

METODOS COMPLEMENTARIOS

Como ya vimos la técnica de coloración de rutina es la Hematoxilina - Eosina; sin embargo, cabe señalar que existen técnicas de coloraciones especiales:

- **GIEMSA** = para *Helicobacter Piloni* (usada en Bx endoscópicas gástricas)
- **ZIEHL - NEELSEN** = para Bacilos Ácido Alcohol Resistentes (usadas para confirmar si hay no TBC por BAAR en Bx de pulmón)
- **PAS** = para Hongos, a los que tiñe de color rojo (usada para confirmar micosis de diverso tipo)
- **ALCIAN BLUE** = para células productoras de moco, a las que tiñe de azul (utilizada en diagnóstico de esfago de Barret o metaplasia de Barret)
- **ROJO CONGO** = tiñe de rojo sustancia amiloide (utilizada para el diagnóstico de Amiloidosis)

OTROS MÉTODOS COMPLEMENTARIOS

A.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA (ME): La microscopía electrónica permite:

- Alcanzar una magnificación de hasta 500000 aumentos de la muestra
- El ME se enfoca por campos magnéticos sobre una pantalla fluorescente o sobre un aplaca fotográfica.
- Es muy utilizada en Patología Glomerular, ya que detecta los mínimos cambios que se producen en los Podocitos, Membrana Basal, Células Mesangiales, etc.

B.- INMUNOFLOURESCENCIA:

- Esta técnica requiere de **muestras en fresco (tej. sin fijación convencional)** ya que los componentes a marcar están presentes en las superficies celulares o son muy lábiles a la fijación con formol.
- En la Inmunofluorescencia se utilizan coloraciones fluorescentes (como la fluoresceína) que bajo luz ultravioleta emiten una luz de longitud de onda visible, cuyo color dependerá de la naturaleza del compuesto.
- A pesar de ser una técnica muy sensible ofrece detalles morfológicos pobres. Además la tinción de la muestra (reacción) debe registrarse o documentarse con microfotografías ya que los colorantes se degradan.
- La inmunofluorescencia (junto con la ME, las tinciones de rutina con Hematoxilina - Eosina, PAS y/o trípica) integra el trabajo para el diagnóstico de las enfermedades glomerulares.

C.- POLARIZACIÓN:

- Indica el carácter birrefringente de ciertos tipos de depósito fibrilar colágeno (por ej. en la Amiloidosis)
- Con esta técnica se visualiza de color rojo manzana a los depósitos fibrilares.
- La Polarización complementa el uso de técnicas de rutina coloreadas con Hematoxilina - Eosina frente a un cuadro clínico que nos hace sospechar de Amiloidosis.

D.- INMUNOMARCACIÓN:

- Consiste en la detección de Antígenos (Ag) existentes en células o tejidos. Tiene alta especificidad y sensibilidad.
- Emplea Anticuerpos (AC) Monoclonales o Policlonales conjugados con una enzima (peroxidasa) que

es la responsable del color marrón que toma la muestra que presenta el Ag buscado (El AC por medio de la enzima se une al Ag buscado).

• **Tipos:**

- **Marcación Directa** = Modalidad en la cual los anticuerpos marcados con fluorocromos se unen directamente al antígeno.
- **Marcación Indirecta** = Modalidad en la cual los anticuerpos específicos no marcados (AC 1  o) se unen, en una primera etapa al antígeno y; en una segunda etapa, al anticuerpo marcado con fluorocromo (AC 2  o). Su principal ventaja, frente a la inmunofluorescencia directa, es su mayor sensibilidad.
- El patólogo, al estudiar la neoplasia, primero realiza técnica de rutina con Hematoxilina - Eosina para tener una impresión diagnóstica que oriente los paneles de AC a utilizar, con los que se determinará el origen de la neoplasia.:
- Si el tumor indiferenciado nos hace sospechar de un :
- Al visualizar el preparado con MO, se puede observar el color marrón en el núcleo o el citoplasma de las células tumorales (según el sitio donde se encuentre el Ag).
- La inmunomarcación nos permite estudiar, mediante anticuerpos, el origen de aquellos **Tumores o Neoplasias Indiferenciadas, Metastasis** de origen primitivo desconocido o indiferenciado.
- A demás de confirmar que tipo de tumor es, la inmunomarcación, también sirve como una técnica predictiva en la respuesta al tratamiento de una paciente con Ca. de mama, pudiendo evaluar como responde al tratamiento hormonal (determina si un tumor de mama tiene receptores de estrógenos y/o progesterona, lo cual orienta la terapéutica a seguir).

Recordar como mnemotecn  :

- Indica Origen del tumor
- Neoplasia Indiferenciada
- Metastasis
-   nico Ag específico es el prost  tico (por eso se usan paneles de Ac para determinar origen)
- No reemplaza la técnica de rutina con Hematoxilina - Eosina
- Orienta el Tratamiento en el Ca. de mama

EJEMPLOS DE MARCADORES INMUNOHISTOQUIMICOS	
Anticuerpo	Células o Tej. c/antígenos detectados
S100	células de Schwann (Neoplasias de origen nervioso)
GFAP	Células de la Gl��a
HMB-45	melanocitos (Melanoma)
Citoqueratina 7	Epitelio Simple (Neoplasia de Origen Epitelial)
Citoqueratina 20	Epitelio Gastrointestinal (Neoplasia de Origen Epitelial)
AE1	citoqueratinas de bajo peso molecular
AE3	citoqueratinas de alto peso molecular
Desmina	células musculares (Neoplasia de Origen Muscular)

Vimentina	Neoplasia de Origen Mesenquimático
VIM	Sarcomas
CEA (Antígeno Carcino-Embrionario)	
AFP (Alfa-Fetoproteína)	
REN (Receptores Nucleares de Estrógenos)	
Ag Común Leucocitario	
CD1a	Células de Langerhans
CD4	linfocito T de auxilio
CD8	linfocito T citotóxico
CD30	célula de Reed-Sternberg
CD45	leucocitos
CD68	macrófagos

E.- PATOLOGÍA A MOLECULAR:

Permite conocer el Mecanismo por el cual se origina una neoplasia, así como también aporta información de valor pronóstico y sobre la Respuesta Terapéutica.

Tiene Valor pronóstico por que :

- Estudia el Crecimiento lrico asociado a los mecanismos moleculares responsables de la neoplasia.
- Estudia cambios Cromosómicos lricos.
- Estudia Cambios Cromosómicos 2ricos., los que determinan si la enfermedad seguirá un curso más agresivo , si se volverá más resistente a la terapéutica o si será difícil de obtener una remisión completa.

Si por esta técnica se informa ausencia de células normales , será un indicativo de que el pronóstico es peor, mientras que si se informa presencia de células normales , esto indicará un mejor pronóstico.

F.- HIBRIDACIÓN IN SITU (HIS):

- Permite la detección y localización de secuencias específicas de ADN o ARN en muestras biológicas, mediante el uso de secuencias complementarias a ADN/ARN celular (sondas), que en condiciones apropiadas forman híbridos estables. Estas sondas se "marcan" con moléculas fluorescentes (por ejemplo con biotina o fluoresceína).

Es decir, las sondas se hibridan o unen al ADN o ARN complementario de la muestra a examinar y, como están marcadas con moléculas fluorescentes, permiten localizar las secuencias en las que se encuentran. A diferencia de otras pruebas utilizadas para estudiar los cromosomas que requieren que las células se encuentren en división celular activa, la hibridación in situ puede ser realizada en células que no están en división celular (no activas).

- Esta técnica es especialmente útil para mapear genes o localizar anomalías cromosómicas; pero también es útil en la detección genética de virus (sobre todo cuando existe un bajo número de copias virales), en particular de virus altamente infecciosos y con capacidad de mutar rápidamente (CMV); así como también para virus oncogénicos (HPV, HBV, EBV).

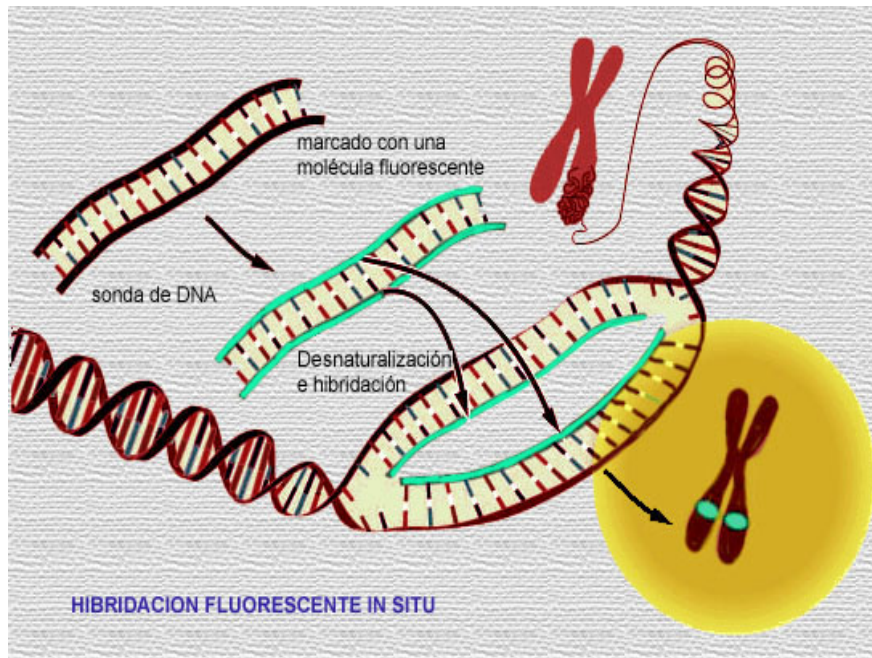
- En general, la hibridación puede hacerse sobre soportes sólidos (filtros de nylon o nitrocelulosa), en solución (in vitro) o en cortes de tejido o preparaciones celulares (in situ).
- La FISH requiere de una desnaturalización (rotura de los enlaces) de ADN de la muestra y de la sonda utilizada.
- La Sonda complementaria utilizada presenta una secuencia conocida de Bases. La Interpretación microscópica se realiza de acuerdo a la sonda utilizada.

- **Tipos de Sonda:**

- ♦ **Centroméricas o Alfoideas** â Contienen secuencias complementarias que se encuentran en los centrómeros de los cromosomas; Es decir, **marcan la región centromérica**. Pueden valorar la presencia o ausencia de alteraciones numéricas. Como pueden utilizarse sondas de diferentes colores (cada cromosoma puede ser marcado de manera distinta) por ejemplo, se puede averiguar si un individuo tiene el número correcto de cromosomas o si tiene un cromosoma extra.
- ♦ **De Pintado Cromosómico Completo** â Con ellas se puede marcar todo un cromosoma. Pueden valorar alteraciones numéricas y estructurales en metafase; así como también translocaciones complejas. Utilizando estas sondas se consiguen imágenes en color que permiten examinar los cariotipos de una forma más exacta que los tradicionales cariotipos basados en bandas más o menos oscuras.
- ♦ **De Secuencia Específica (Sondas Específicas de Locus)** â Marcan regiones cromosómicas muy concretas. Sirven para valorar alteraciones numéricas y estructurales en metafase e interfase.

- **Nuevas Técnicas de FISH:**

- **Multicolor FISH** â Se utilizan unas 24 sondas de marcado cromosómico, marcadas con fluorescencia sobre metafase.
- **Multibanding FISH** â Permite estudiar una alteración estructural dentro de un mismo cromosoma (utiliza células en división).
- **Hibridación Genómica Comparada (HGC)** â detecta cambios numéricos de secuencias de ADN en tumores de índice proliferativo bajo.



G.- MICROARRAYS:

- Técnica que usa soportes sólidos en los que las moléculas de ADN de cadena simple se fijan y permiten identificar por hibridación la expresión de una multitud de genes de una muestra biológica.

Aislamiento de ARN de tejido normal y de una muestra de referencia.

Síntesis de ADN y marcaje con dos colorantes fluorescentes (Cy3 y Cy5).

- **Hibridación sobre el Array.**

- ♦ La diferencia de expresión del ARN entre ambos tejidos se puede evaluar a partir de la relación Cy3/Cy5 para cada gen.
- ♦ El análisis nos permite definir el patrón de expresión genética para cada muestra concreta.

- **Principales aplicaciones:**

- ♦ Clasificación de neoplasias morfológicamente similares pero con comportamiento biológico heterogéneo.
- ♦ Evaluación del pronóstico.
- ♦ Respuesta al tratamiento.

H.- REACCION EN CADENA DE POLIMERASA o PCR: (Método implementado en 1985 por Kari Mullis)

- Es un método enzimático que **consiste en la Preparación y Dosaje de Ácidos Nucleicos (ADN-ARN)**; la técnica **permite amplificar in vitro una secuencias conocidas del genoma**; y esto posibilita detectar alteraciones, mutaciones o rearrreglos cromosómicos. Es decir, este método permite hacer múltiples copias de un segmento predeterminado de ADN que se desea evaluar. Las muestras pueden obtenerse a partir de material de autopsia, biopsias y/o citologías.

- Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, y usa ciclos de alta y baja temperatura para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí— tras cada fase de replicación y; a continuación se deja que vuelvan a unirse a polimerasas para que nuevamente dupliquen.
- **La PCR es un proceso que consta de tres pasos que forman un ciclo, el que se repite un número determinado de veces.**

Un ciclo de PCR consiste de los siguientes pasos:

- **Denaturalización**
- **Unión (Alineación)**
- **Extensión**

El proceso se lleva a cabo en un termociclador, un instrumento que automáticamente controla y alterna las temperaturas durante periodos programados de tiempo para el número apropiado de ciclos (usualmente 30-40 ciclos).

Paso 1: **Denaturalización por Calor.**

La denaturalización por calor (usualmente mayor o igual 90 °C) separa la doble hebra de DNA en dos hebras sencillas rompiendo los enlaces de hidrógeno que unen a las bases, mientras que los enlaces entre la desoxirribosa y los grupos fosfato permanecen intactos.

Paso 2: **Alineación - Unión del Partidor al Objetivo.**

Los partidores son secuencias sintéticas cortas de ADN de una sola hebra que consisten de 20-30 bases. Son específicos y delimitan la región objetivo del genoma del organismo de interés. Se incluyen dos partidores en la reacción de la PCR, cada uno complementario de una de las hebras de ADN que se separaron durante la desnaturalización. Usualmente, este proceso se lleva a cabo entre 40 °C y 65 °C, dependiendo de la longitud y de la secuencia de bases de los partidores. Esto permite la unión específica de los partidores a su hebra complementaria.

Paso 3: **Extensión.**

Una vez que los partidores se unieron a sus secuencias complementarias, se eleva la temperatura a 72 °C y la enzima Taq ADN polimerasa se usa para replicar las hebras de ADN. La **Taq polimerasa** comienza el proceso de extensión en dirección 5' a 3' agregando los nucleótidos correspondientes, obteniéndose la hebra complementaria de DNA.

Al final del primer ciclo de la PCR, hay dos dobles hebras de DNA idénticas a la original, cada nueva hebra producida se denomina **AMPLIFICADO**.

Este ciclo de tres pasos (denaturalización, alineamiento y extensión) puede repetirse muchas veces. Conforme la PCR continúa, se crean primero dos, cuatro, ocho,2n copias (n= número de ciclos), obteniéndose después de 30 ciclos 1.073.741.824 copias. Este proceso es al que se llama **AMPLIFICACIÓN**, debido a que la secuencia objetivo es copiada una y otra vez con el objeto de hacer millones de copias.

- Una vez amplificado el ADN, éste puede identificarse mediante electroforesis en Gel de Agar o mediante Southern Blot.
- Sin embargo, uno de los problemas más frecuentemente que enfrenta este método es la contaminación de las muestras, lo que puede producir falsos positivos. El control negativo consiste

en realizar la reacción con todos los componentes excepto ADN blanco. La contaminación debe controlarse estrictamente (uso de mascarilla, doble guante, reactivos esterilizados, micropipetas esterilizadas con puntas con filtro, cuarto aislado y, en lo posible, sólo un manipulador técnico).

- Actualmente la PCR tiene aplicaciones muy variadas y es una técnica muy utilizada en arqueología, medicina, pruebas de paternidad, genética, histopatología, investigaciones biológicas y diagnóstico clínico.

• **En Anatomía Patológica se Aplica la PCR en:**

- 1) Expresión de oncogenes y genes supresores de tumores en neoplasias
- 2) Clonalidad de linfomas
- 3) Identificación de agentes infecciosos y virus oncogénicos como virus, bacterias y micobacterias
- 4) Estudio de mutaciones y pérdida de heterocigocidad (LOH), etc.

• **Otros Usos de la PCR**

- Huella genética (Detección de ADN : identificación de individuos, test de paternidad, mutaciones)
- Diagnóstico de enfermedades hereditarias (por alteraciones genéticas)
- Clonación de genes
- Mutagénesis (Detección del Genotipo de Mutaciones Específicas)
- Detección de microorganismos (en alimentos, en muestras procedentes de enfermos)
- Análisis de ADN fosil
- Amplificación de ADN de organismos extintos para hacer comparaciones filogenéticas; etc.

PCR a partir de RNA El genoma de muchos virus de importancia clínica está compuesto de ARN en lugar de ADN, los más sobresalientes son el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV), el Virus de la Hepatitis C (VHC) y la familia de Enterovirus (EV).

Debido a que el ARN usualmente es de una sola hebra y es sensible al calor, es necesario hacer una transcripción reversa (RT) antes de iniciar la amplificación por PCR. La transcripción reversa genera una copia de la hebra de ARN, pero esta copia es ADN complementario (ADNc) el cual es estable al calor y puede resistir la metodología PCR.

Los pasos de la RT-PCR son:

- Transcripción reversa: Unión del primario a la secuencia de ARN objetivo.
- Transcripción reversa: La **RT** cataliza la extensión del primario mediante la incorporación de nucleótidos complementarios.
- Fin de transcripción reversa, se obtiene la hebra del ADNc complementario al ARN.
- PCR.

No Debemos Olvidar:

- ♦ Conocer datos clínicos y exámenes complementarios del paciente.
- ♦ Seleccionar el tipo de biopsia a realizar según la patología y órgano afectado.
- ♦ Envío del material en óptimas condiciones y con los datos pertinentes.
- ♦ Fijación y procesamiento adecuados.
- ♦ Descripción macroscópica.
- ♦ Diagnósticos microscópicos.
- ♦ Aspectos relacionados con el pronóstico y terapéutica.