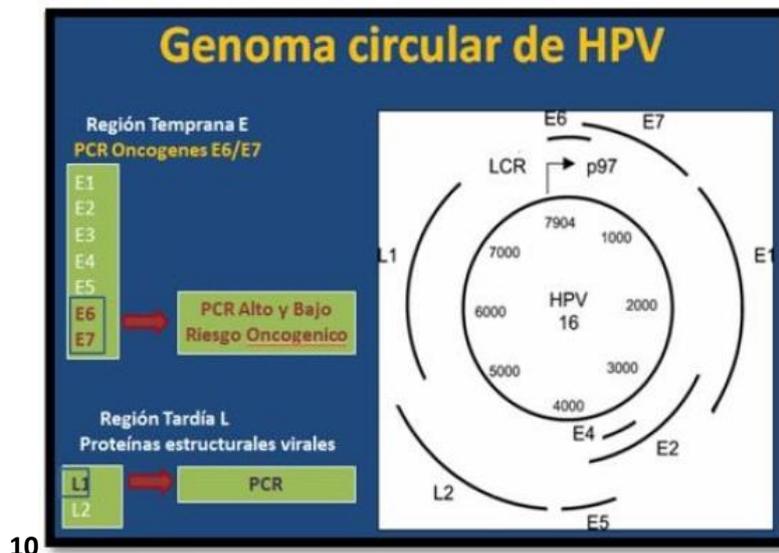


9

CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO Y SU ASOCIACIÓN CON HPV

El virus papiloma humano (HPV) no solo causa cáncer genital y anal sino que también causa un tipo de carcinoma escamoso de cabeza y cuello (CECC). Esta neoplasia corresponde alrededor del 8% de los nuevos cánceres diagnosticados a nivel mundial, que tendrían una tasa de supervivencia de alrededor de 5 años en el 40-50% de los pacientes. El HPV es un agente etiológico importante del CECC en particular de la orofaringe, donde es detectado entre el 45-90% de los casos. La presencia de HPV hace que los tumores tiendan a ser no-queratinizantes, con menos anomalías cromosómicas, rara vez con mutaciones en el p53, es decir que serían genéticamente menos complejos. La presencia de HPV en tumores CECC es más común en personas más jóvenes y con mayor número de parejas sexuales (imagen 10).

Diagrama de la estructura del genoma HPV

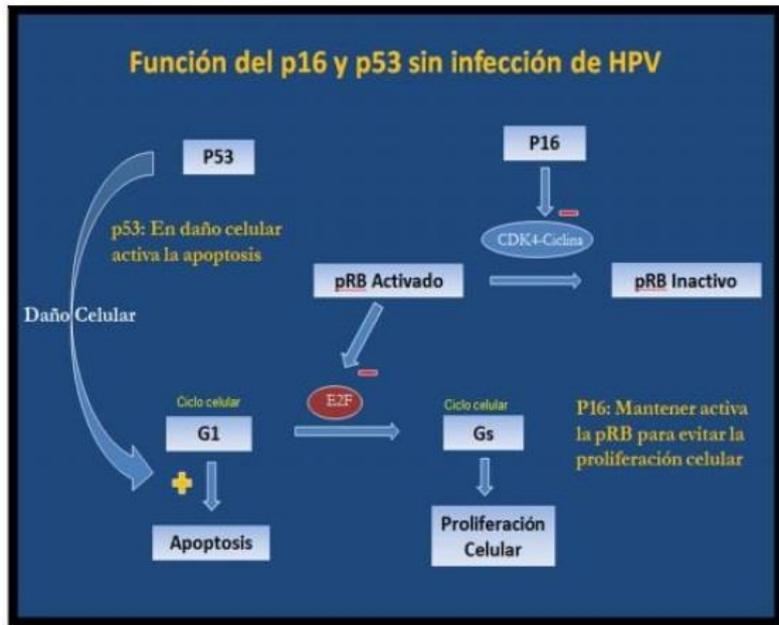


10

Los CECC de la orofaringe que presentan los genotipos de alto riesgo oncogénicos HPV-16 y HPV-18, tendrían una carcinogénesis diferente comparada con CECC que son HPV negativos.

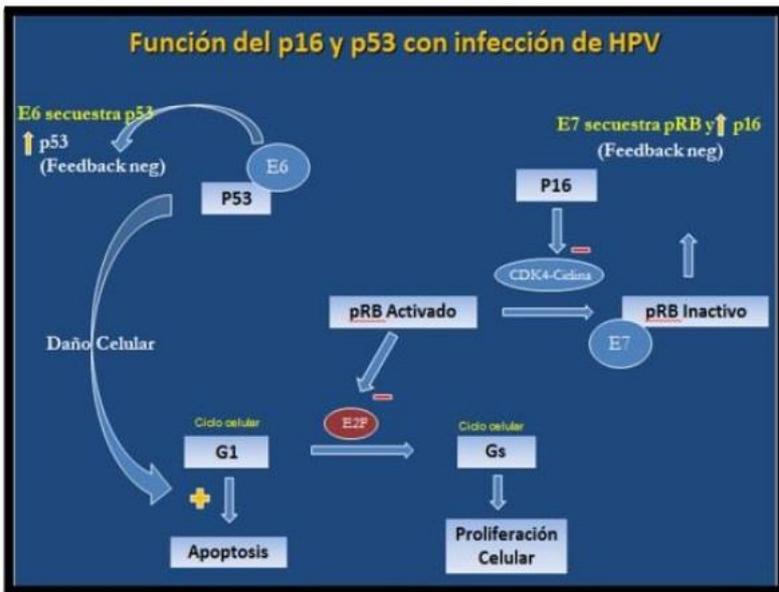
Existe evidencia clínica que el status de HPV positivo sería un importante factor pronóstico asociado con un desenlace favorable en pacientes que tienen ese tipo de cáncer. Además se ha encontrado que la expresión de p16 se correlacionaría con la presencia de HPV transcripcionalmente activos, localizados en el núcleo de la célula tumoral y no en el tejido benigno cercano. El HPV expresa las oncoproteínas virales E6 y E7 que se unen a las proteínas p53 y pRb, supresoras de tumores. En los tumores CECC-HPV positivos, el gen E7 expresa la proteína E7 y regula a la baja la expresión de la ciclina D1 y de pRB, lo que a su vez, regularía al alza la expresión de p16. (imágenes 11 y 12).

Función de p16 y p53 sin infección HPV



11

Función de p16 y p53 con infección HPV



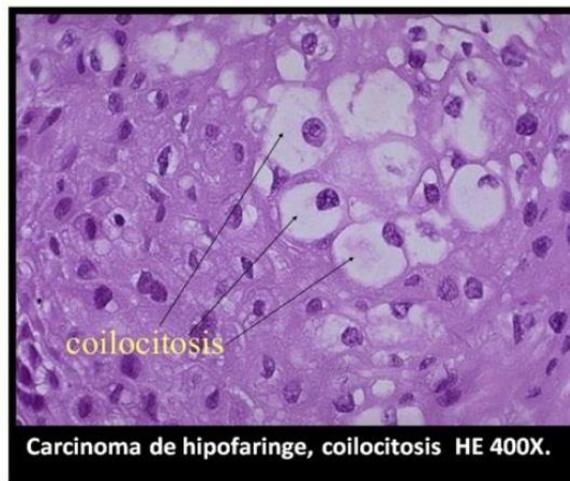
12

Estos tumores se presentan no solo como el típico CEEC queratinizante, sino que también del tipo no queratinizante, basaloide, papilar y carcinoma indiferenciado. Se considera importante saber cuál es el comportamiento de esos tumores cuando son HPV positivos a genotipos de alto riesgo. Un estudio reciente postula que la infección y persistencia del HPV en la orofarige es un hecho incidental frecuente en carcinoma de cabeza y cuello y que no tendría implicaciones pronósticas, en cuanto la infección de HPV oncogénica transcripcionalmente activa si la tendría pero es más rara y se limitaría a los cánceres orofaríngeos.

Diagnóstico convencional de HPV:

Observación de coilocitos en biopsia (HE) por microscopia directa. Histológicamente se caracteriza por la presencia de células epiteliales con atipía nuclear y presencia de vacuola perinuclear (imagen 13).

Detección de coilocitos en Carcinoma de hipofaringe.

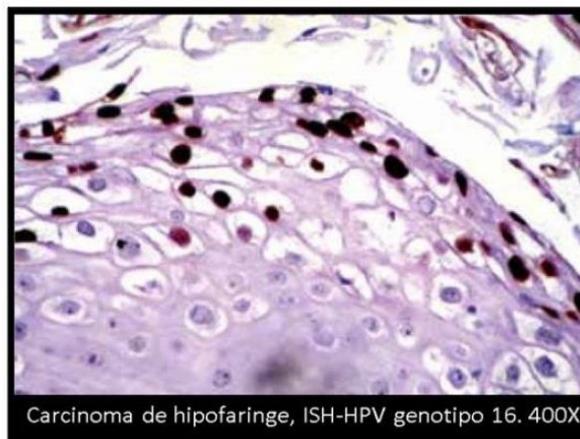


13

Diagnóstico molecular de HPV:

1. Hibridación in situ (ISH) en muestras fijadas, frescas o citológicas para detección de secuencias del HPV dentro de las células. Se basa en la producción de híbridos entre la sonda específica marcada y la secuencia complementaria de HPV presente en el núcleo de las células tumorales. Los híbridos se visualizan mediante utilización de conjugado y sustrato cromogénico que precipita en la célula que contiene secuencias del HPV (imagen 14).

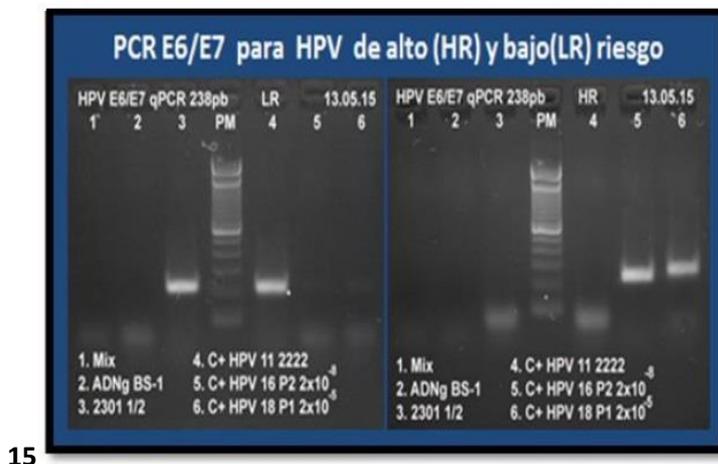
Hibridación in situ HPV 16 en carcinoma de Hipofaringe



14

2. PCR a tiempo real oncogenes virales E6/E7. Utiliza primers de secuencias de los oncogenes virales E6/E7 dirigidos a regiones específicas de genotipos de alto o bajo riesgo oncológico en biopsias de tejido fresco o fijado. Criterio de positividad: Curva de amplificación con Ct <30 y verificación del producto en gel de agarosa que se compara con los controles de genotipos de HPV de alto y bajo riesgo (imagen 15)

DetECCIÓN DE HPV POR PCR NESTED E6/E7



15

TUMORES ESTROMALES DEL TRACTO GASTROINTESTINAL (GIST).

GIST es un sarcoma poco frecuente, sin embargo la mayoría de los sarcomas del tracto gastrointestinal son GIST. Algunos hechos importantes:

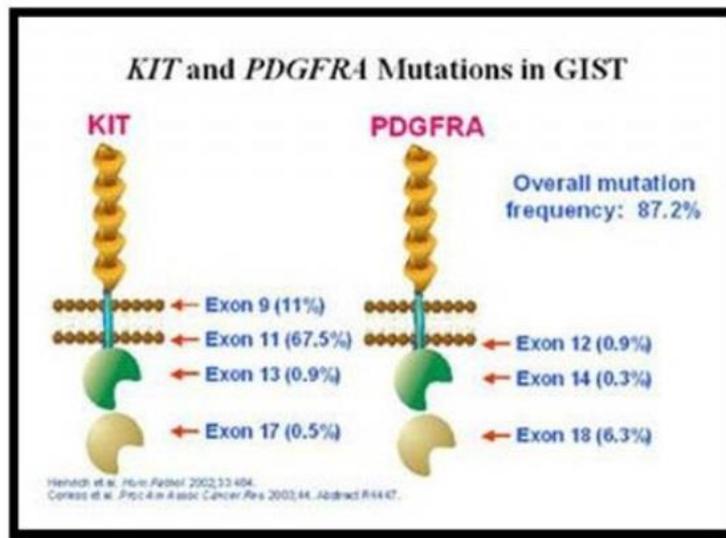
1. Su incidencia es mucho más elevada de lo estimado y ninguno puede considerarse benigno.
2. La mutación del gen KIT es un evento oncogénico precoz y la presencia del gen mutado per se no tiene importancia pronóstica.
3. Existen GIST c-KIT negativos, la mayoría de los cuales tiene mutaciones del gen PDGFR-A.
4. En caso de un cuadro morfológico de GIST y negatividad para CD117, es necesario investigar las mutaciones de KIT y PDGFR-A.
5. Tratamiento con Glivec® es efectivo en el tratamiento de los tumores GIST metastásicos e irresecables.

Aproximadamente el 85% de los GISTs son dirigidos por mutaciones activantes que ocurren en variados grados y de manera mutuamente excluyentes en dos receptores de membrana tirosina quinasa: c-kit y PDGFR-A (platelet-derived growth factor receptor- α), que están activamente involucrados en vías de señalización. Estos receptores luego de la unión con el ligando dimerizan y se activa la tirosina quinasa. Esta activación produce el desarrollo del tumor. La importancia de detectar estas mutaciones ha significado poder confirmar el diagnóstico de GIST y predecir la respuesta al tratamiento. En GISTs avanzados se recomienda el uso de imatinib mesilato u otros inhibidores de la actividad de los receptores de tirosina quinasa asociados a GIST.

Los tumores GIST primarios presentan mutación en uno de los dos genes de tirosina quinasa pero no en ambos, ya que cada uno es una ruta alternativa de desarrollo del tumor. Las mutaciones en el gen PDGFR se producen casi exclusivamente en GIST del estómago y a menudo siguen un curso clínico más indolente.

Las mutaciones del gen c-kit (4q11-12) se encuentran en los exones 8,9,11,13 y 17 y las del gen PDGFR (4q12) en los exones 12,14 y 18 (imagen 16).

Ubicación de mutaciones genes KIT y PDGFRA en GIST

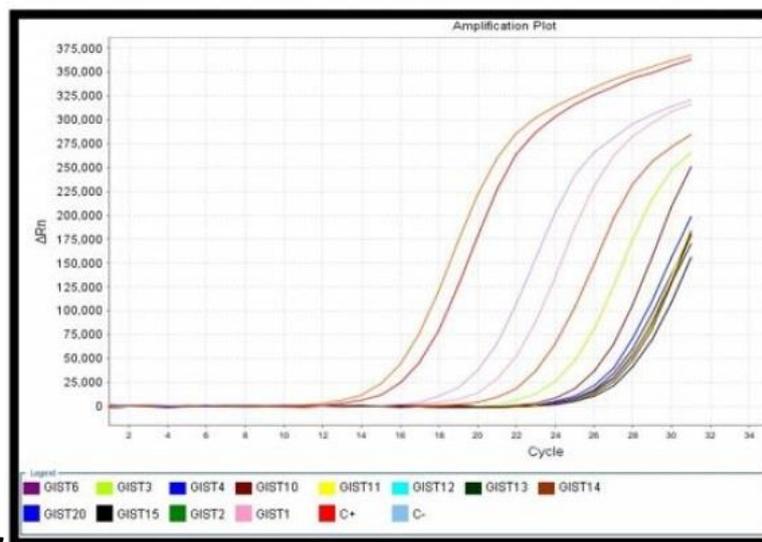


16

La mutación D842V en el exón 18 es responsable del 60% de las mutaciones del gen PDGFR y confiere resistencia primaria a los inhibidores de la tirosina. Esta mutación es análoga a la mutación D816V en el gen c-kit, sin embargo la mutación D816V del c-kit no se presenta en los tumores GIST primarios sino que surgiría durante el curso de la terapia como una mutación secundaria adquirida, causando resistencia a imatinib. Las mutaciones KIT ocurren tempranamente en el desarrollo de los GIST pero no son suficientes por sí solas para inducir malignidad. GIST recurrentes e inoperables, requieren terapia sistémica de fármacos inhibidores de la tirosina kinasa, sin embargo los pacientes con GIST y presencia de mutación D842V en el gen PDGFR presentarán resistencia al tratamiento.

Existen kits comerciales para realizar la detección de las mutaciones más relevantes, como la D842V y la D816V para el gen PDGFR y c-kit respectivamente; mediante PCR a tiempo real alelo específico (imagen 17).

PCR tiempo real detección de mutación D842V en PDGFRFA



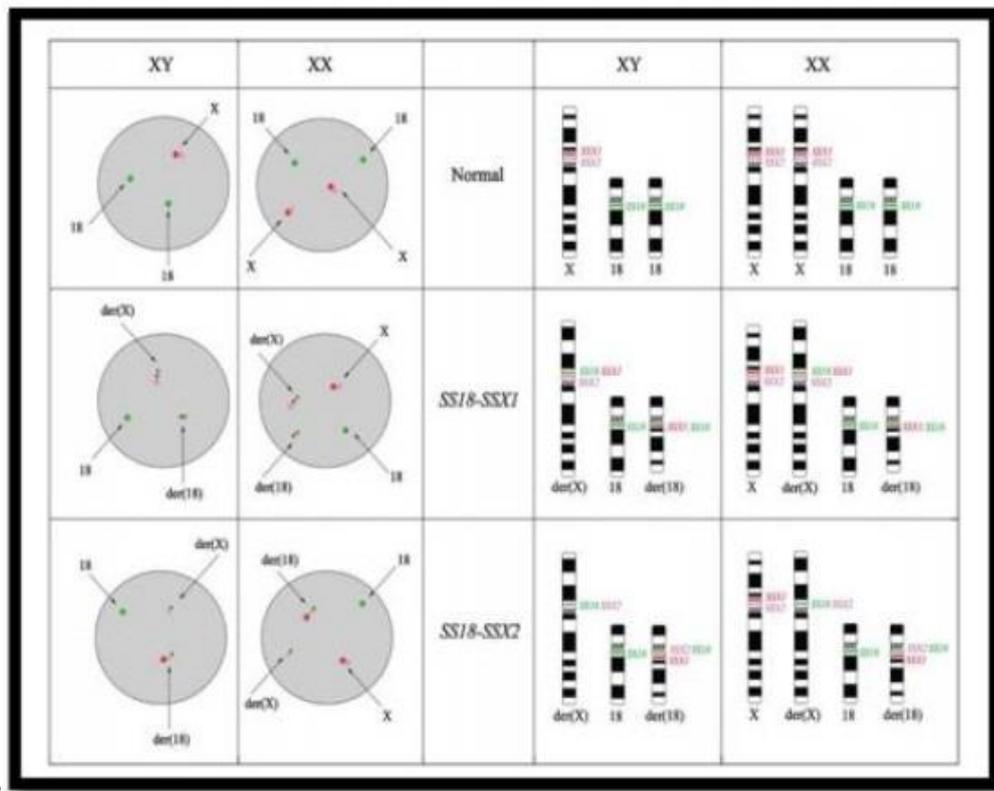
17

SARCOMA SINOVIAL (SS)

El sarcoma sinovial es una neoplasia morfológicamente bien definida, localizada en los tejidos blandos de la vecindad de las grandes articulaciones. El espectro morfológico es amplio, con cuatro variantes o fenotipos principales: bifásico, fibroso monofásico, epitelial monofásico y el poco diferenciado. La técnica de IHQ no es específica para este tumor.

El diagnóstico de sarcoma sinovial es compleja especialmente para poder diferenciarlo de algunos tipo de sarcoma de células fusiformes. El diagnóstico molecular es el más preciso ya que más del 90% de los casos presenta la translocación $t(X;18)$ (SYT;SSX) específica para este tipo de tumor (imagen 18).

Tipos de FISH según gen de fusión $t(X;18)$. Localización de genes de fusión en cromosomas normales y con translocación.

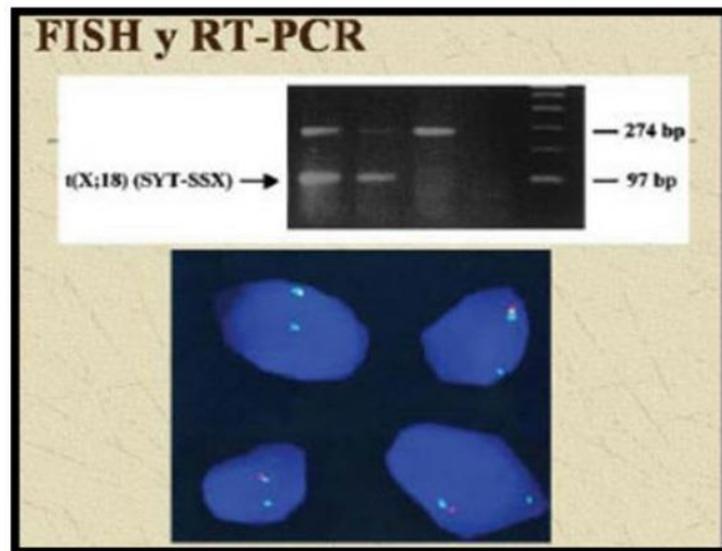


18

Las técnicas a utilizar son mediante RT-PCR y FISH. La translocación produce 3 tipos de genes de fusión formados en parte por el componente SS18 del cromosoma 18 y por los componentes SSX1, SSX2 y raramente SSX4 del cromosoma X. Existe una clara correlación entre el tipo de gen de fusión, el subtipo histológico y el pronóstico del paciente.

Para realizar el RT-PCR se requiere de una muestra congelada para obtener RNA de calidad. Es por eso que se usa también el test de FISH como una alternativa de marcador cromosómico, para diferenciar entre los genes de fusión más frecuentes SS18-SSX1 and SS18-SSX2. El análisis se realiza en la metafase e interfase de las células (imagen 19).

RT-PCR con transcritos de fusión. FISH con t(X;18)



19

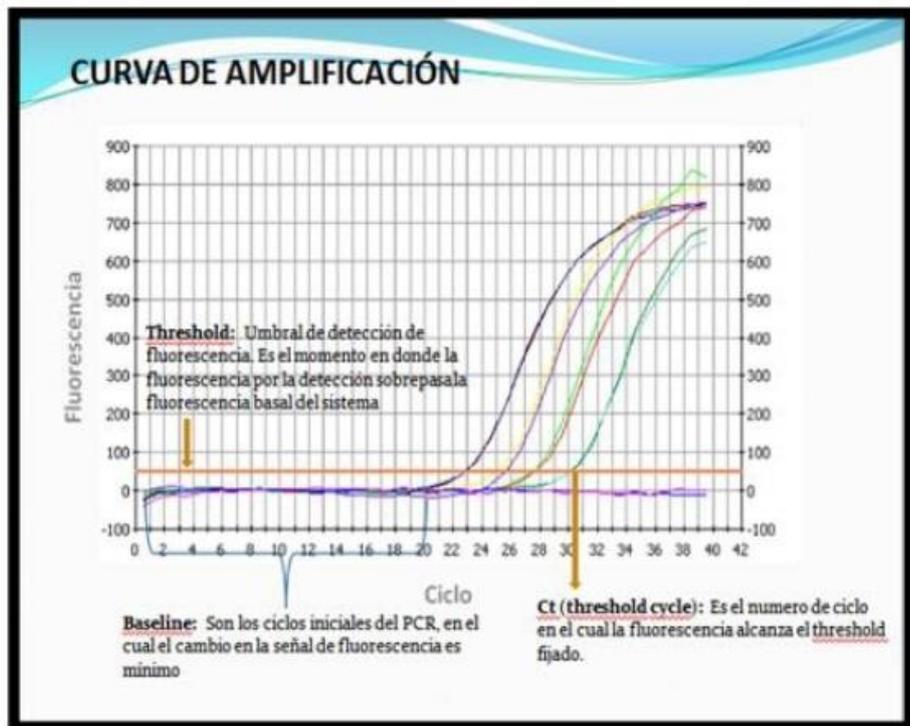
Tratamiento y selección de terapia para target moleculares

El tratamiento del SS consiste en resección quirúrgica amplia, asociada a terapias adyuvantes (quimioterapia). Además actualmente se está experimentando con nuevas modalidades terapéuticas en concordancia con dianas terapéuticas. Al ser sobreexpresada Bcl2 (proteína antiapoptótica) en la mayoría de los casos, terapias destinadas a su bloqueo (G3139) favorecerían la apoptosis de las células neoplásicas. Algo similar ocurriría con el uso de Gefitinib contra EGFR, expresado en más de la mitad de los casos de sarcoma sinovial. Por último, podría incluso valorarse el uso de Trastuzumab siempre que se demostrara la sobreexpresión de HER-2, presente en algunos casos.

TECNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCION DE MUTACIONES.

1. PCR a tiempo real alelo específico con sondas Taqman®

Definición. Monitorea el progreso del PCR en cuanto ocurre (tiempo real), a diferencia del PCR convencional, productos de PCR se observan a lo largo del proceso, lo que permite cuantificar el ADN o ARN. Utiliza los mismos reactivos que el PCR convencional, pero además se agrega una molécula fluorescente intercalante de ADN que permite su visualización en el momento que ocurre. La especificidad de la reacción la confiere el uso de sondas. Las sondas Taqman® son oligonucleótidos de hidrólisis de secuencia complementaria al ADN a amplificar, marcadas con un fluorocromo reportero o donador de fluorescencia en el extremo 5' y uno aceptor de fluorescencia o quencher en el extremo terminal 3'. Mientras la sonda no hibridiza, la presencia del quencher reduce la fluorescencia emitida por el reportero por el proceso FRET (fluorescence resonance energy transfer). Si la sonda se hibridiza con el blanco por la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa, se corta (cleavage) cuando el primer se extiende. El cleavage de la sonda hace que el fluorocromo reportero se separe del quencher, aumentando la señal de fluorescencia. El aumento de intensidad de la fluorescencia es proporcional a la cantidad de producto de PCR producido, representado en la curva que indica el Ct. (imagen 20)



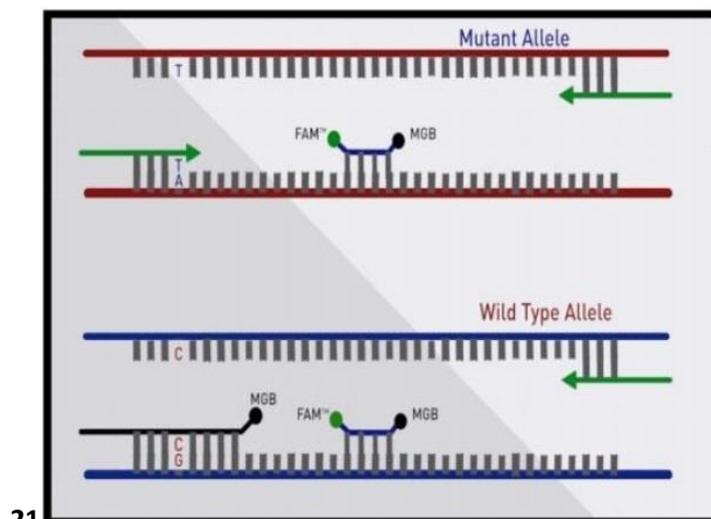
20

PCR a tiempo real alelo específico. Utiliza secuencias de primers que amplifican un tipo específico de alelo, ej el mutado, por lo que se obtiene solamente producto amplificado si existe una mutación detectable en el ADN del paciente. El PCR alelo específico se dirige a mutaciones somáticas claves en el oncogén.

Cada ensayo alelo específico contiene:

- un partidor específico de alelo que detecta el alelo mutante.
- un bloqueador oligonucleótido MGB que suprime el alelo no mutado (wild).

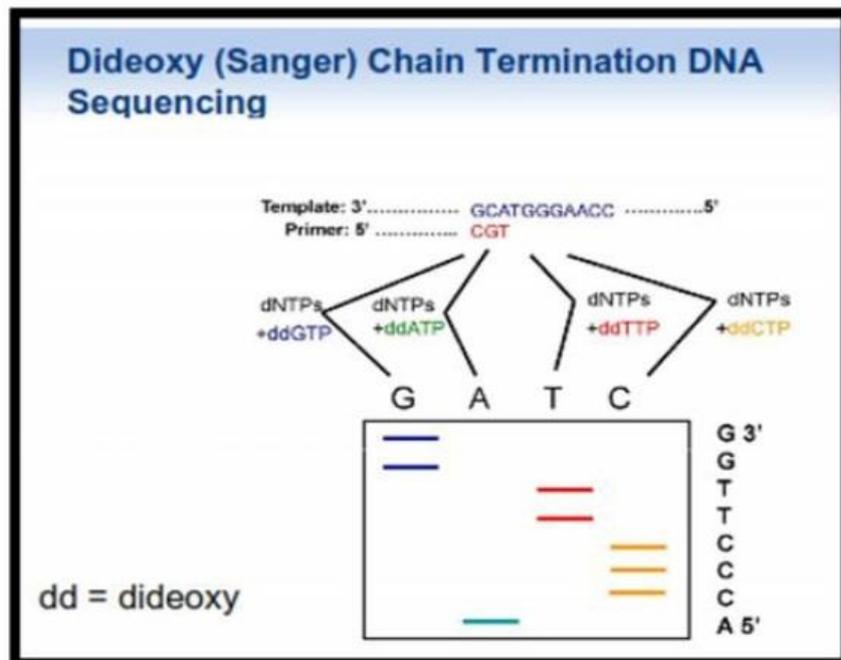
Este tipo de PCR a tiempo real tiene una enorme sensibilidad de detección de 0.1-1% de alelos mutados entre alelos no mutados, por lo que se utiliza preferentemente para análisis clínico de mutaciones (imagen 21).



21

2. SECUENCIACION SANGER POR ELECTROFORESIS CAPILAR (electroferograma). ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1 CycleSequencing Kit.

La secuenciación del ADN tiene la finalidad de determinar el orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un fragmento de ADN. La sensibilidad es menor que la del PCR a tiempo real requiriendo al menos la presencia de 5% de alelos mutados, pero es el gold standard ya que permite detectar mutaciones que están poco representadas en la muestra. La secuenciación por término Sanger se basa en el uso de dideoxynucleótidos trifosfato (ddNTPs) como terminadores de la cadena de ADN. Requiere de una hebra molde sencilla de ADN, un primer de secuenciación, DNA polimerasas, nucleótidos regulares (dNTPs) y nucleótidos modificados (ddNTPs) que terminan la elongación de la cadena de ADN. La molécula de dideoxynucleótido, al no tener un grupo -OH unido al carbono 3' de la ribosa, no permite que la polimerasa pueda añadir un nuevo nucleótido y por lo tanto la síntesis de ADN tiene un término. Cada reacción contiene uno de los 4 dideoxynucleotidotrifosfatos (ddNTP) que terminan la síntesis selectivamente en G, A, T, C. La imagen 22 muestra una representación de secuenciación dideoxi (Sanger) de término. En la parte superior se observa el templado y el primer. La DNA polimerasa se une y añade nucleótidos al primer utilizando los nucleótidos dNTPs y ddNTPs presentes en la reacción. En la imagen 20 el primer nucleótido para detener la síntesis con la adición de un ddNTP será un ddATP (dideoxyadenine) el producto generado será el más corto y avanza más rápido en el gel.



22

Se observa como una barra verde. Las siguientes tres adiciones de dideoxynucleótidos, que detendrán la síntesis será ddCTP (dideoxicitocina), ddTTP(dideoximitidina) y ddGTP dideoxiguanina. La secuencia puede ser leída de abajo hacia arriba y es ACCCTTGG. El secuenciador ABI 310 no utiliza gel de poliacrilamida, sino que capilares llenos de un polímero que actúa de una manera similar al gel. La muestra entra en los capilares y fluye a través de ellos y finalmente pasa por un láser y se registra la señal de secuencia. Cada nucleótido dideoxitrifosfato está marcado con un tipo diferente de molécula fluorescente para su visualización (imagen 23).

