

APLICACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES EN DERMATOPATOLOGÍA

Angel Santos-Briz Terrón
Departamento de Anatomía Patológica
Hospital Universitario de Salamanca
Salamanca

ANATOMÍA PATOLÓGICA: 150 AÑOS

Desarrollo de técnicas:

- Histoquímica
- Ultraestructura
- Inmunohistoquímica

Limitaciones de la evaluación morfológica

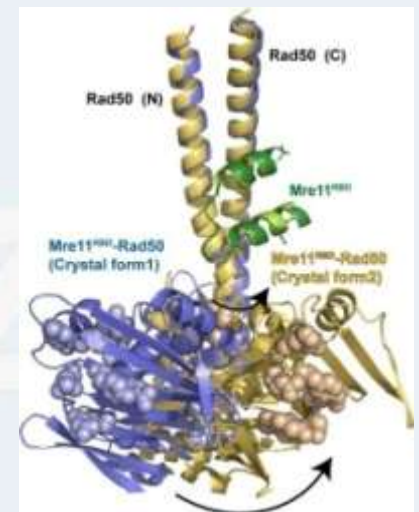
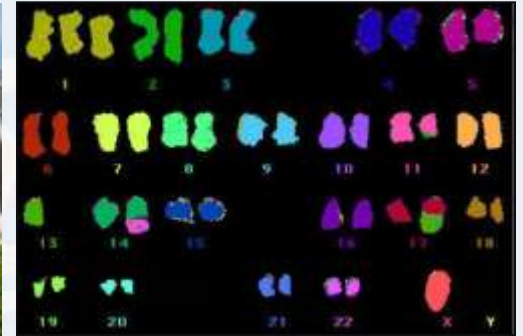
Han redefinido la especialidad



ZARAGOZA

ANATOMÍA PATOLÓGICA: MÉTODOS MOLECULARES

- Inicialmente desarrollados para investigación



ANATOMÍA PATOLÓGICA: MÉTODOS MOLECULARES

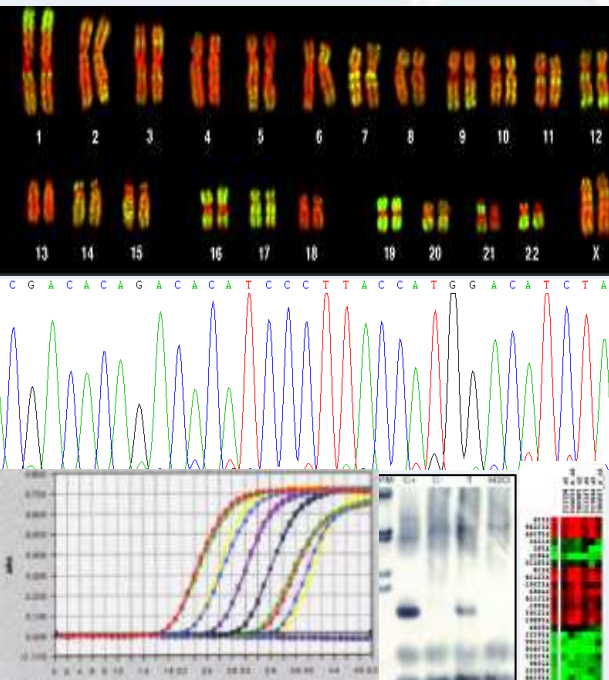
- Inicialmente desarrollados para investigación
- Herramienta diagnóstica complementaria al estudio histopatológico convencional.



DIAGNÓSTICO MOLECULAR:

ANATOMÍA PATOLÓGICA: MÉTODOS MOLECULARES:

- Campo intimidatorio

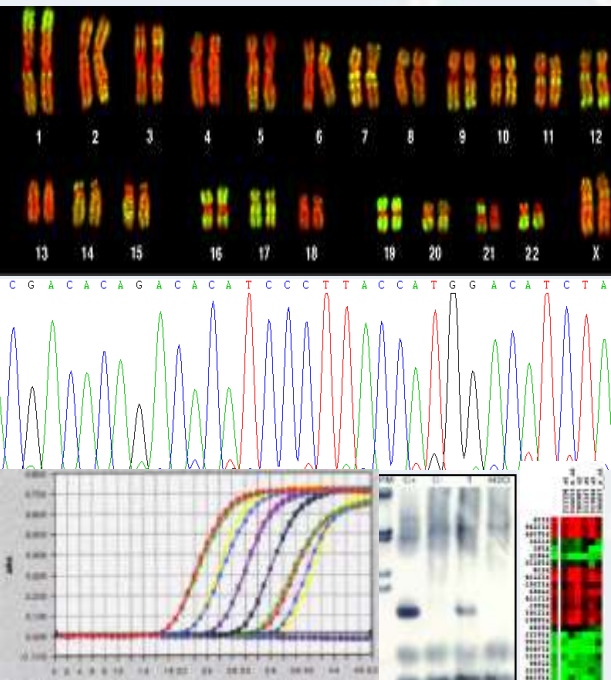


RAGOZA

DIAGNÓSTICO MOLECULAR:

ANATOMÍA PATOLÓGICA: MÉTODOS MOLECULARES:

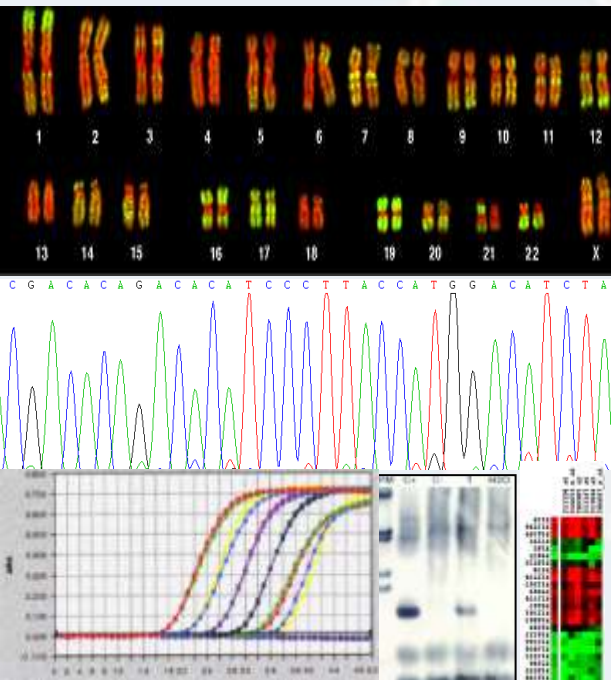
- Campo intimidatorio
- Recursos limitados



DIAGNÓSTICO MOLECULAR:

ANATOMÍA PATOLÓGICA: MÉTODOS MOLECULARES:

- Campo intimidatorio
- Recursos limitados
- Sobrecarga de trabajo



OBJETIVOS:

- 1.- ¿Qué técnicas moleculares pueden aplicarse a la dermatopatología?
- 2.- ¿Valen para algo?
- 3.- ¿Pueden aplicarse a la rutina diaria?
- 4.- ¿Cuánto cuestan?



ZARAGOZA

PCR

ZARAGOZA

-1985

-Herramienta imprescindible en BM

-Reacción química por cambios cíclicos en temperatura

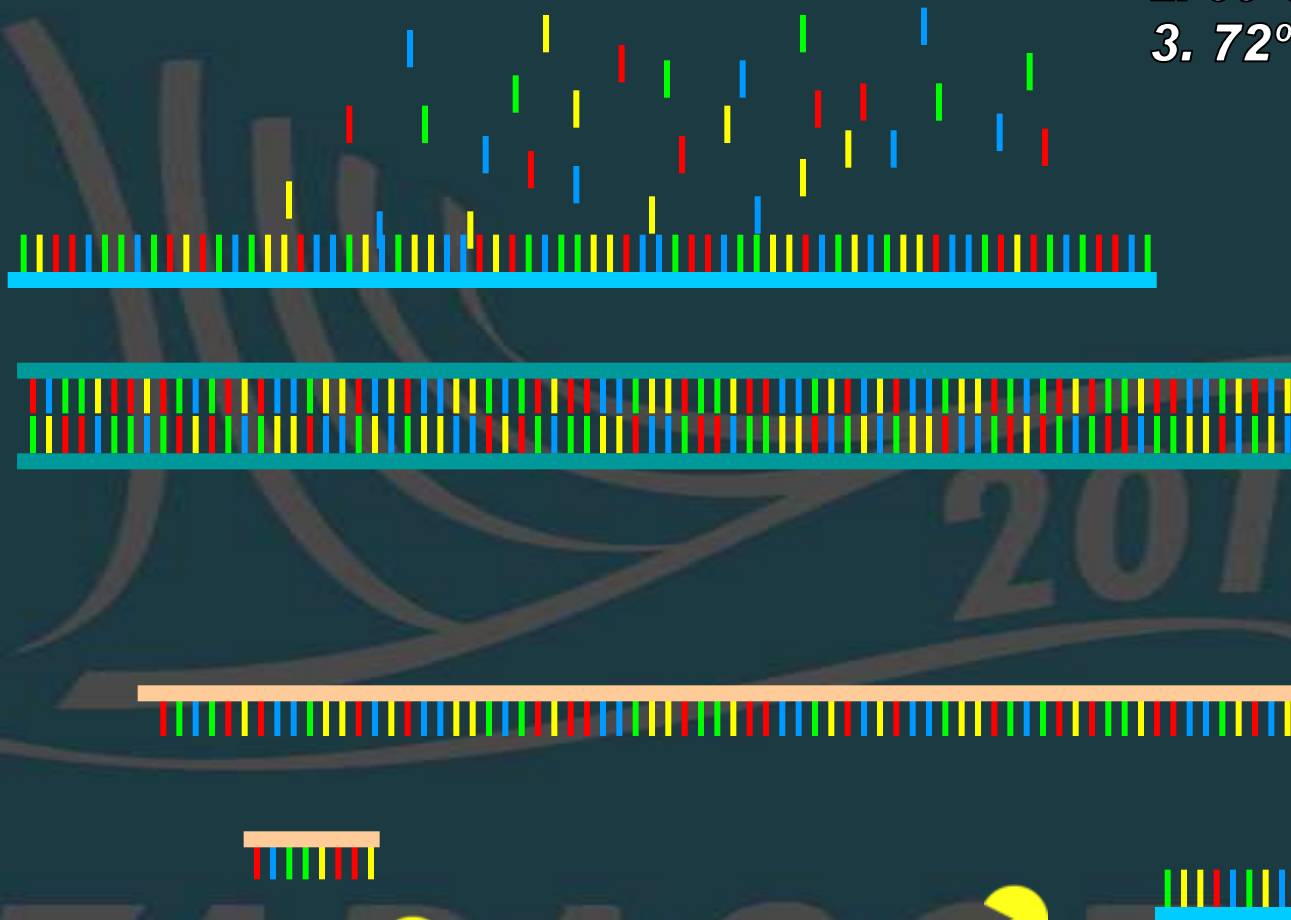
2011

ZARAGOZA

1. 95°C Desnaturalización

2. 55°C Hibridación

3. 72°C Extensión



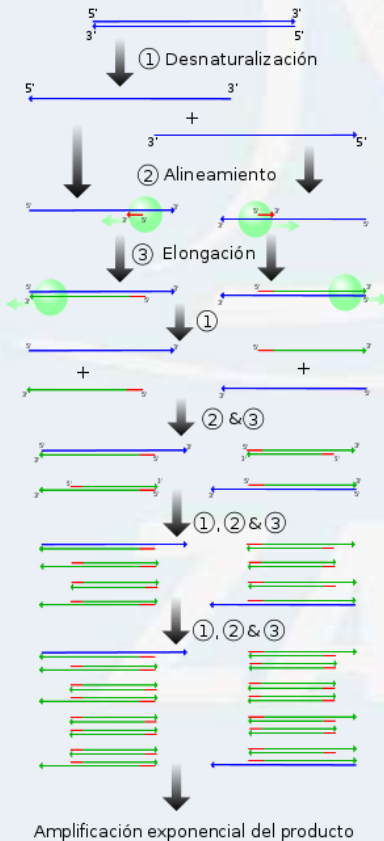
ZARAGOZA

PCR:

-1985

-Herramienta imprescindible en BM

-Reacción química por cambios cíclicos en temperatura



TERMOCICLADOR



PCR:

Amplificación específica y exponencial de pequeñas cantidades de material genético en poco tiempo



2011

ZARAGOZA

PCR:

Amplificación específica y exponencial de pequeñas cantidades de material genético en poco tiempo



PCR:

Amplificación específica y exponencial de pequeñas cantidades de material genético en poco tiempo

AMPLICON



ZARAGOZA

PCR:

Amplificación específica y exponencial de pequeñas cantidades de material genético en poco tiempo

AMPLICON



MUTACIÓN

MICROORGANISMOS

SECUENCIACIÓN

CLONALIDAD

INVESTIGACIÓN

PCR:

VENTAJAS:

- Método rápido y relativamente barato
- Alta sensibilidad

2011

ZARAGOZA

PCR:

VENTAJAS:

- Método rápido y relativamente barato
- Alta sensibilidad

INCONVENIENTES:

- Alta sensibilidad: Falsos positivos por contaminación.
- DNA de mala calidad / factores inhibidores: falsos negativos

¿PARA QUE LE SIRVE AL DERMATOPATÓLOGO?:

EN LA ACTUALIDAD:

1. DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS
2. CLONALIDAD LINFOIDE

EN FUTURO INMEDIATO:

3. DETERMINACIÓN DE MUTACIONES EN MELANOMA.
4. DETERMINACIÓN DE MICROMETÁSTASIS DE MELANOMA EN BSGC.

PCR:

¿PARA QUE LE SIRVE AL DERMATOPATÓLOGO?:

EN LA ACTUALIDAD:

- 1. DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS**
- 2. CLONALIDAD LINFOIDE**

EN FUTURO INMEDIATO:

- 3. DETERMINACIÓN DE MUTACIONES EN MELANOMA.**
- 4. DETERMINACIÓN DE MICROMETÁSTASIS DE MELANOMA EN BSGC.**

¿PARA QUE LE SIRVE AL DERMATOPATÓLOGO?:

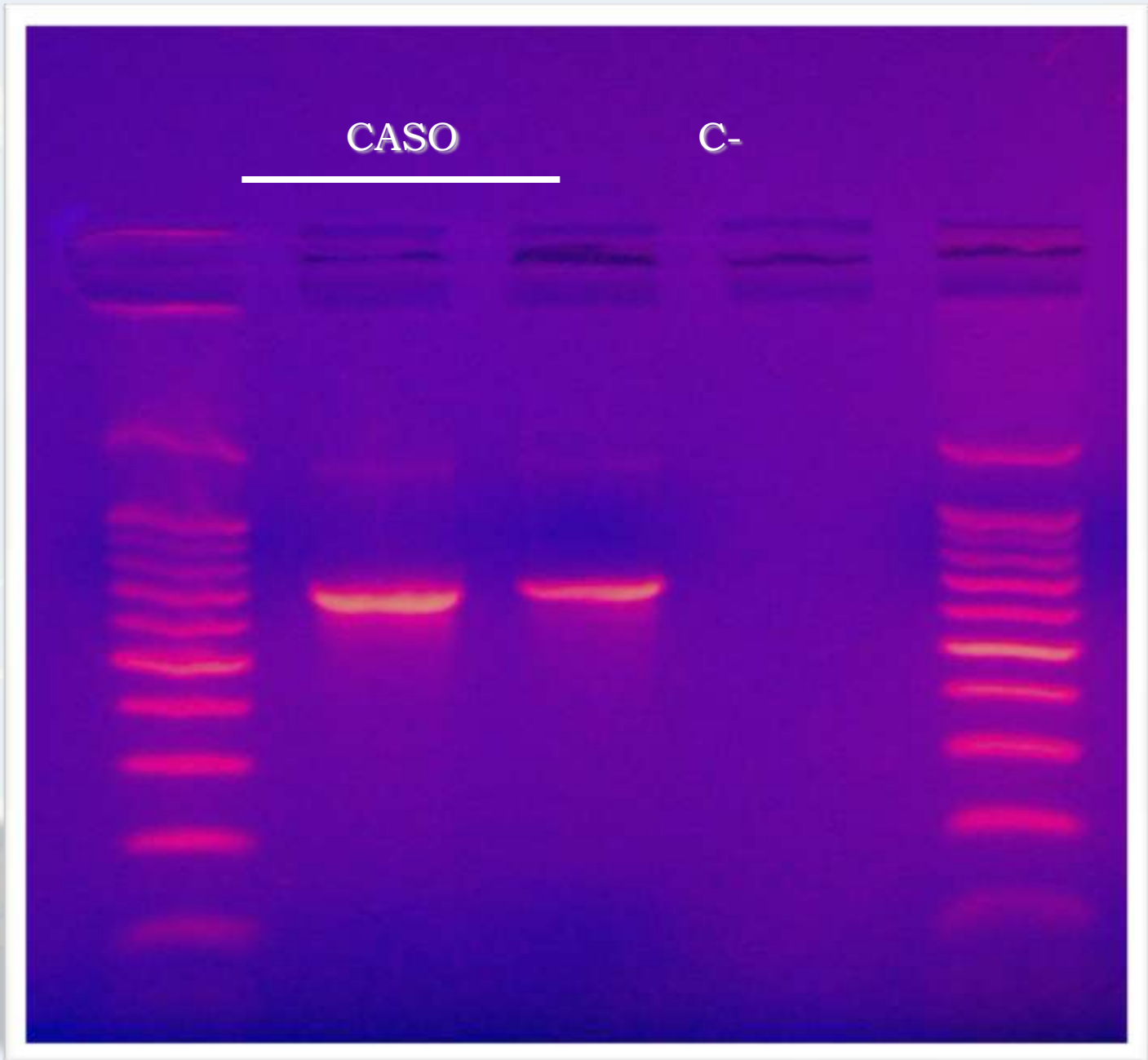
1.- DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS:

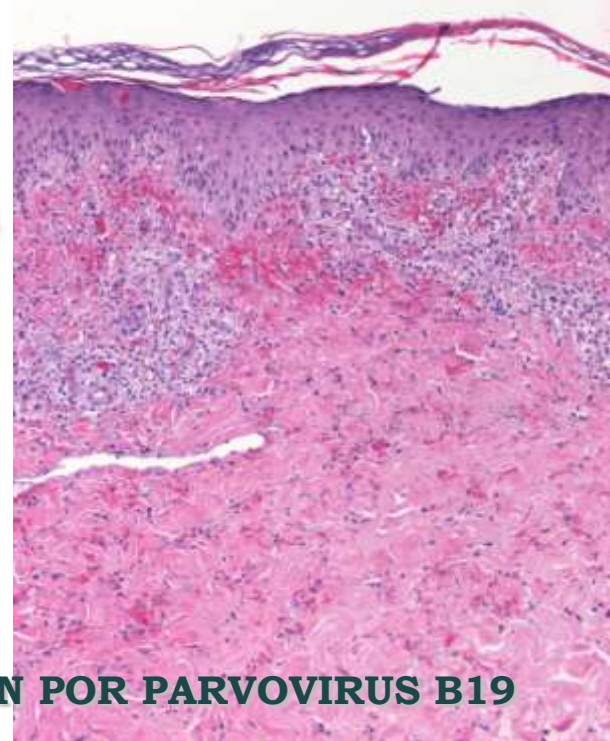
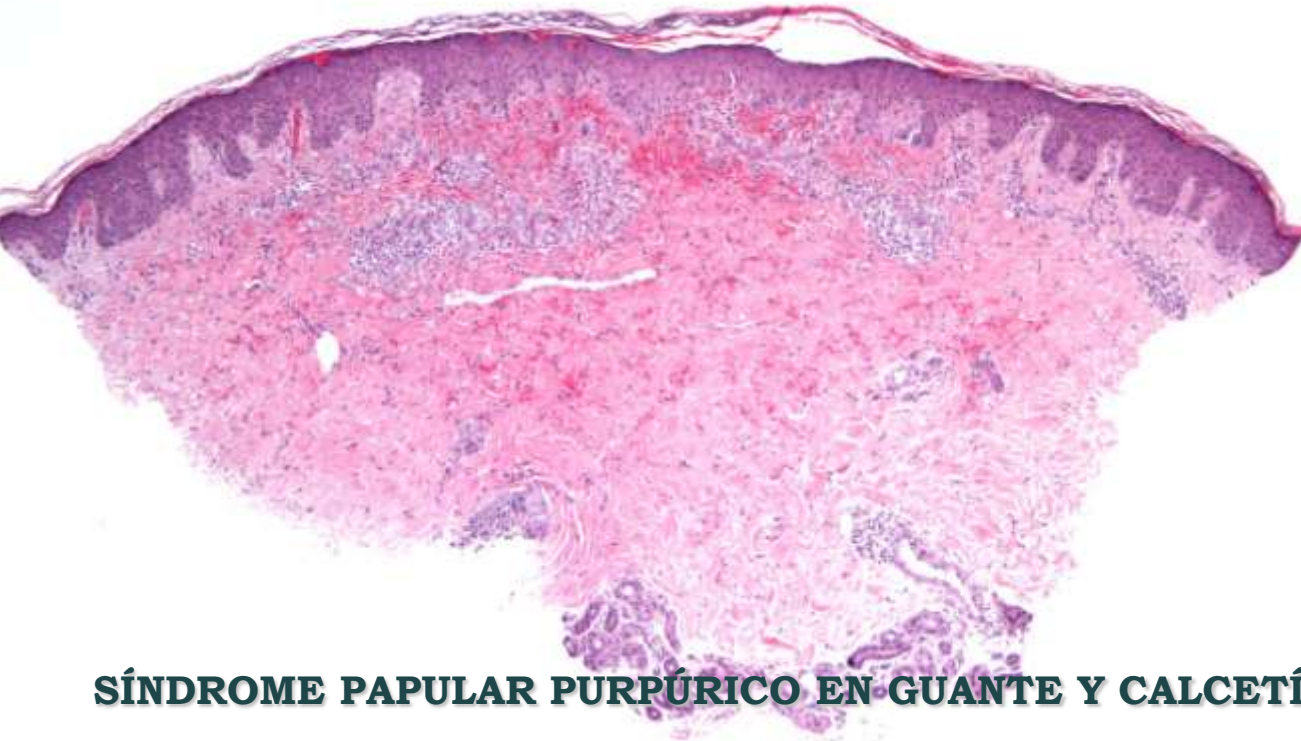
- Bacterias (micobacterias).
- Hongos
- Protozoos
- Virus.

2011

ZARAGOZA

GELES DE AGAROSA

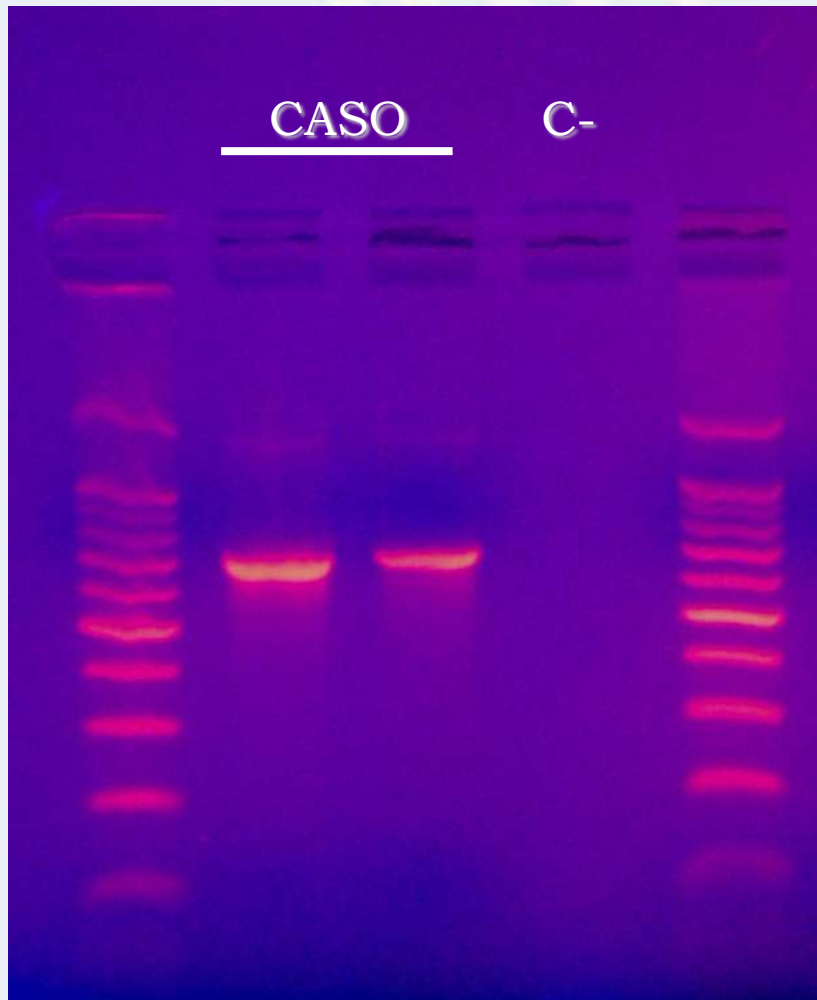




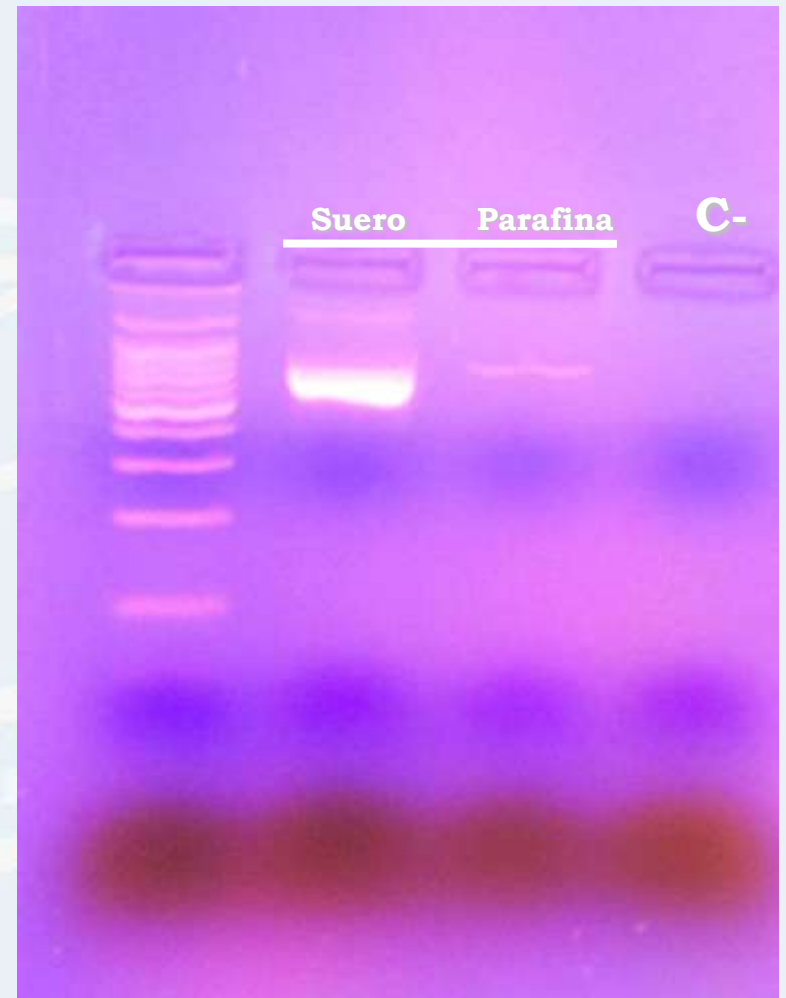
SÍNDROME PAPULAR PURPÚRICO EN GUANTE Y CALCETÍN POR PARVOVIRUS B19

SÍNDROME PAPULAR PURPÚRICO EN GUANTE Y CALCETÍN POR PARVOVIRUS B19

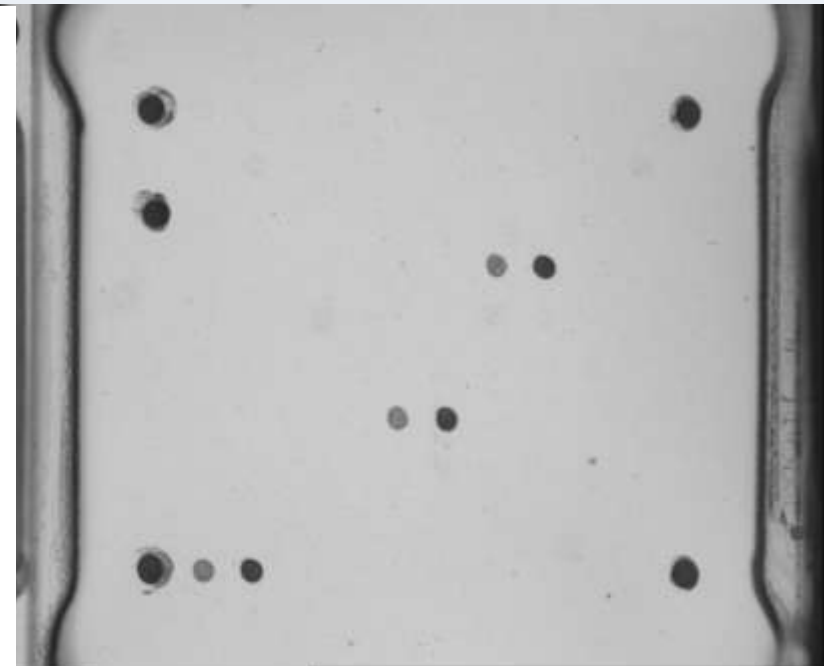
Parvovirus B19: SUERO



Biopsia de piel (parafina)

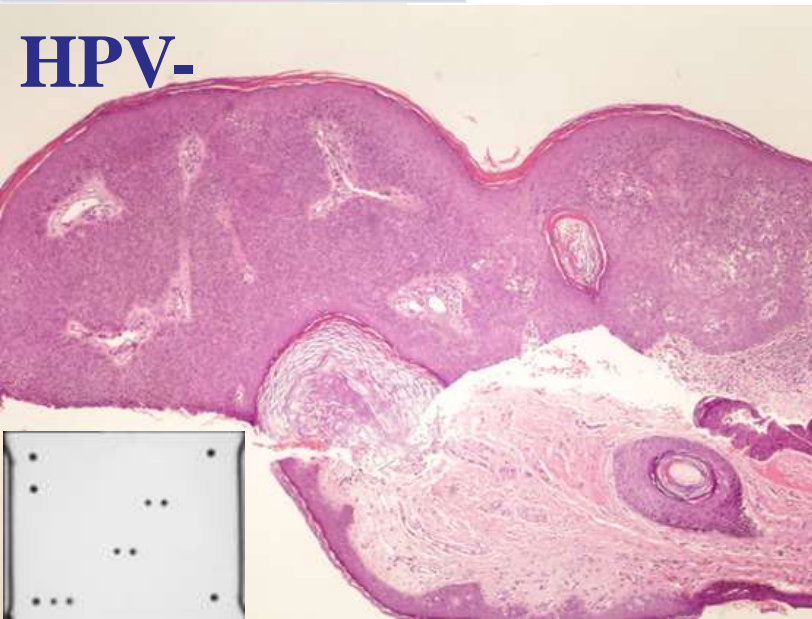
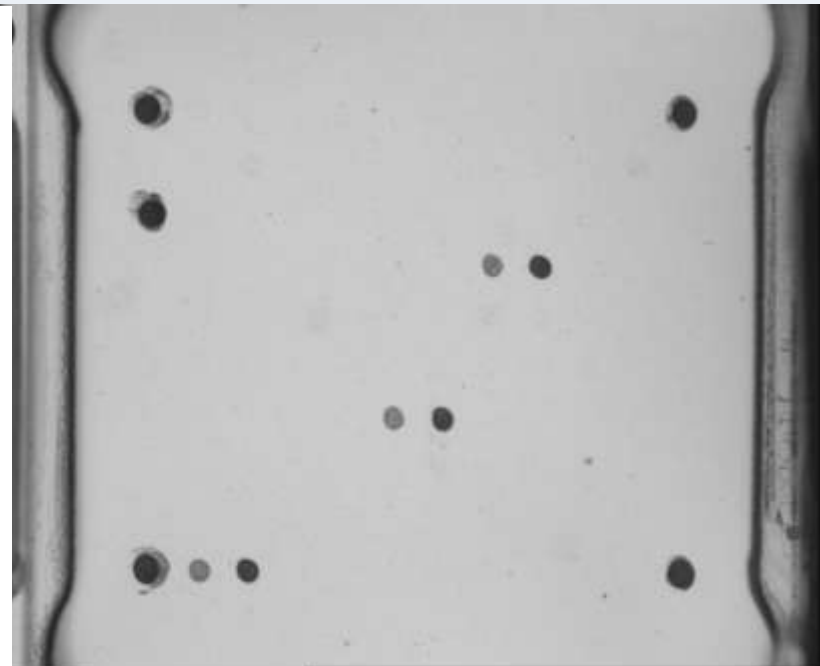


PCR: HIBRIDACIÓN EN ARRAYS DE BAJA DENSIDAD

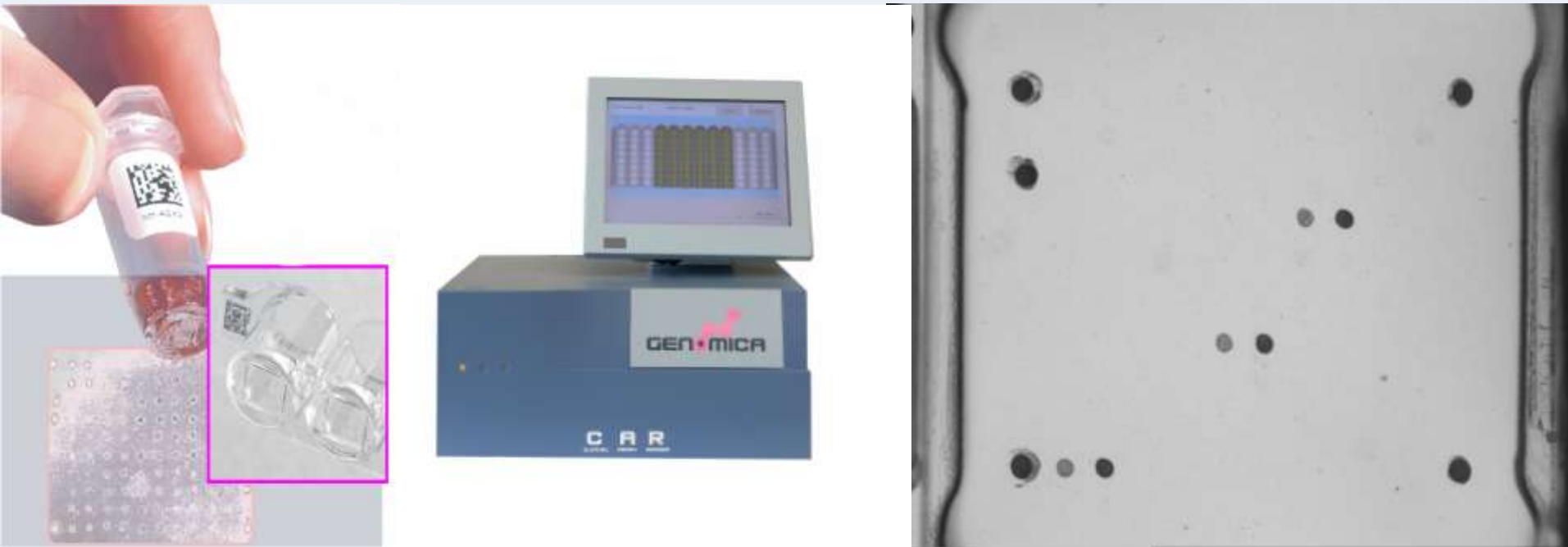


ZARAGOZA

PCR: HIBRIDACIÓN EN ARRAYS DE BAJA DENSIDAD



PCR: HIBRIDACIÓN EN ARRAYS DE BAJA DENSIDAD

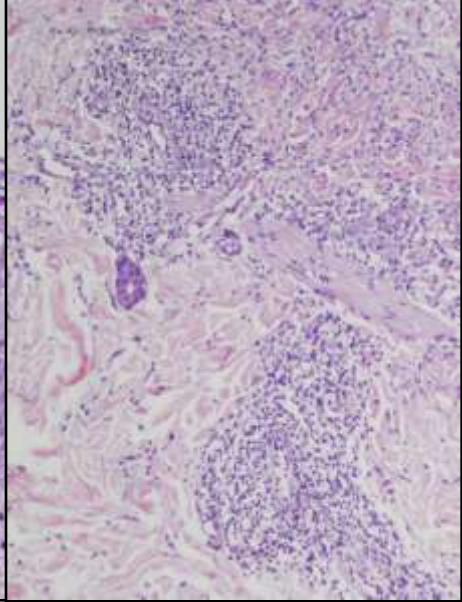
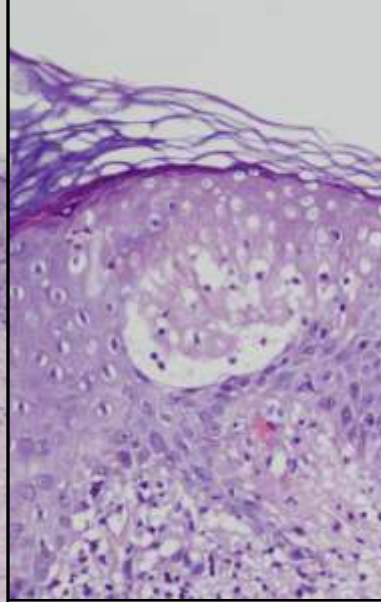
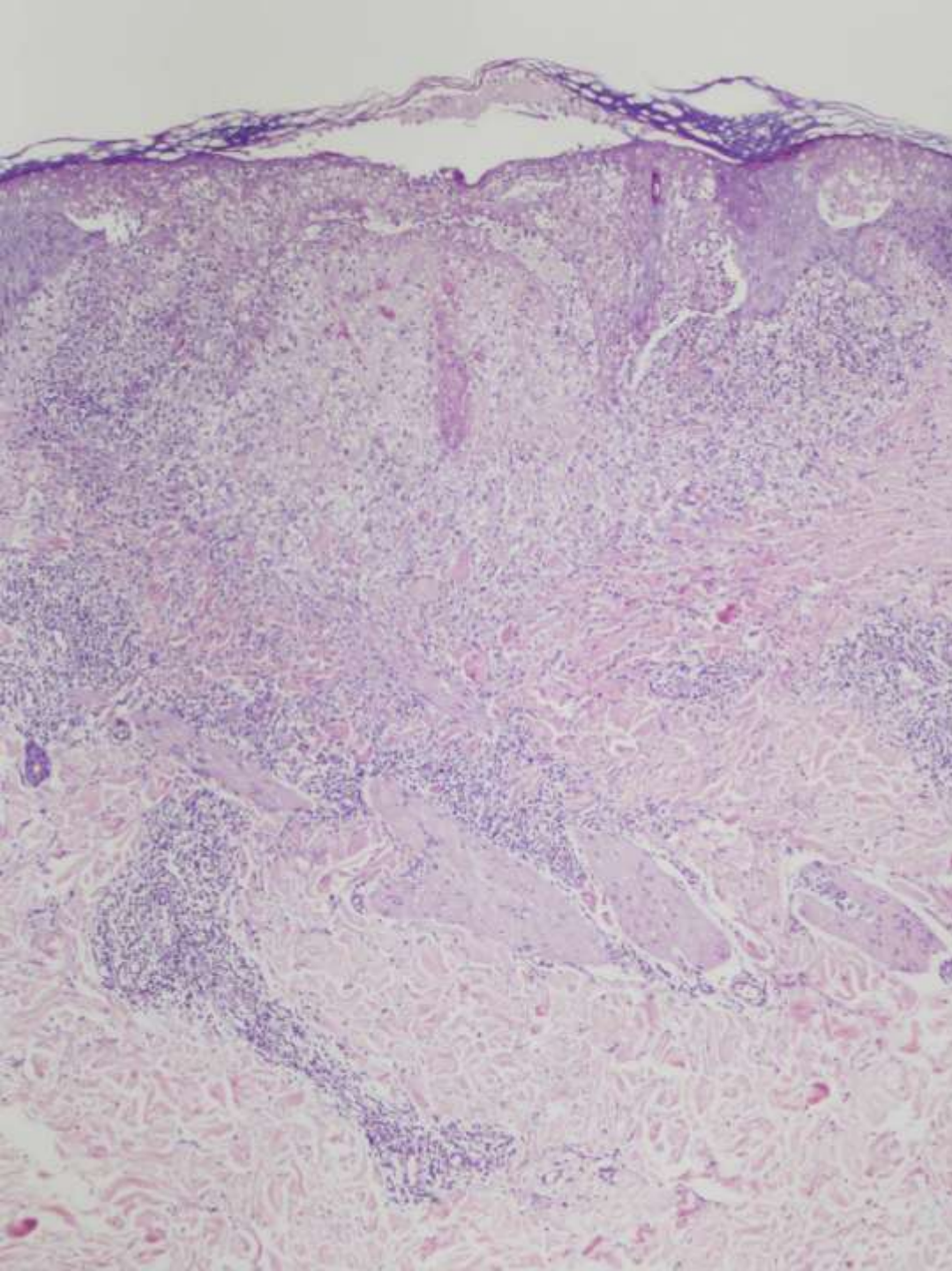


HERPES:

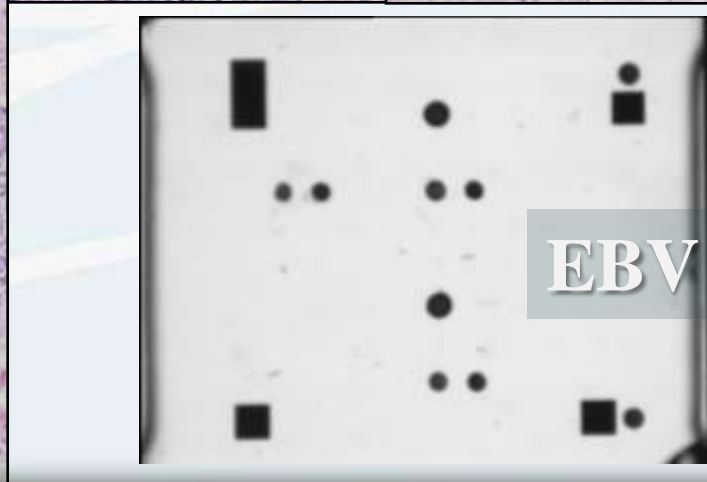
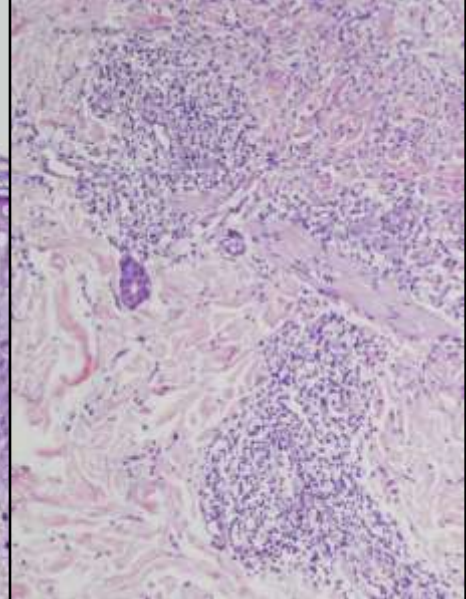
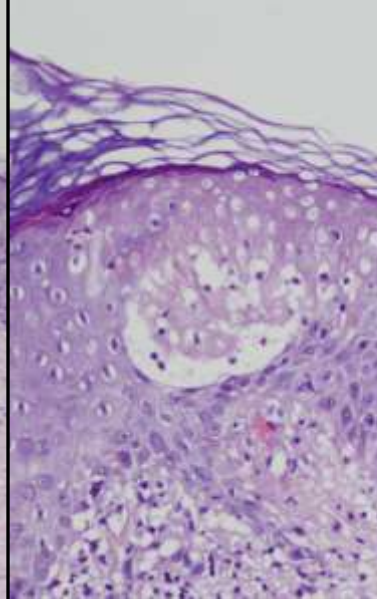
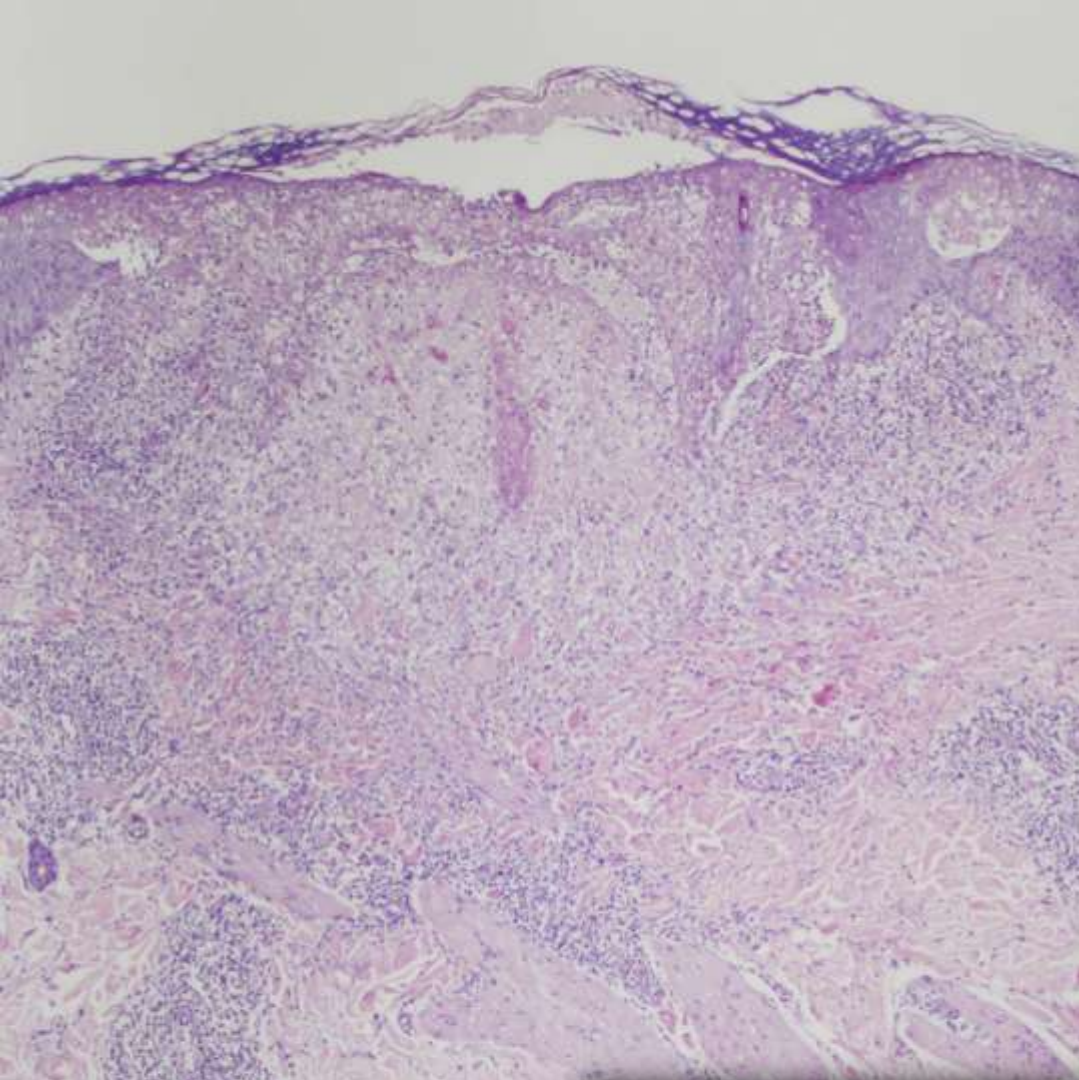
- EBV
- HSV-1
- HSV-2
- VZV
- CMV
- HHV-6
- HHV-7
- HHV-8
- Enterovirus.

HYDROA VACCINIFORME





2011
GOZA



Pathogenic Link Between *Hydroa Vacciniforme* and Epstein-Barr Virus–Associated Hematologic Disorders

Keiji Iwatsuki, MD; Masataka Satoh, MD; Takenobu Yamamoto, MD; Takashi Oono, MD; Shin Morizane, MD; Mikio Ohtsuka, MD; Zi-Gang Xu, MD; Daisuke Suzuki, MD; Kazuhide Tsuji, MD

PCR:

¿PARA QUE LE SIRVE AL DERMATOPATÓLOGO?:

EN LA ACTUALIDAD:

- 1. DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS**
- 2. CLONALIDAD LINFOIDE**

EN FUTURO INMEDIATO:

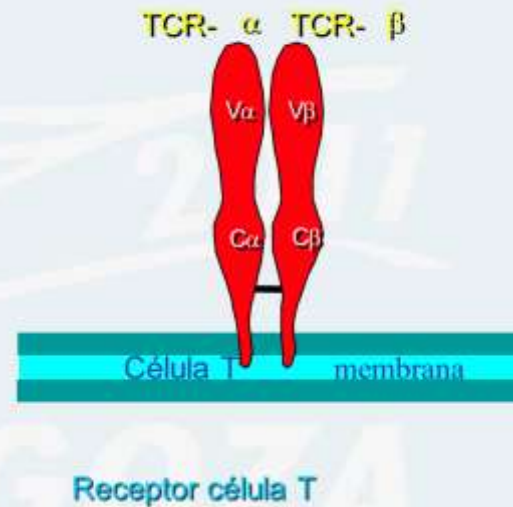
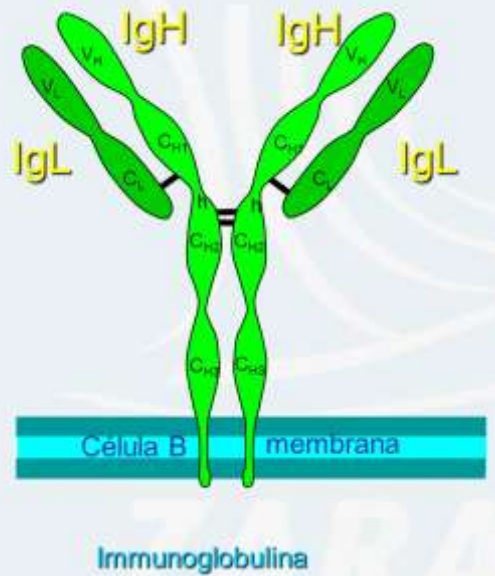
- 3. DETERMINACIÓN DE MUTACIONES EN MELANOMA.**
- 4. DETERMINACIÓN DE MICROMETÁSTASIS DE MELANOMA EN BSGC.**

PCR:

¿VALE PARA ALGO?:

2.- CLONALIDAD LINFOIDE

Estudio de reordenamiento IgH y TCR



Diferenciar pseudolinfoma de linfoma.

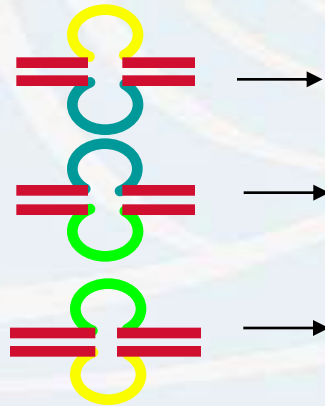
¿VALE PARA ALGO?:

2.- CLONALIDAD LINFOIDE

Valoración del amplicon:

a) Geles de poliacrilamida con heteroduplex:

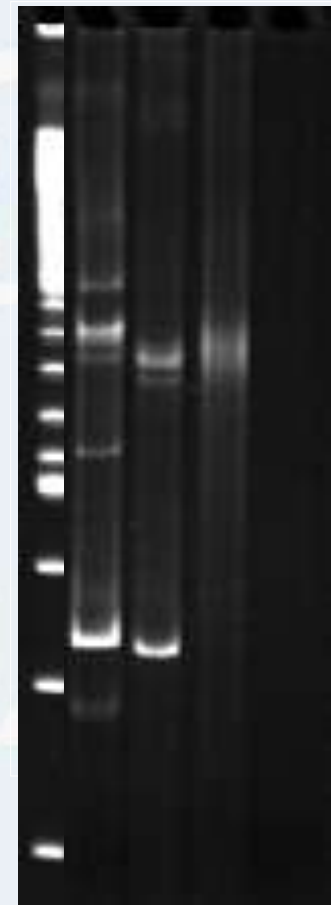
Heteroduplex



Homoduplex



1 2 3

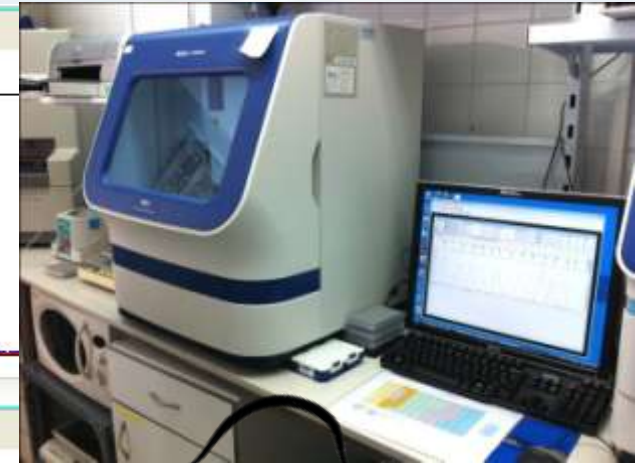
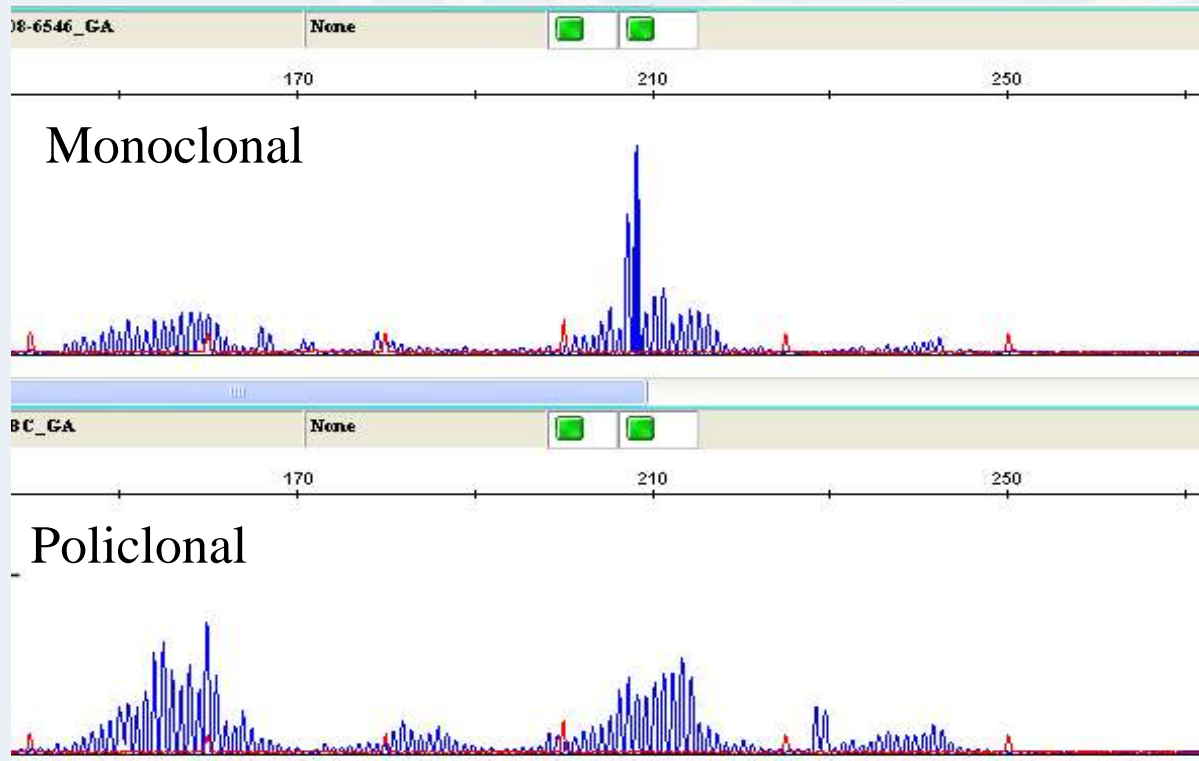


¿VALE PARA ALGO?:

2.- CLONALIDAD LINFOIDE

Valoración del amplicon:

- a) Geles de poliacrilamida con heteroduplex:
- b) Análisis de fragmentos con secuenciador:



Mayor eficacia

180.000 €

PCR:

¿VALE PARA ALGO?:

2.- CLONALIDAD LINFOIDE

a) Diagnóstico de linfomas incipientes

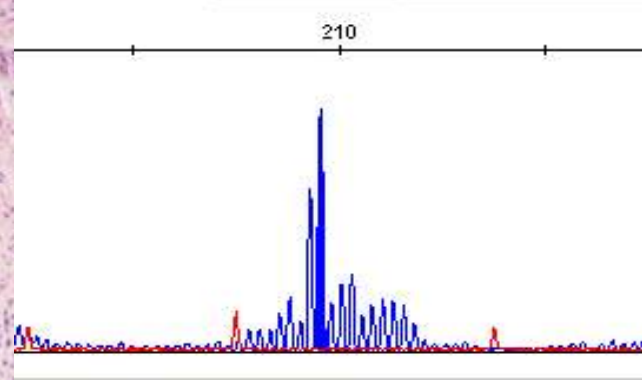
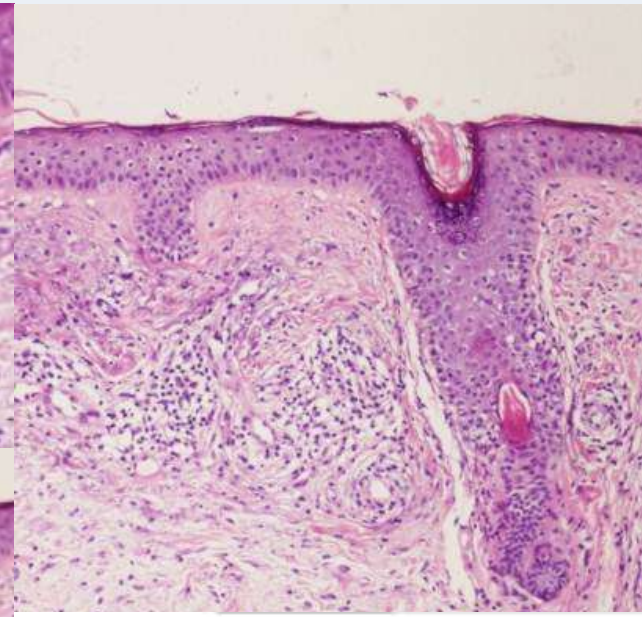
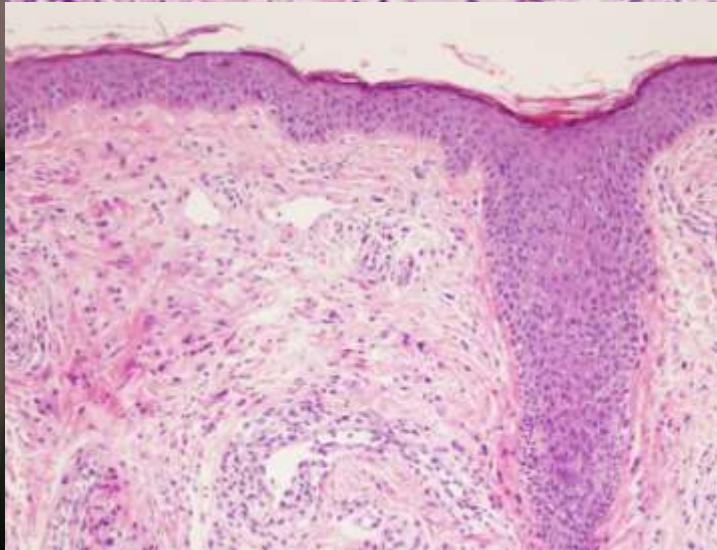
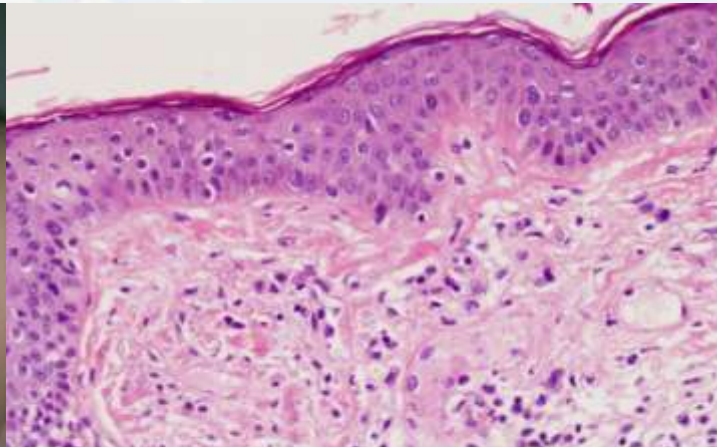
2011

ZARAGOZA

¿VALE PARA ALGO?:

2.- CLONALIDAD LINFOIDE

a) Diagnóstico de linfomas incipientes

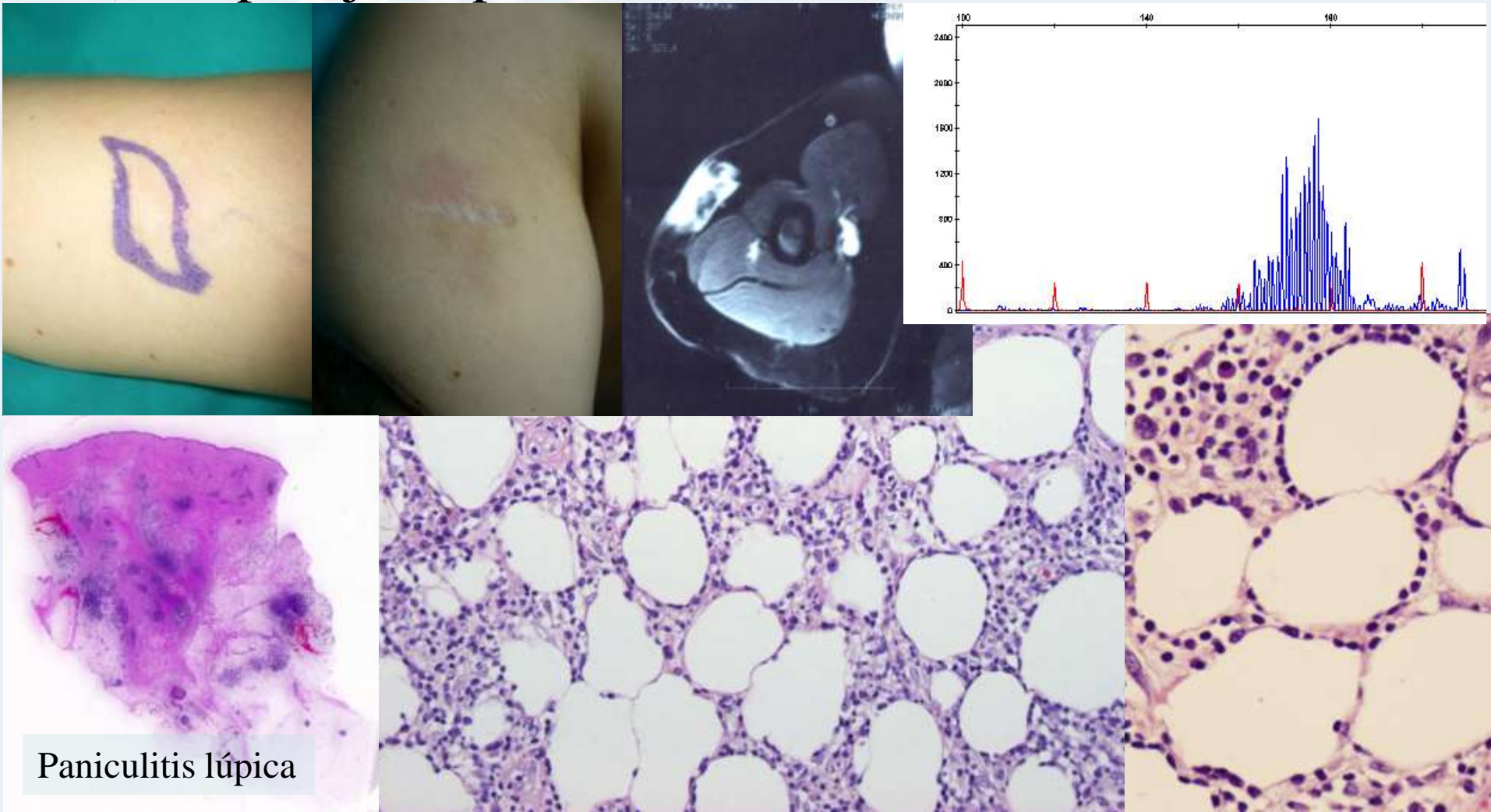


PCR:

¿VALE PARA ALGO?:

2.- CLONALIDAD LINFOIDE

b) Despistaje de pseudolinfomas :



Paniculitis lúpica

PCR:

¿VALE PARA ALGO?:

2.- CLONALIDAD LINFOIDE

c) Comparar clones en lesiones múltiples:

2011

ZARAGOZA

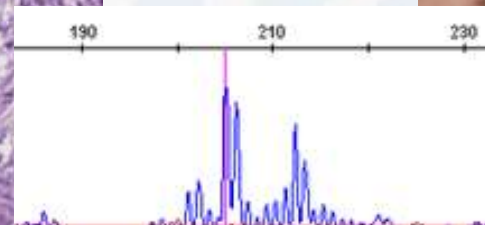
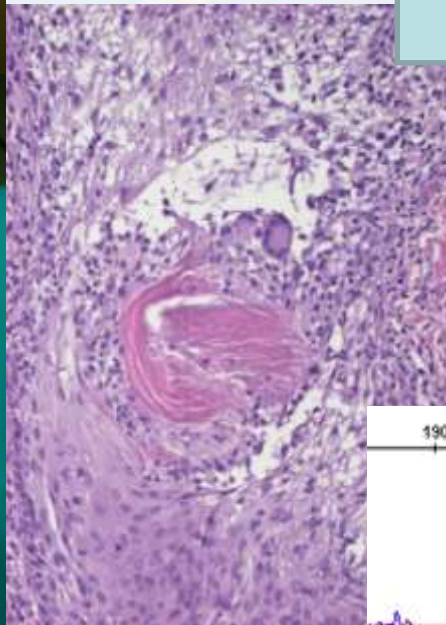
PCR:

PACIENTE 24 AÑOS. DÉFICIT DE IgA

MICOSIS FUNGOIDE FOLICULOTROPA DE TIPO MUCINOSIS FOLICULAR

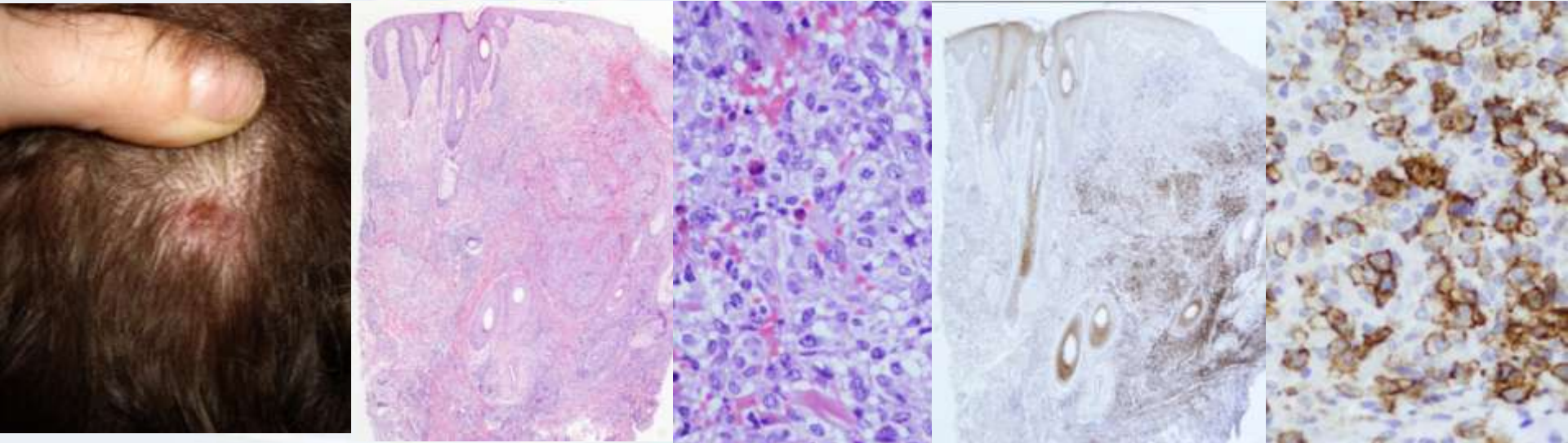


PUVA

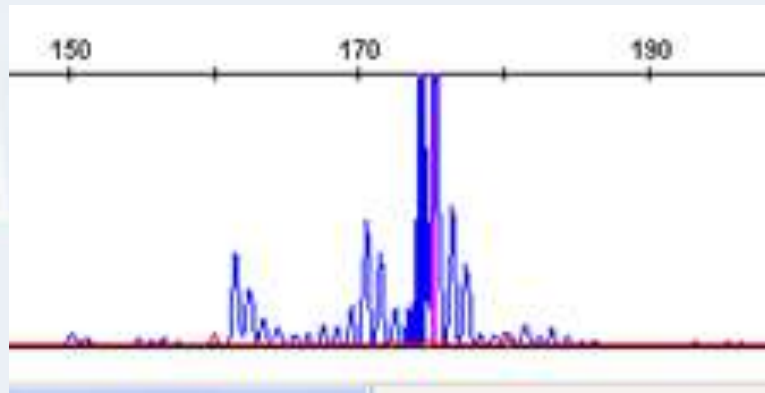


PCR:

PACIENTE 24 AÑOS. DÉFICIT DE IgA
MICOSIS FUNGOIDE FOLICULOTROPA
DE TIPO MUCINOSIS FOLICULAR



PROCESO LINFOPROLIFERATIVO T CD 30+



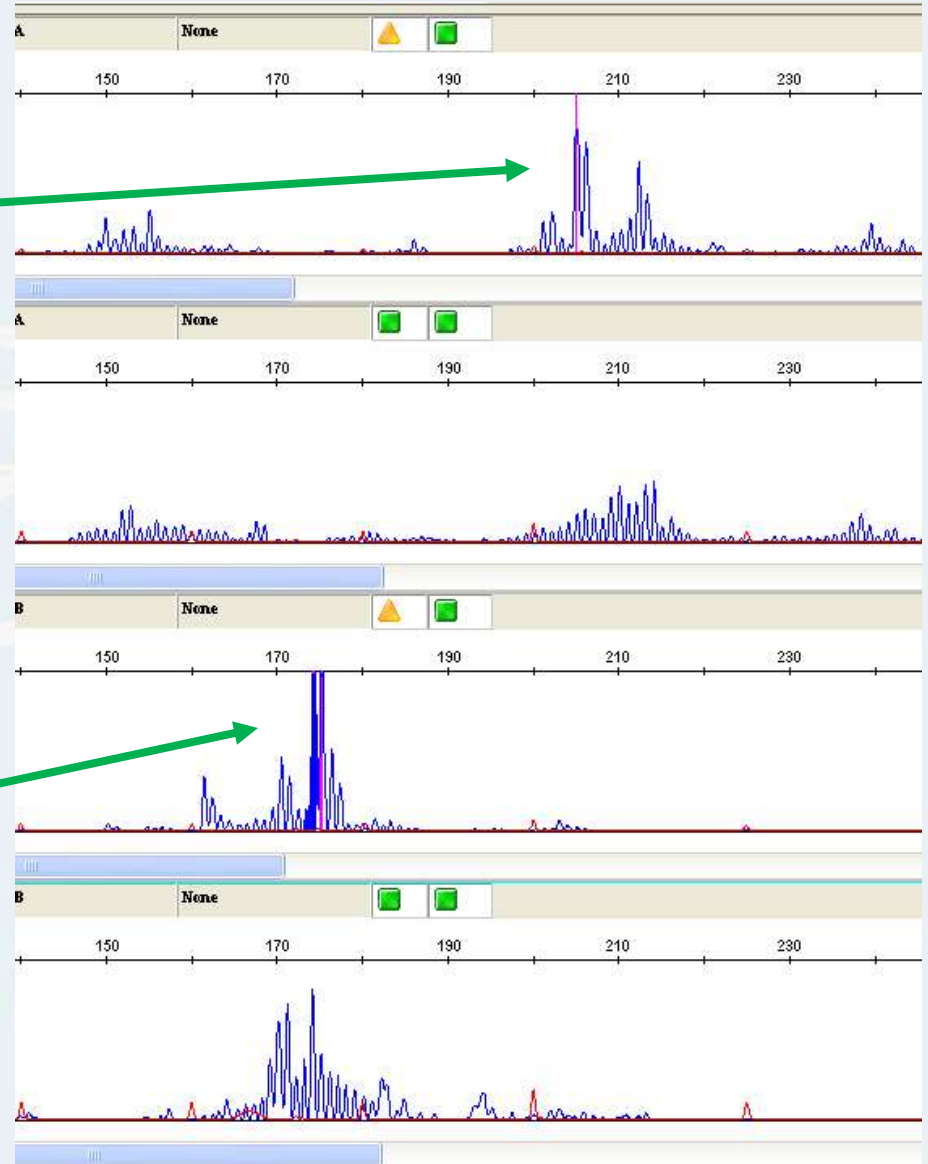
PCR:

PACIENTE 24 AÑOS. DÉFICIT DE IgA

MICOSIS FUNGOIDE FOLICULOTROPA DE TIPO MUCINOSIS FOLICULAR

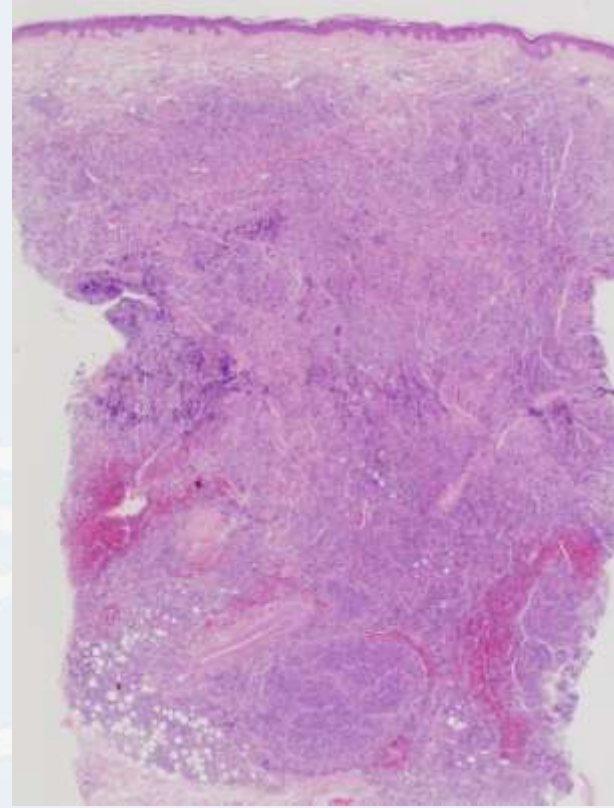


PAPULOSIS LINFOMATOIDE

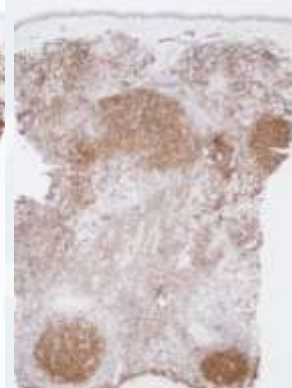


PCR:

PACIENTE 46 AÑOS. Linfoma cutáneo folicular



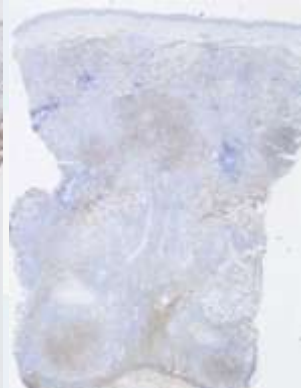
CD20



BCL 2



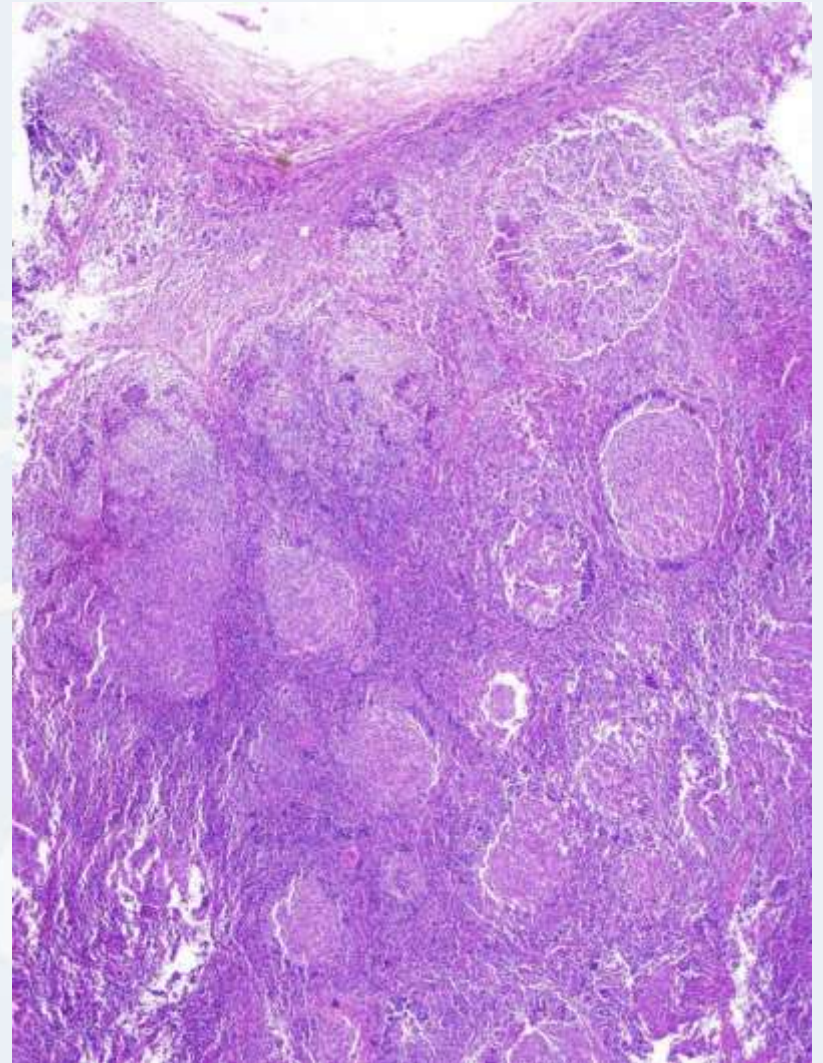
BCL6



CD10

PCR:

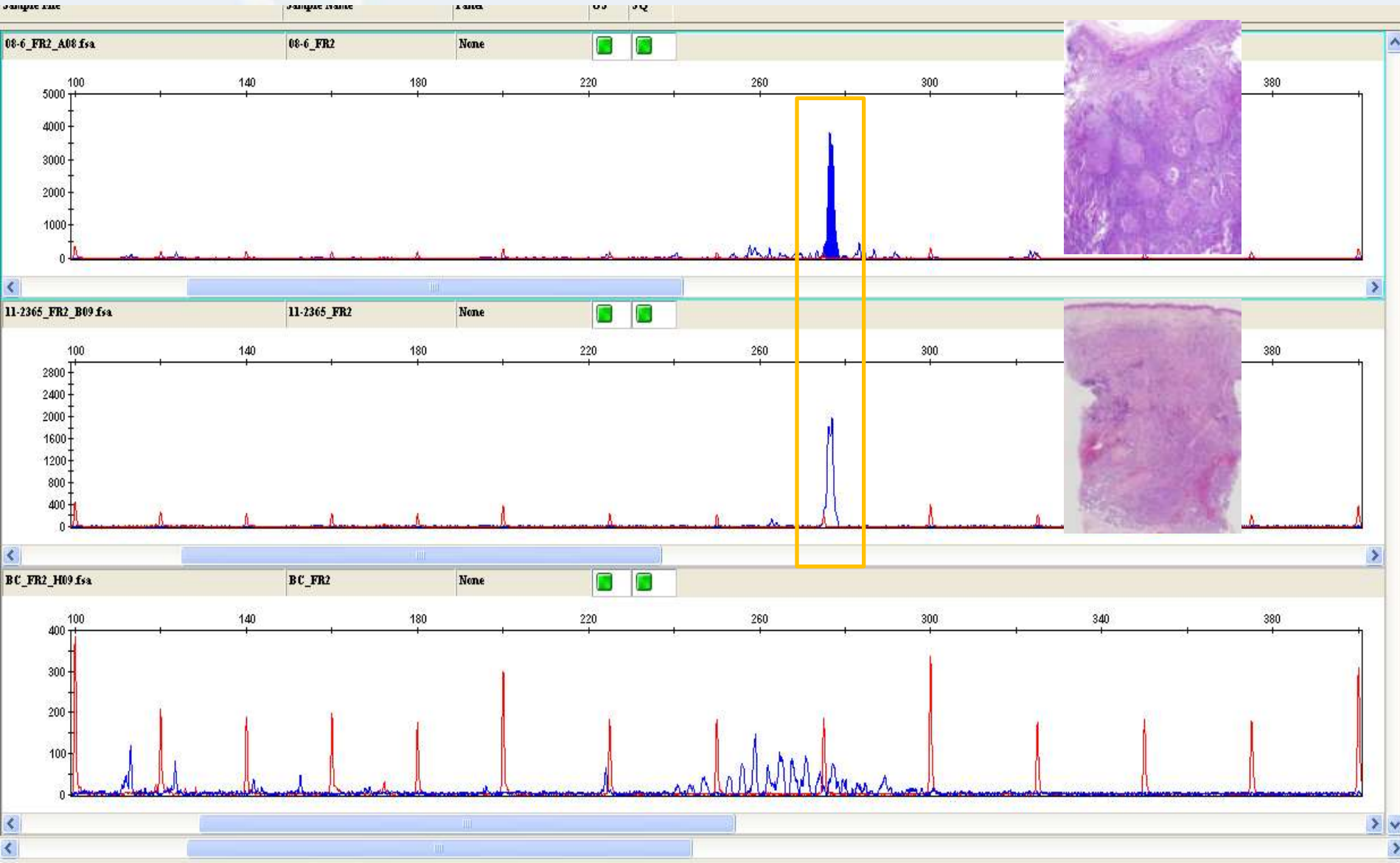
PACIENTE 46 AÑOS. Linfoma cutáneo folicular
Antecedente de linfoma folicular ganglionar.



PCR:

PACIENTE 46 AÑOS. Linfoma cutáneo folicular

Antecedente de linfoma folicular ganglionar. Reordenamientos con idéntico pm.



PCR:

2.- CLONALIDAD LINFOIDE

¡¡MUCHO CUIDADO!!



1. Clonalidad y malignidad no son sinónimos

2011

ZARAGOZA

Caso 1

Caso 2

Caso 3

Lesiones eritematosas y erosivas superficiales.

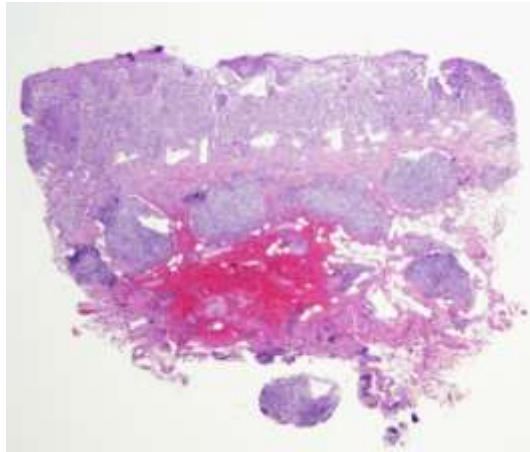
Mucosa labial superior e inferior y mucosa gingival

Mucosa labial superior e inferior y mucosa gingival

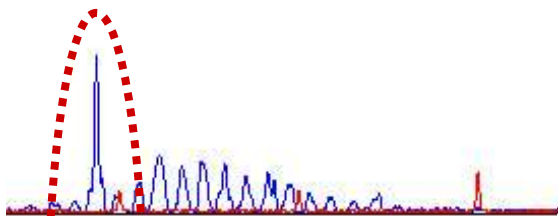
Mucosa labial superior e inferior



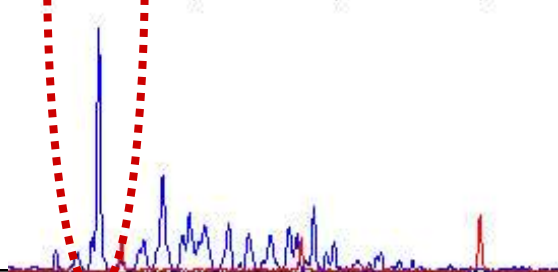
Caso 1



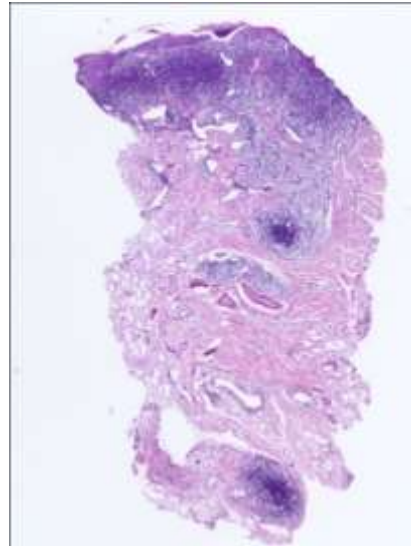
240 280



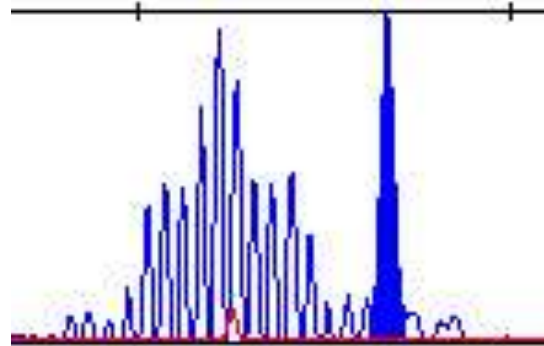
240 280



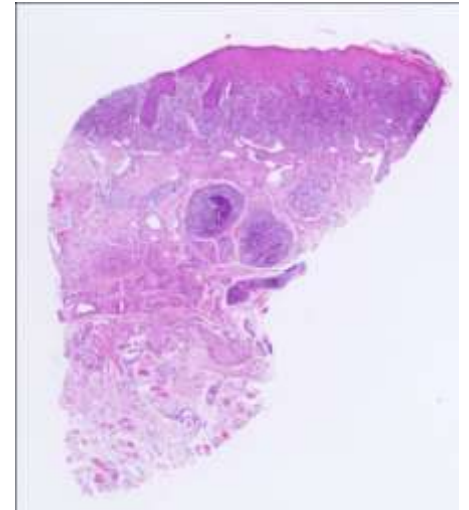
Caso 2



290

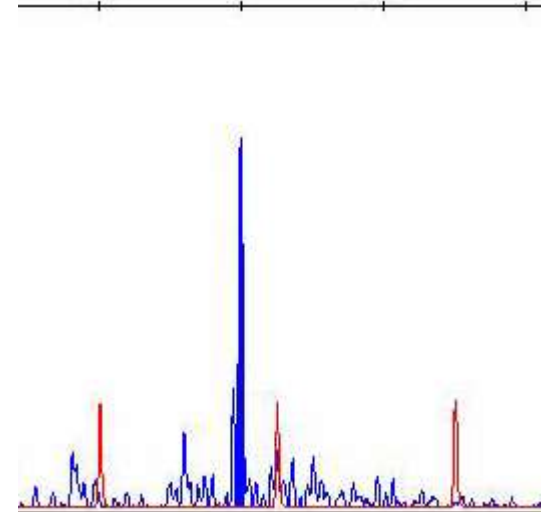


Caso 3



225

265



PCR:

2.- CLONALIDAD LINFOIDE

¡¡MUCHO CUIDADO!!



2. Hay linfomas que no reordenan (20% de B y 10-40% de T)

2011

ZARAGOZA

2.- CLONALIDAD LINFOIDE

¡¡MUCHO CUIDADO!!



2. Hay linfomas que no reordenan (20% de B y 10-40% de T)

Razones:

1. Metodología inadecuada
2. Linfomas T que no reordenan TCR
 - Células linfoideas muy inmaduras (linfoblásticos)
 - Linfomas NK.
3. Mutaciones, traslocaciones o deleciones del gen en lugar de unión de primers
4. Linfomas con pequeño % de células neoplásicas.

PCR:

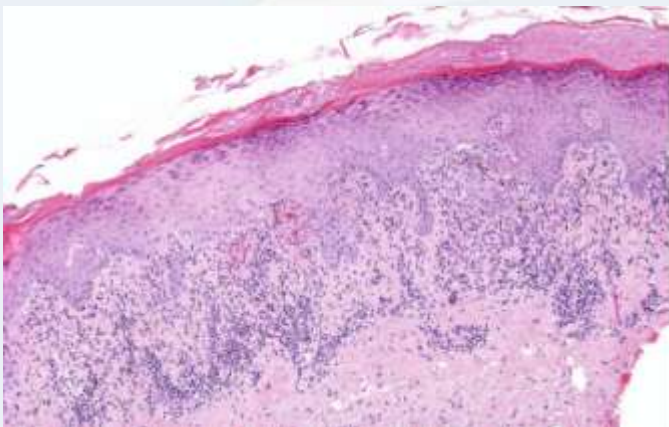
2.- CLONALIDAD LINFOIDE

¡¡MUCHO CUIDADO!!



3. Algunas enfermedades inflamatorias pueden monoclonalidad:

- Liquen plano (25%)



2011

AGOZA

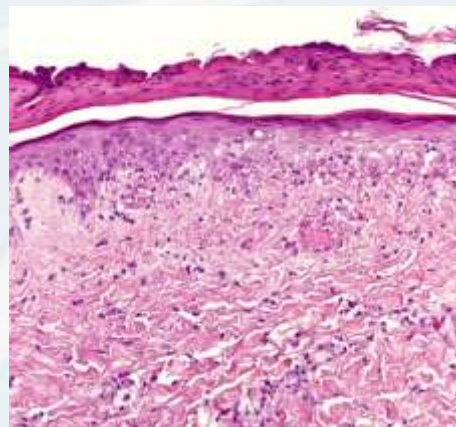
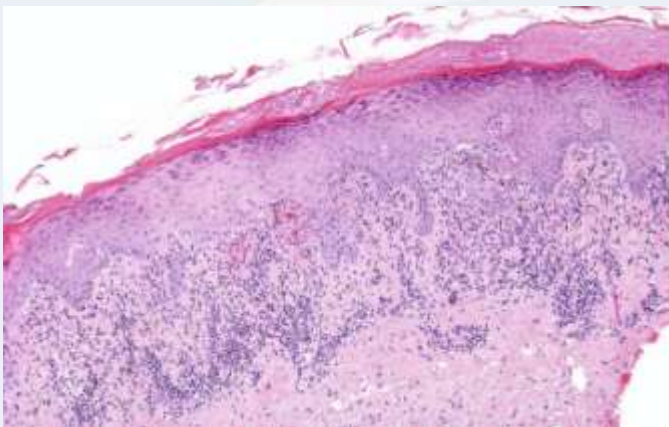
2.- CLONALIDAD LINFOIDE

¡¡MUCHO CUIDADO!!



3. Algunas enfermedades inflamatorias pueden ser monoclonales:

- Liquen plano (25%)
- Pitiriasis liquenoide aguda y crónica (65% y 50%)



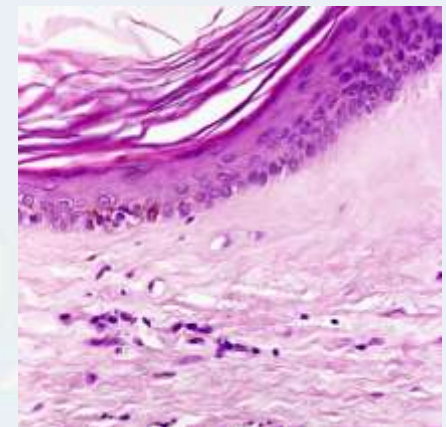
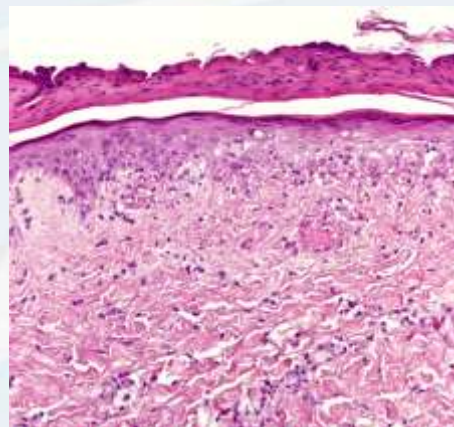
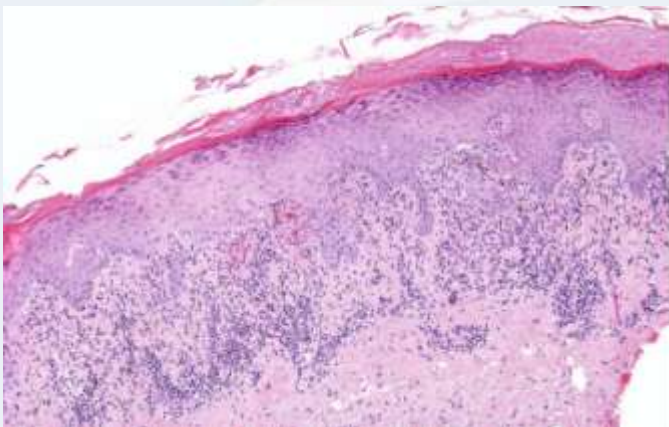
2.- CLONALIDAD LINFOIDE

¡¡MUCHO CUIDADO!!



3. Algunas enfermedades inflamatorias pueden monoclonalidad:

- Liquen plano (25%)
- Pitiriasis liquenoide aguda y crónica (65% y 50%)
- Liquen escleroso y atrófico (49%)



Estudios simultáneos de clonalidad de distintas lesiones.

2.- CLONALIDAD LINFOIDE



PCR:

¿PARA QUE LE SIRVE AL DERMATOPATÓLOGO?:

EN LA ACTUALIDAD:

1. DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS
2. CLONALIDAD LINFOIDE

EN FUTURO INMEDIATO:

3. **DETERMINACIÓN DE MUTACIONES EN MELANOMA.**
4. DETERMINACIÓN DE MICROMETÁSTASIS DE MELANOMA EN BSGC.

3.- DETERMINACIÓN DE MUTACIONES EN MELANOMA

MELANOMA:

- 27-70% mutaciones BRAF: V600E
- 33% mutaciones de NRAS
- 15% mutaciones CKIT

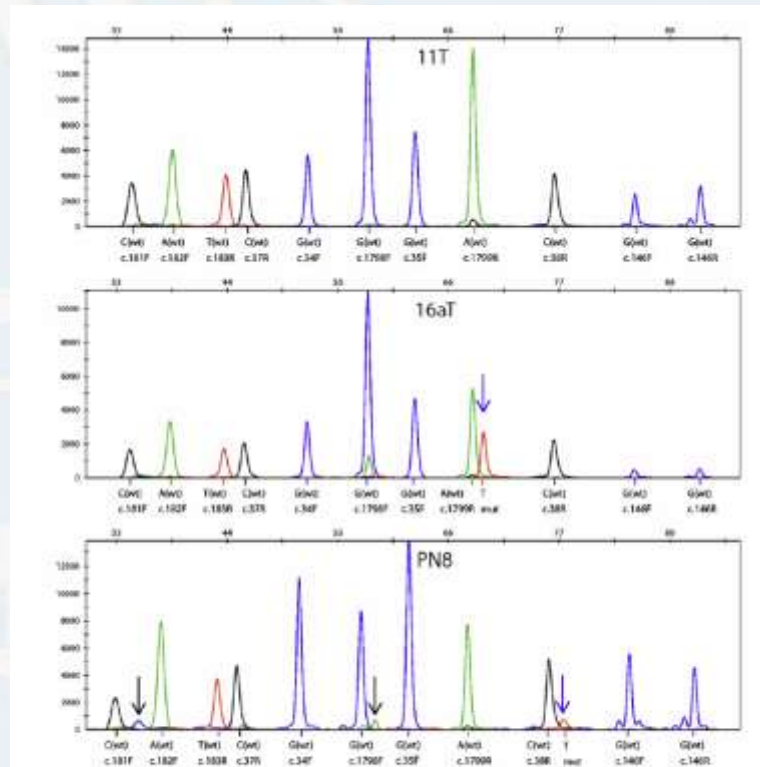


FIGURE 6. Representative images of mutations detected by Sanger sequencing in a KRAS/BRAF multiplex panel. The various labels are associated with genotyping the following codons: KRAS G12 (c.34F and c.35F); BRAF G61 (c.37R and c.38R); KRAS Q61 (c.181F, c.182F, and c.183F); KRAS A146 (c.436F and c.437R); and BRAF V600 (c.1798F and c.1799R). F indicates priming in the forward direction and R in the reverse direction. Relative fluorescent unit intensity is plotted on the y axis, whereas base length is depicted in the top x axis. Case 11 T represents a normal genotype with no mutations. Case 16aT shows a V600E BRAF mutation (blue arrow), whereas PN8 represents a c.38G>A KRAS mutation. Black arrows represent background peaks found outside the reference bins. [10]

3.- DETERMINACIÓN DE MUTACIONES EN MELANOMA

MELANOMA:

- 27-70% mutaciones BRAF: V600E
- 33% mutaciones de NRAS
- 15% mutaciones CKIT

BRAF y NRAS:

- Intervienen en proceso proliferativo melanocítico.
- Presentes en nevus melanocíticos: no son suficientes para producir un melanoma.

ZARAGOZA

3.- DETERMINACIÓN DE MUTACIONES EN MELANOMA

CLASIFICACIÓN MELANOMA:

TIPO MELANOMA	MUTACIÓN		
	BRAF	RAS	C-KIT
AREA DE FOTOEXPOSICIÓN INTERMITENTE	59%	22%	0%
AREA DE FOTOEXPOSICION CRONICA	11%	15%	28%
MUCOSA / ACRAL	11-23%	5-10%	36-39%

ZARAGOZA

3.- CARACTERIZACIÓN MOLECULAR EN MELANOMA

TERAPIAS CONTRA DIANAS MOLECULARES EN MELANOMA:

<i>Grupo</i>	<i>Mecanismo de acción</i>	<i>Nombre comercial</i>
Inhibidor de BRAF	Bloqueo de la vía de la MAPquinasa mediante bloqueo BRAF	Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar [®]) ⁷⁹ RAF (RAF-265) ⁸⁰ PLX4032
Inhibidor de C-RAF	Bloqueo de la vía de la MAPquinasa mediante el bloqueo del C-RAF, regulador de NRAS	Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar [®]) ⁷⁹
Inhibidor de C-KIT	Bloqueo del receptor C-Kit presente con frecuencia en MM de áreas no fotoexpuestas	Mesilato imatinib (Glivec [®])
Inhibidores de MEK	Bloqueo de las MEK 1 y 2 serín-treonina kinasas	Inhibidor de MEK de primera generación: CI-1040 (Pfizer [®]) ⁸¹ Inhibidor de MEK de segunda generación: PD0325901 ⁸²
Inhibidores de la vía PI3Kinasa/AKT	Bloqueo de mTOR ⁸³ , que actúa como activador intermedio de AKT y de PI3 quinasa en pacientes con déficit de PTEN	Inhibidor de m-TOR: rapamicina
Inhibidores de quinasas ciclina-dependientes	Bloqueo de la vía p16/CDK/Rb, mediante el bloqueo principalmente de CDK2 ⁸⁴	Inhibidor de CDK1, CDK2, CDK4 y 7: Flavopiridol ⁸⁵ Otros inhibidores selectivos: – UCN-01 – CYC202 – BMS-387032
Reguladores de la homeostasis proteica	Bloqueo de Hsp 90 chaperona, proteína que media en la activación de múltiples proteínas señalizadoras y activadores transcripcionales ⁸⁶	Geldanamicina ⁸⁶ IPI-504 (17-alilaminogeldanamicina, variante menos tóxica que la previa) ^{20,87-89}
Inhibidor de Bcl-2	Bloqueo de Bcl-2, molécula antiapoptótica	Oblimersen (Genesense [®] , G3139) solo o combinado con dacarbacina (DTIC) ^{77,90,91}

Actas Dermosifiliogr. 2009;100:Supl. 1:52-65

Novedades en biología molecular y su aplicación en el diagnóstico y el tratamiento del melanoma

A. Martorell-Calatayud*, C. Requena*, R. Botella-Estrada* y O.P. Sangüeza^{b,*}

3.- DETERMINACIÓN DE MUTACIONES EN MELANOMA

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

ESTABLISHED IN 1812

AUGUST 26, 2010

VOL. 363 NO. 9

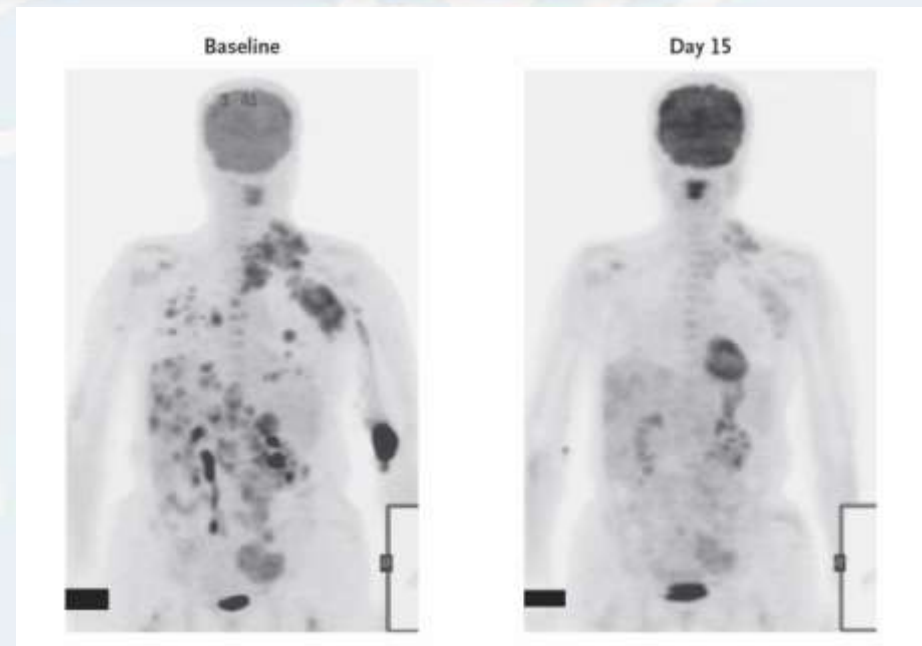
Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma

Keith T. Flaherty, M.D., Igor Puzanov, M.D., Kevin B. Kim, M.D., Antoni Ribas, M.D.,
Grant A. McArthur, M.B., B.S., Ph.D., Jeffrey A. Sosman, M.D., Peter J. O'Dwyer, M.D., Richard J. Lee, M.D., Ph.D.,
Joseph F. Grippo, Ph.D., Keith Nolop, M.D., and Paul B. Chapman, M.D.

RG7204:

Inhibe la actividad kinasa de BRAF con la mutación V600E, y así la proliferación celular.

Regresión y estabilización de la enfermedad en casi un 80% de los casos de melanoma avanzado con la mutación BRAF V600E



3.- DETERMINACIÓN DE MUTACIONES EN MELANOMA

PLX4032 and melanoma: resistance, expectations and uncertainty

Expert Rev. Anticancer Ther. 11(3), 325–328 (2011)

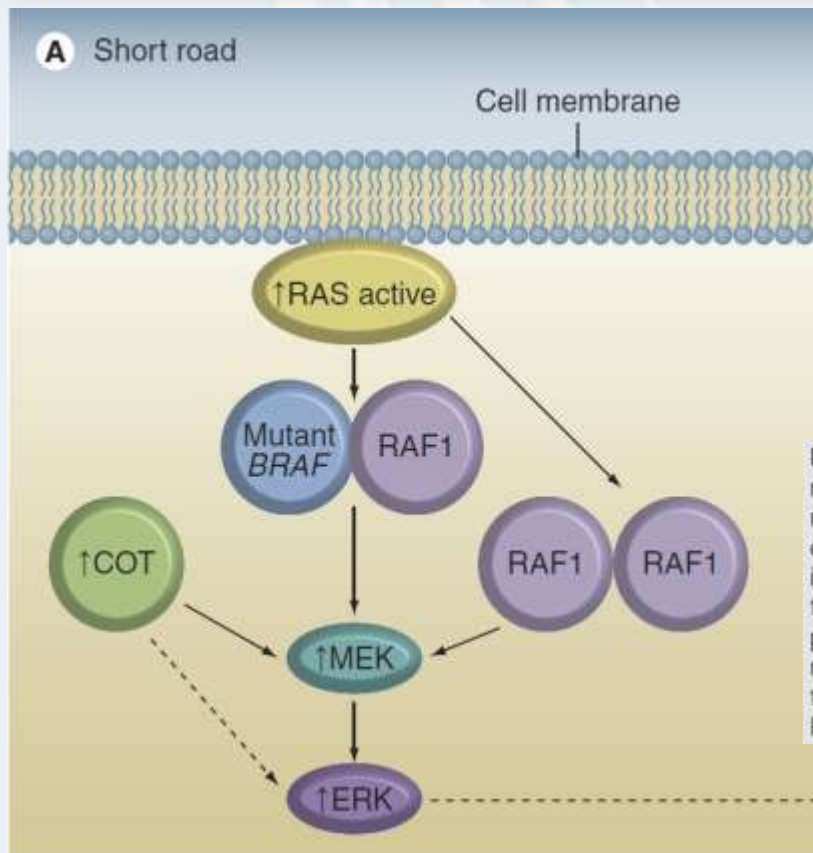
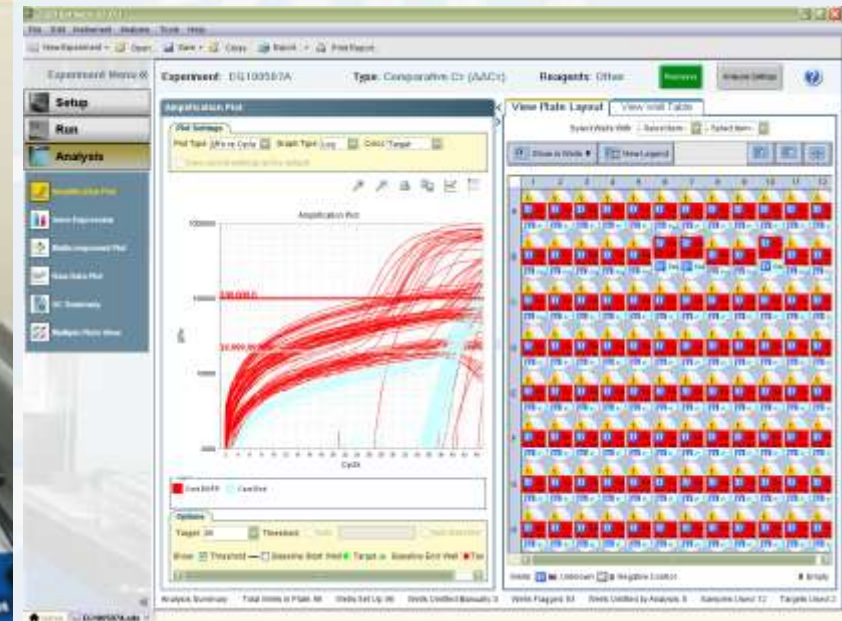


Figure 1. The short and long roads to PLX4032 resistance. (A) In cells expressing mutant *BRAF*, overexpression of *RAF1* or activation of *RAS* due to *N-RAS* mutation results in the formation of *BRAF*–*RAF1* heterodimers and/or *RAF1*–*RAF1* homodimers, causing resistance to PLX4032. Alternatively, overexpression of *COT* results in *RAF*-independent activation of *MEK* and *ERK*, and thus resistance to PLX4032. In such cells, therefore, PLX4032 resistance is mediated by reactivation of the *MAPK*–*ERK* signaling pathway. **(B)** Another possibility is that activation of upstream *RTKs* such as *PDGFRβ* makes *MEK* activity redundant by triggering downstream effectors of cell transformation through parallel signaling pathways. *PDGFRβ*: *PDGF* receptor- β

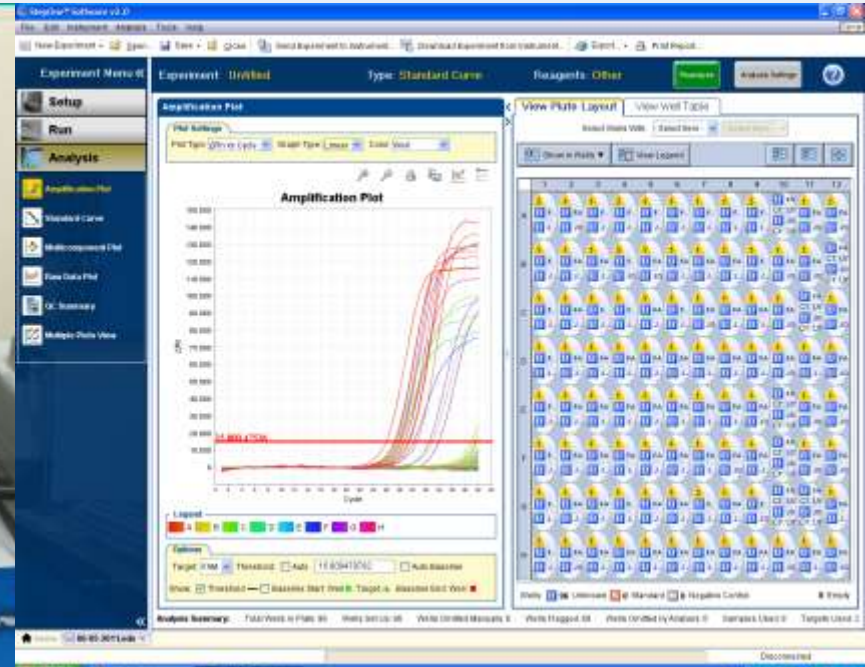
3.- DETERMINACIÓN DE MUTACIONES EN MELANOMA

BRAF → MELANOMA
KRAS → ADCA COLO-RECTAL METASTASICO
EGFR → ADCA PULMON



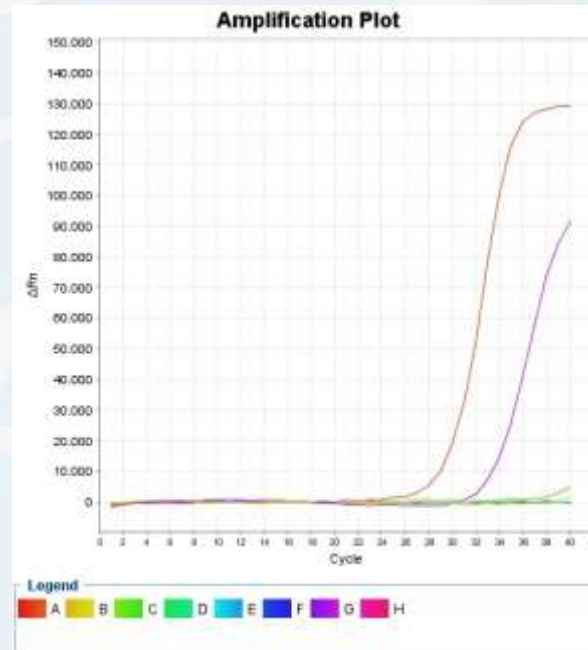
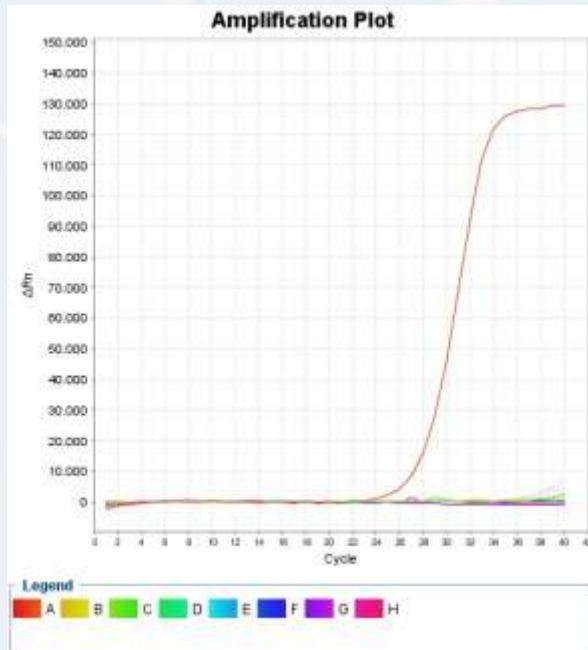
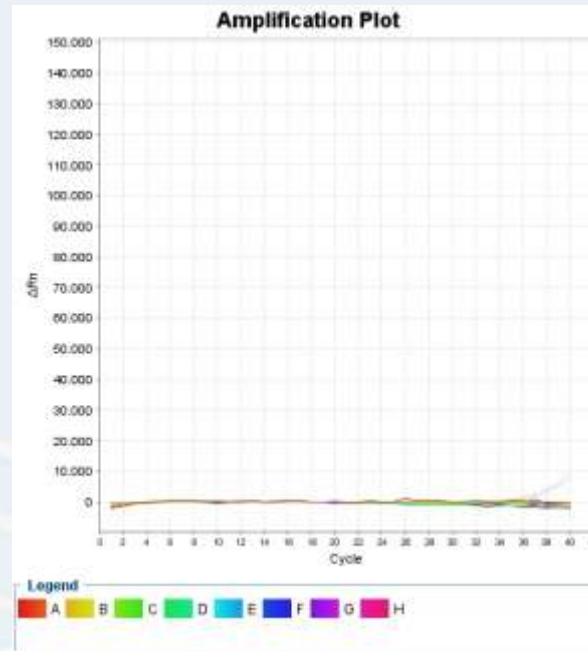
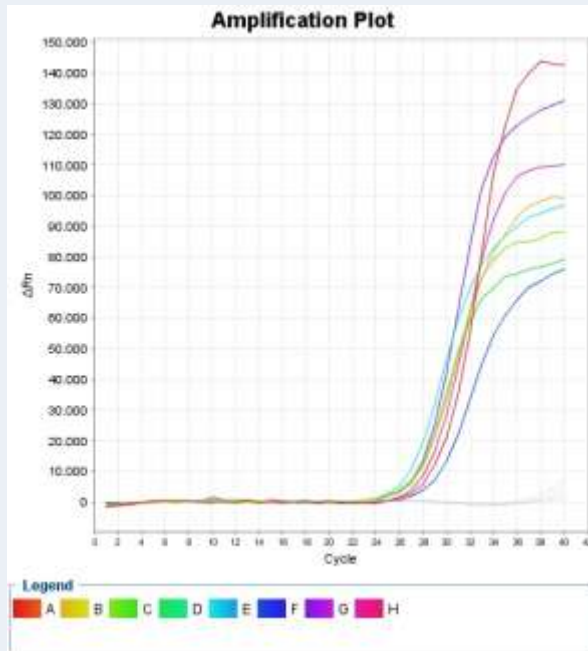
3.- DETERMINACIÓN DE MUTACIONES EN MELANOMA

PCR CUANTITATIVA permite cuantificar la cantidad de ADN o ARN presentes en la muestra original



LARAGOZA

3.- DETERMINACIÓN DE MUTACIONES EN MELANOMA

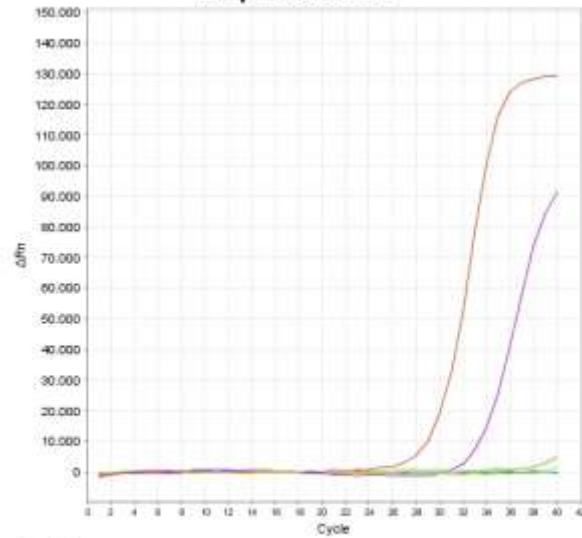


3.- DETERMINACIÓN DE MUTACIONES EN MELANOMA

Predictor

TEST DE EMBARAZO

Amplification Plot



LECTURA DEL RESULTADO

Una vez completado el test, una línea rosa/púrpura aparecerá en la ventana dica que la prueba está funcionando correctamente.

Lea el resultado al cabo de 5 minutos de haber realizado el test. No interprete los resultados antes de 30 minutos desde la realización del test.



SÍ
Embarazada

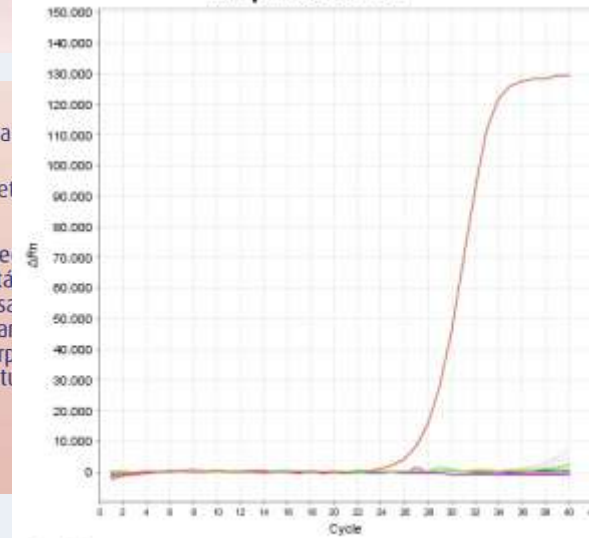
Puede concluir que está embarazada, si pasados 5 minutos aparece una línea rosa/púrpura en la ventana de lectura (T). Incluso en el caso de que el color de la línea sea pálido, significa que está embarazada. En algunos casos puede observarse un resultado positivo en menos de 1 minuto de funcionamiento del test.



NO
No embarazada

Puede estar embarazada si pasados 5 minutos aparece una línea rosa/púrpura en la ventana de lectura (T).

Amplification Plot



ZARAGOZA

PCR:

¿PARA QUE LE SIRVE AL DERMATOPATÓLOGO?:

EN LA ACTUALIDAD:

1. DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS
2. CLONALIDAD LINFOIDE

EN FUTURO INMEDIATO:

3. DETERMINACIÓN DE MUTACIONES EN MELANOMA.
4. **DETERMINACIÓN DE MICROMETÁSTASIS DE MELANOMA EN BSGC.**

PCR: ¿VALE PARA ALGO?:

4.- DETERMINACIÓN DE MICROMETÁSTASIS DE MELANOMA EN BSGC.

•**BSGC:** Dudosa utilidad terapéutica pero confirmada utilidad pronóstica.

2011

ZARAGOZA

PCR: ¿VALE PARA ALGO?:

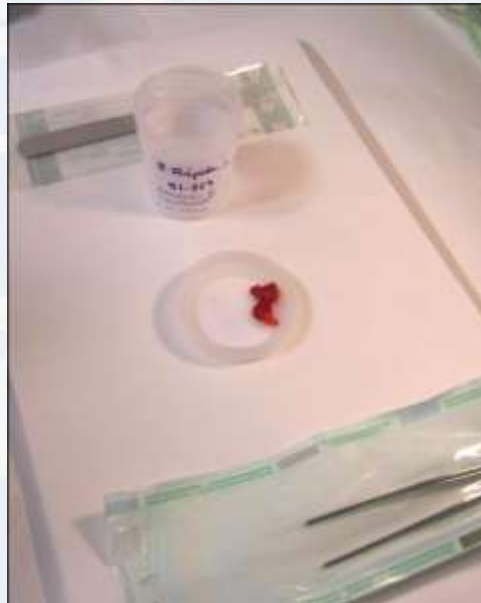
4.- DETERMINACIÓN DE MICROMETÁSTASIS DE MELANOMA EN BSGC.

- **BSGC:** Dudosa utilidad terapéutica pero confirmada utilidad pronóstica.

- **Técnica convencional BSGC:**

 - Estudia 1-5% del tejido

 - Casos negativos: metastasis en 25% de casos.



4.- DETERMINACIÓN DE MICROMETÁSTASIS DE MELANOMA EN BSGC.

Ann Surg. 2011 January ; 253(1): 116–122. doi:10.1097/SLA.0b013e3181fca894.

Molecular Upstaging Based on Paraffin-embedded Sentinel Lymph Nodes:

Ten-Year Follow-up Confirms Prognostic Utility in Melanoma Patients

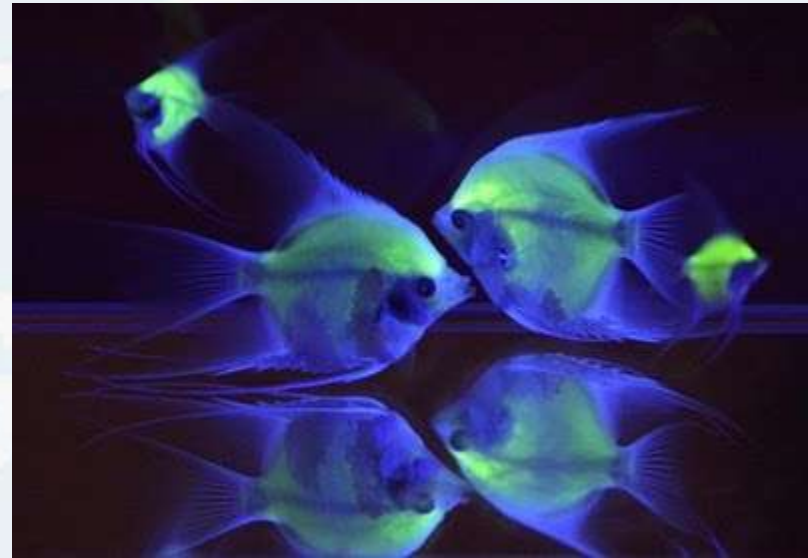
Michael B. Nicholl, MD^{*,†}, David Elashoff, PhD[‡], Hiroya Takeuchi, MD, PhD^{*}, Donald L. Morton, MD[†], and Dave S. B. Hoon, PhD, MSc^{*}

MART-1
MAGE-A3
GalNAc-T
Pax-3



- Determinación molecular RT-PCR
- Marcadores de progresión no presentes en nevus
- 20-30% de ggs negativos (IHC) son positivos (RT-PCR).
- Esos casos tienen pronóstico similar a los positivos histológicamente.

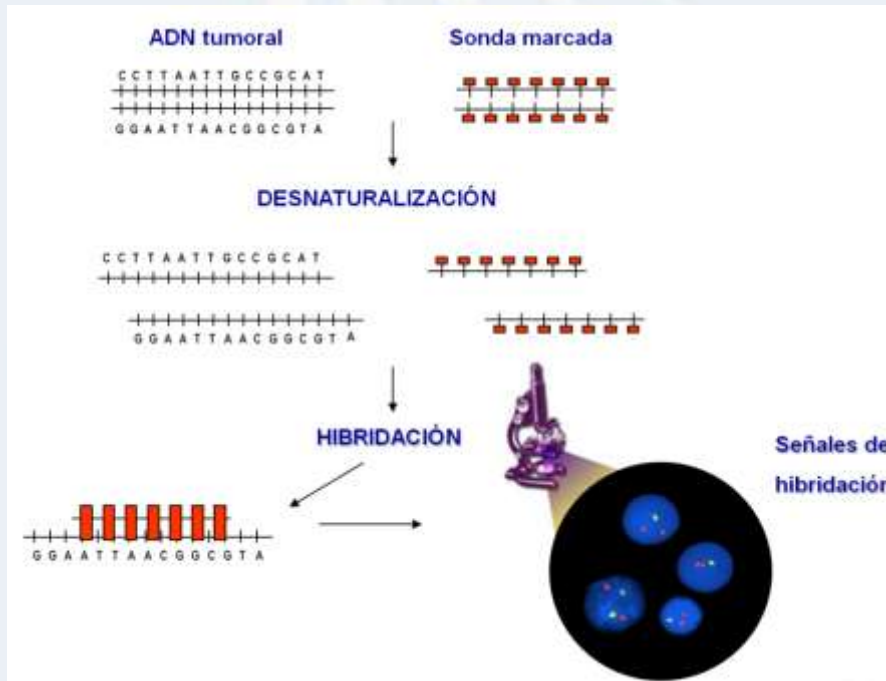
FISH



FISH: HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA

Empleo de sondas con fluorescencia que reconoce secuencias específicas de

1. Genes: Detecta anomalías genéticas (y numéricas), etc...
2. Cromosomas: Detecta alteraciones cuantitativas



CISH: EMPLEO DE CROMÓGENO EN LUGAR DE FLUOROCROMOS

FISH:

VENTAJAS:

- Aplicable a material parafinado
- Correlación entre morfología y anomalías genéticas

2011

ZARAGOZA

FISH:

VENTAJAS:

- Aplicable a material parafinado
- Correlación entre morfología y anomalías genéticas

INCONVENIENTES:

- Sólo detecta anomalías de sondas que estudiamos.
- Pueden existir FP y FN si valorado por técnicos u otros profesionales no patólogos.

ZARAGOZA

FISH:

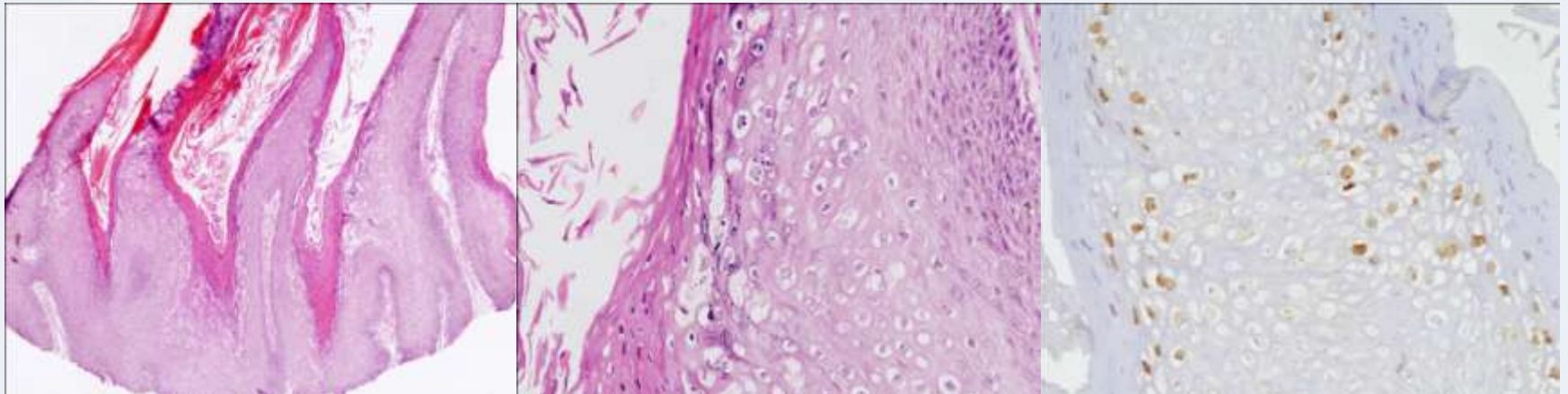
APLICACIONES:

1. Determinación de agentes infecciosos

EBV



HPV



FISH:

APLICACIONES:

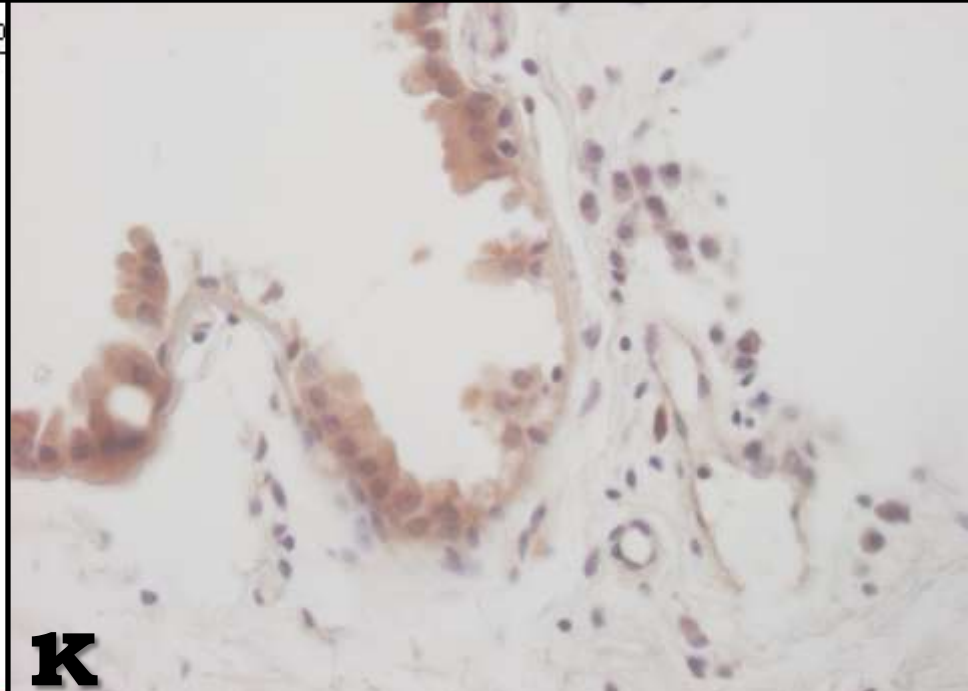
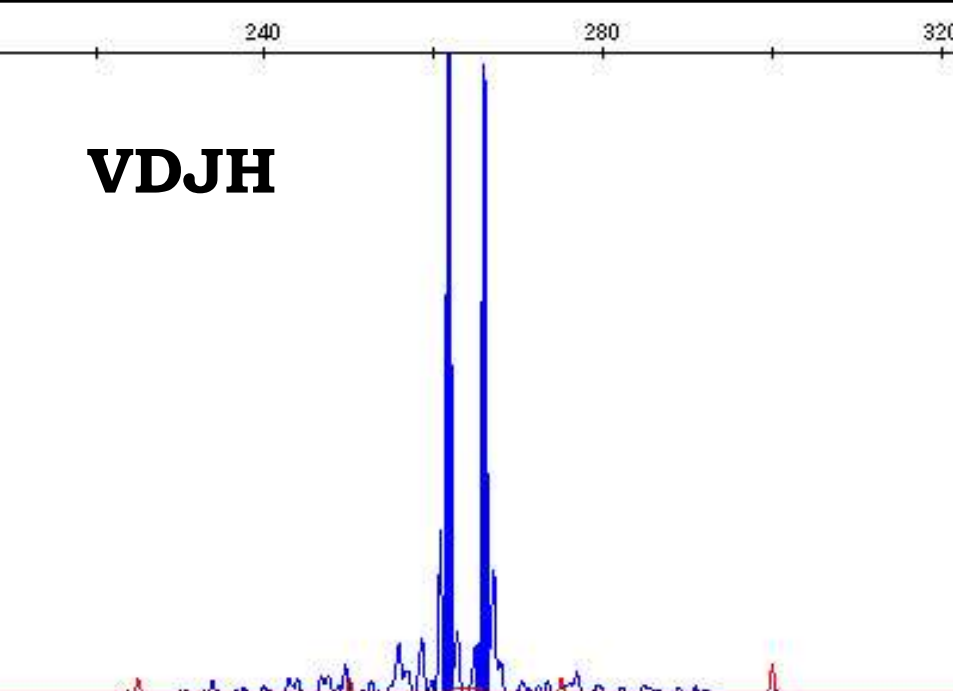
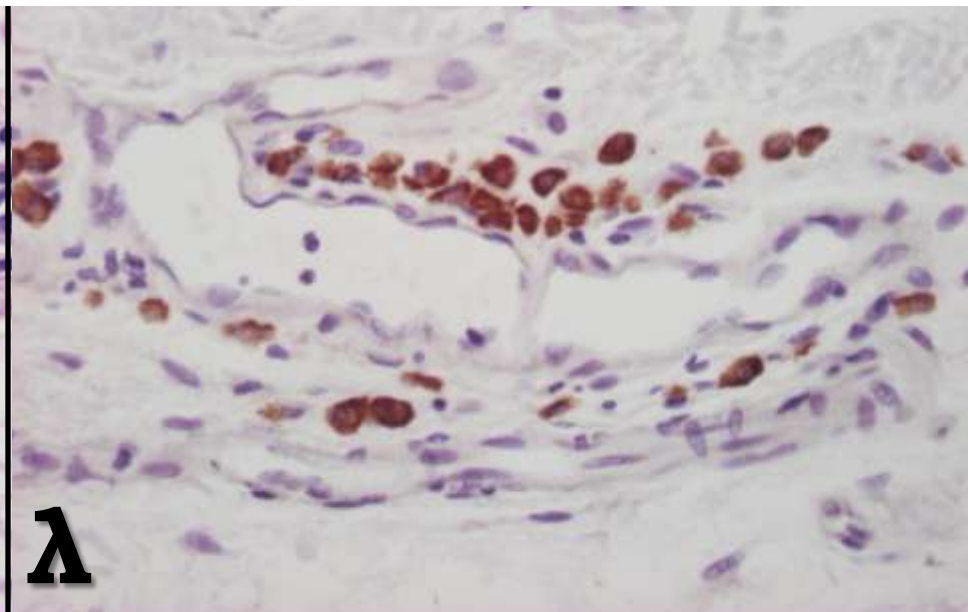
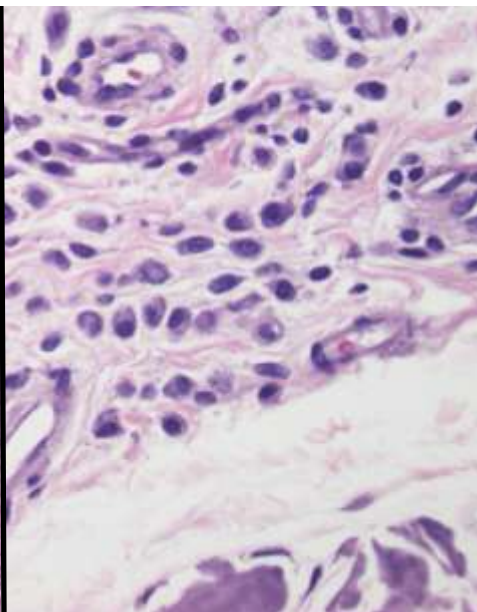
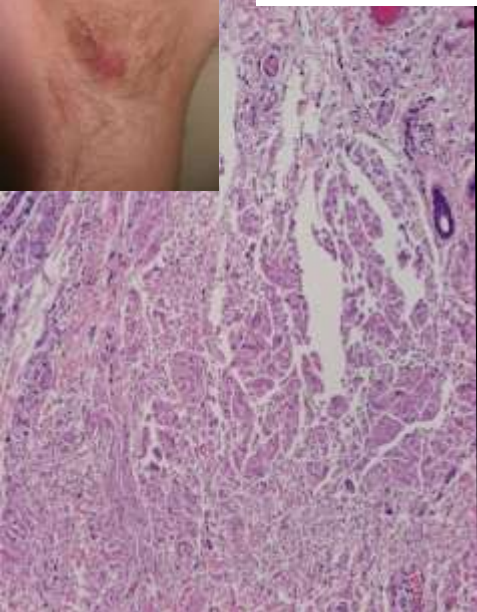
2. TUMORES

- Neoplasias hematodérmicas

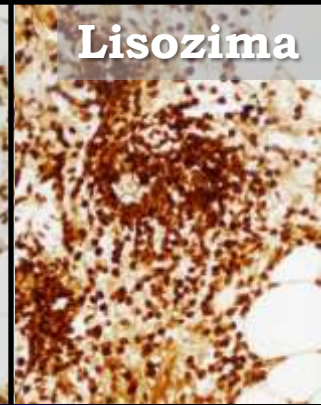
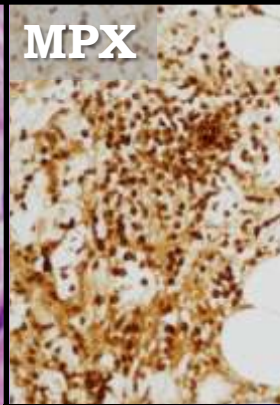
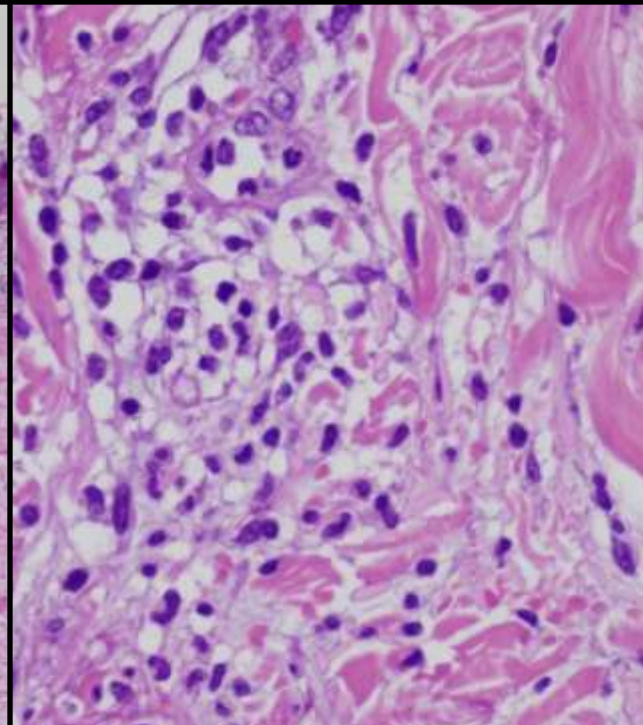
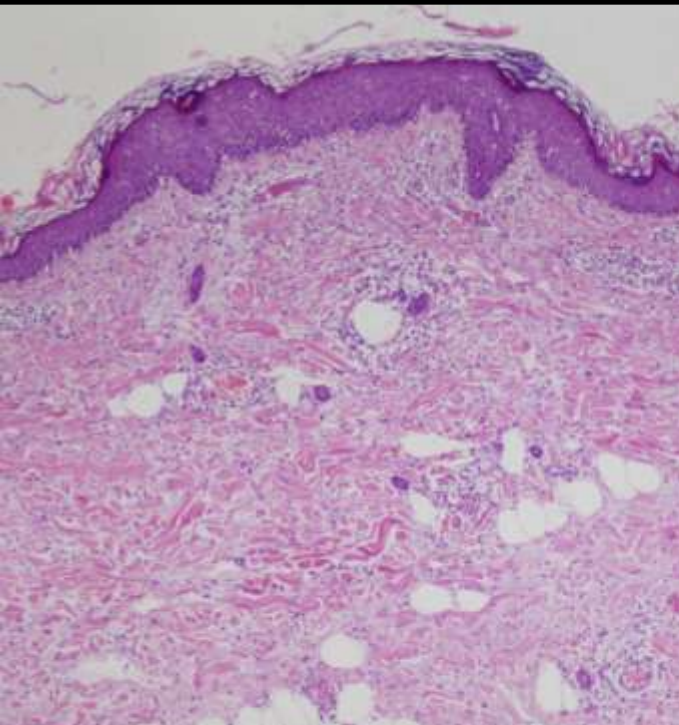
2011

ZARAGOZA

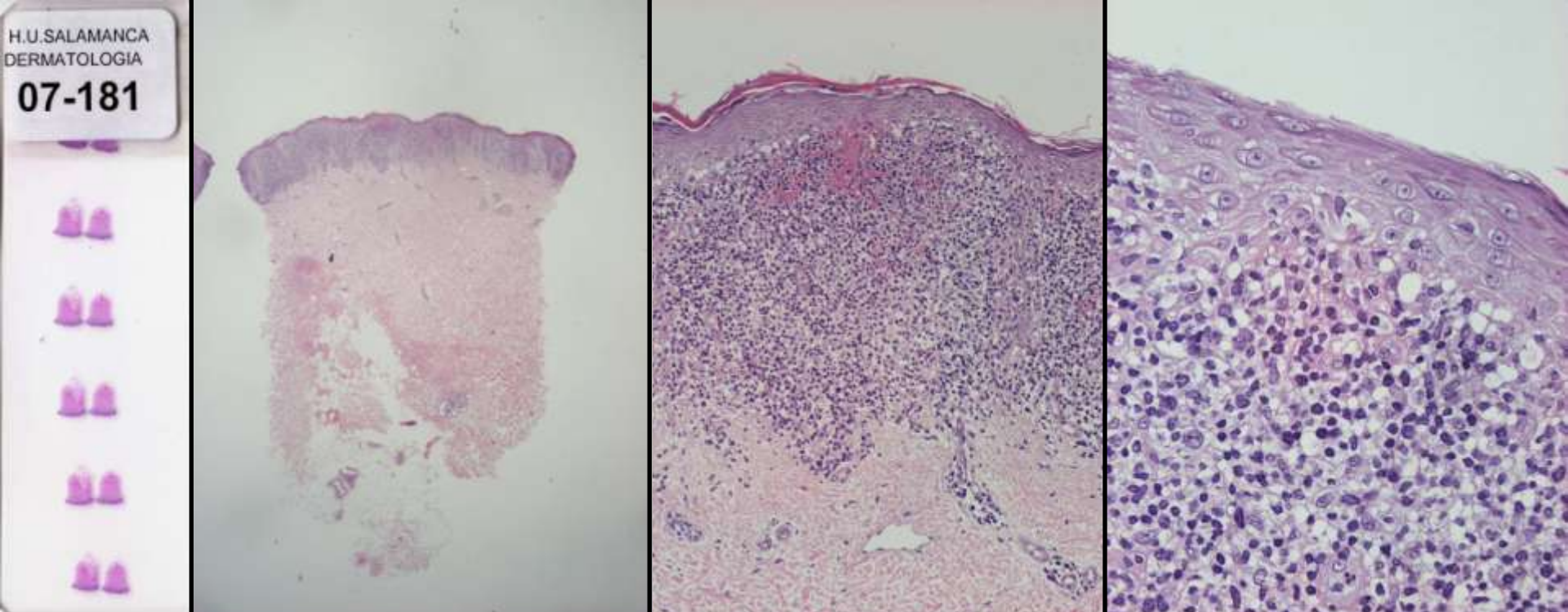
AMILOIDOSIS NODULAR CUTÁNEA: RESTRICCIÓN CADENAS λ



♀ **63 años fiebre de 39° C de 1 semana de evolución**



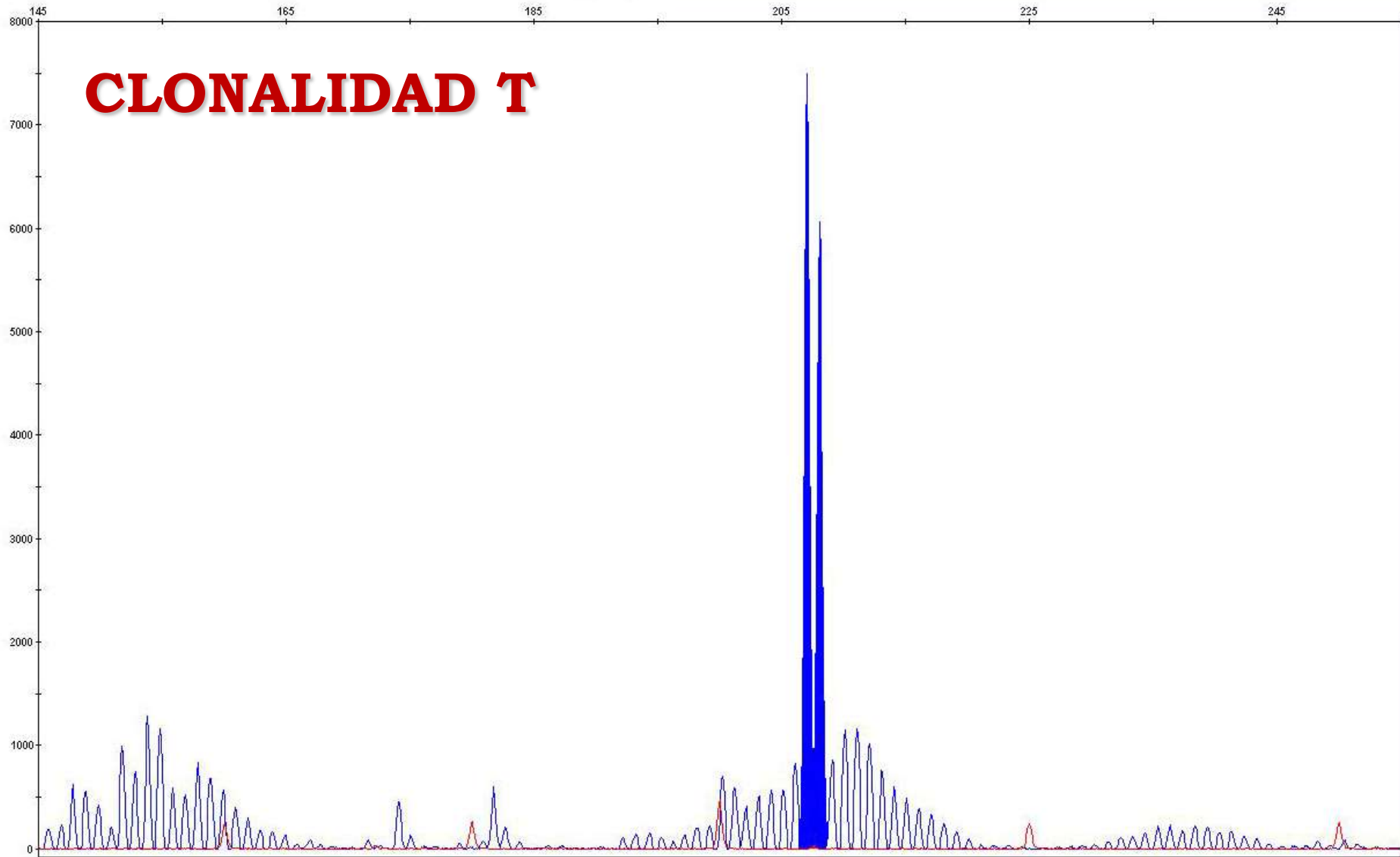
SWEET HISTIOCÍTICO: DESCARTAR t(9;22)



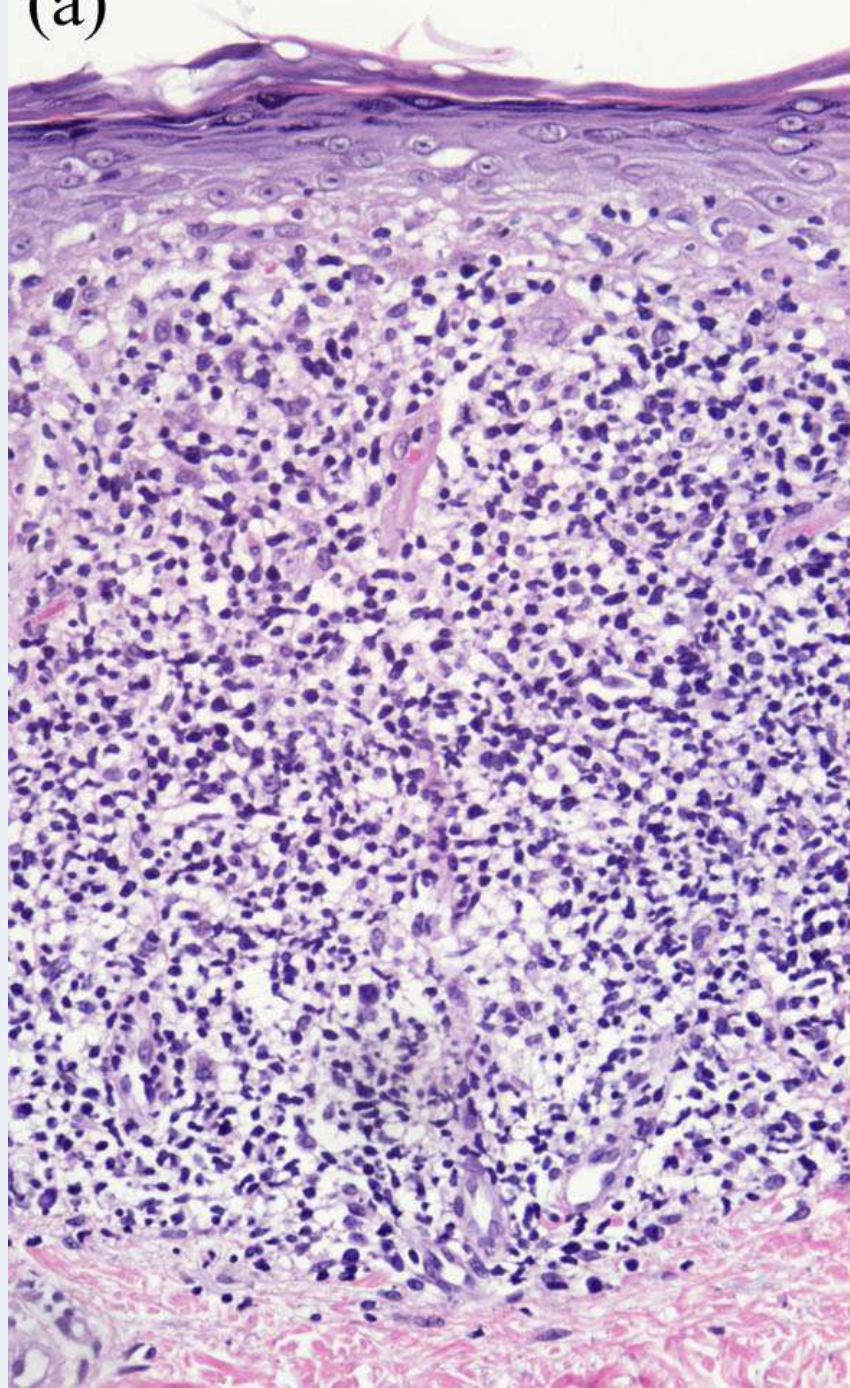
Clinical and Experimental Dermatology
Primary cutaneous T-cell lymphoproliferative disorder of donor origin
after allogeneic haematopoietic stem-cell transplantation

A. Santos-Briz, A. Romo,* P. Antúnez, C. Román,* M. Alcoceba,† J. L. García,‡ L. Vazquez,†
M. González† and P. Unamuno*

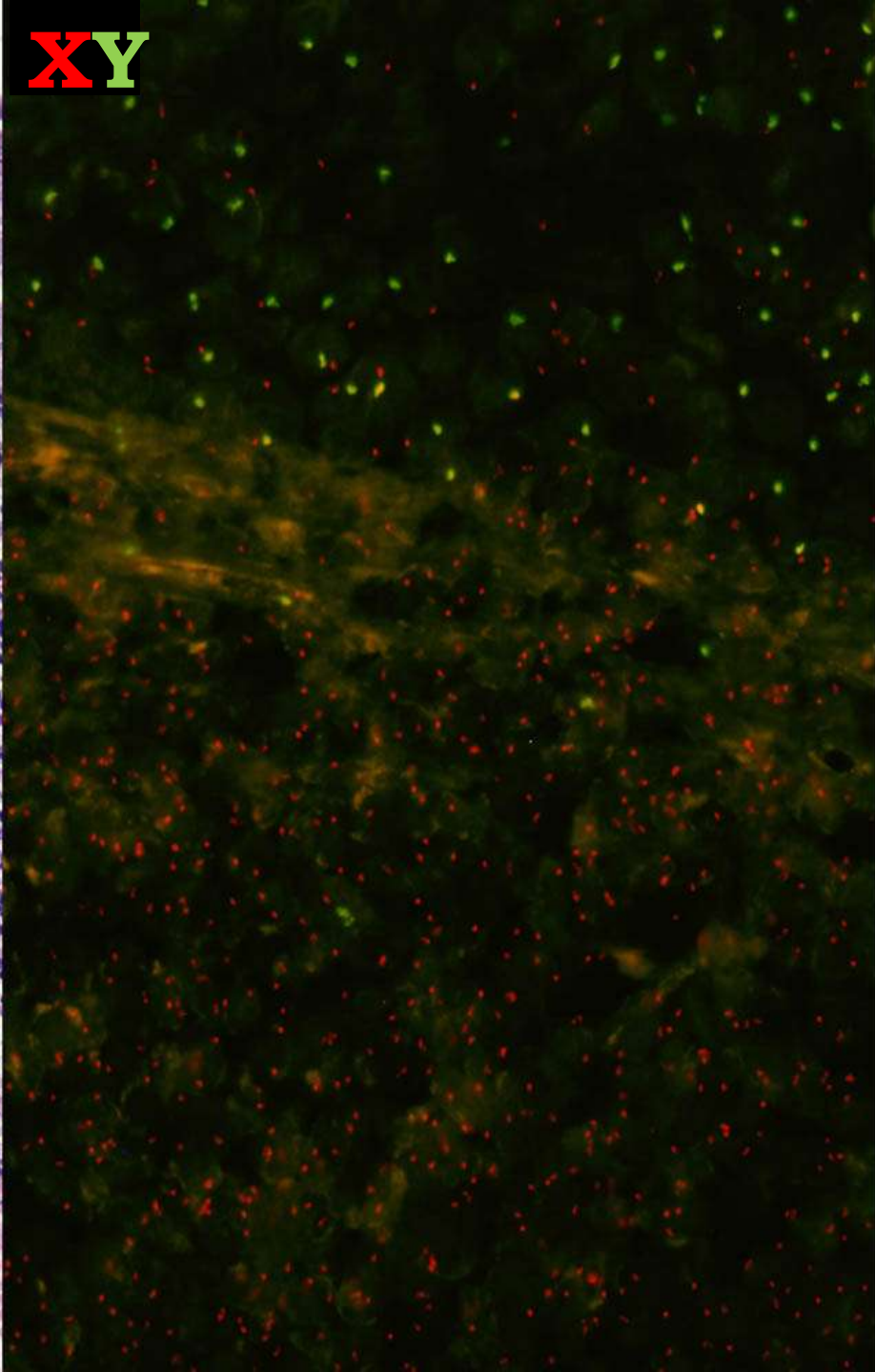
CLONALIDAD T



(a)

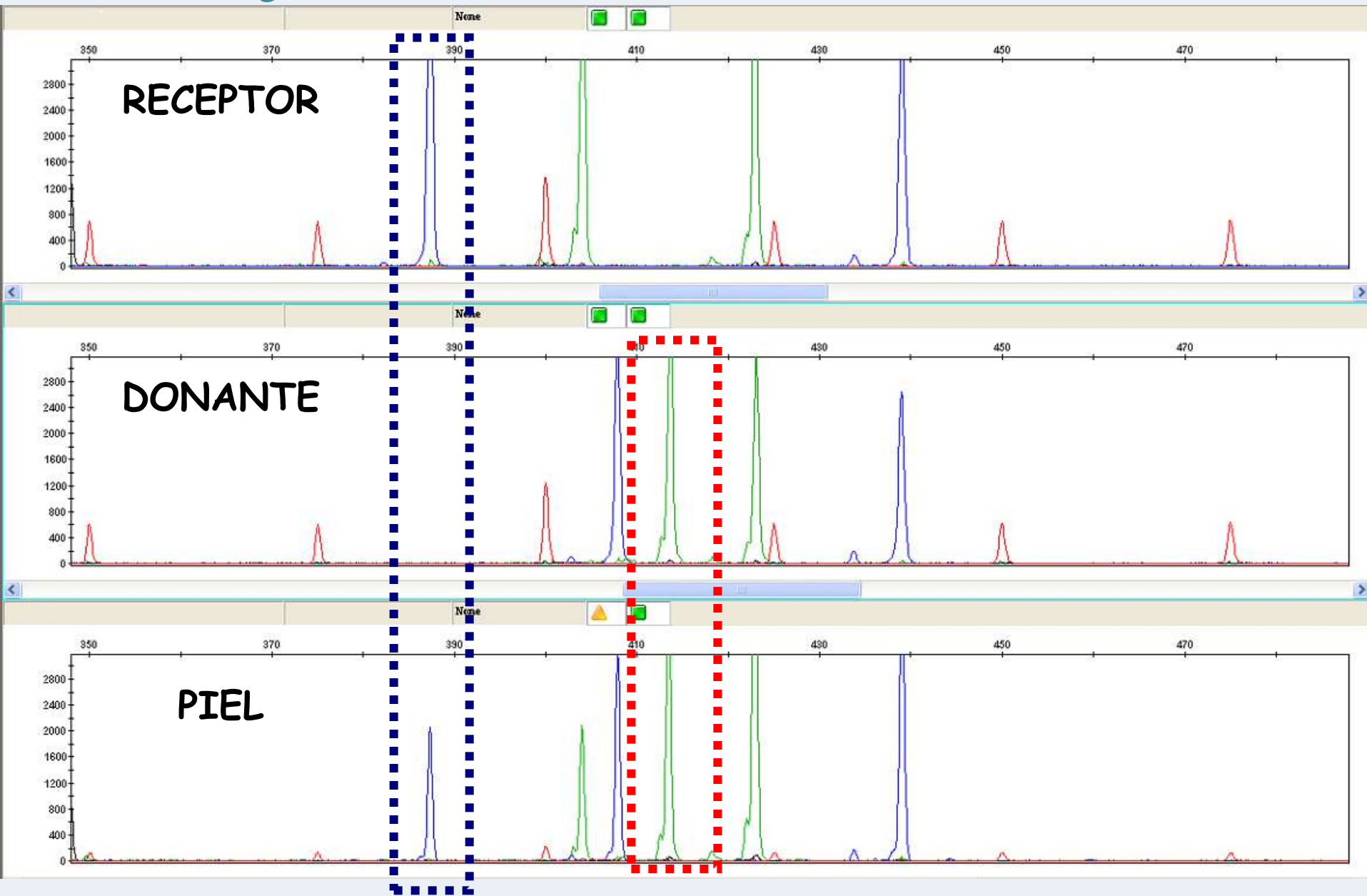


XY



ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES

QUIMERISMO MIXTO EN MUESTRA DE PIEL



FISH:

APLICACIONES:

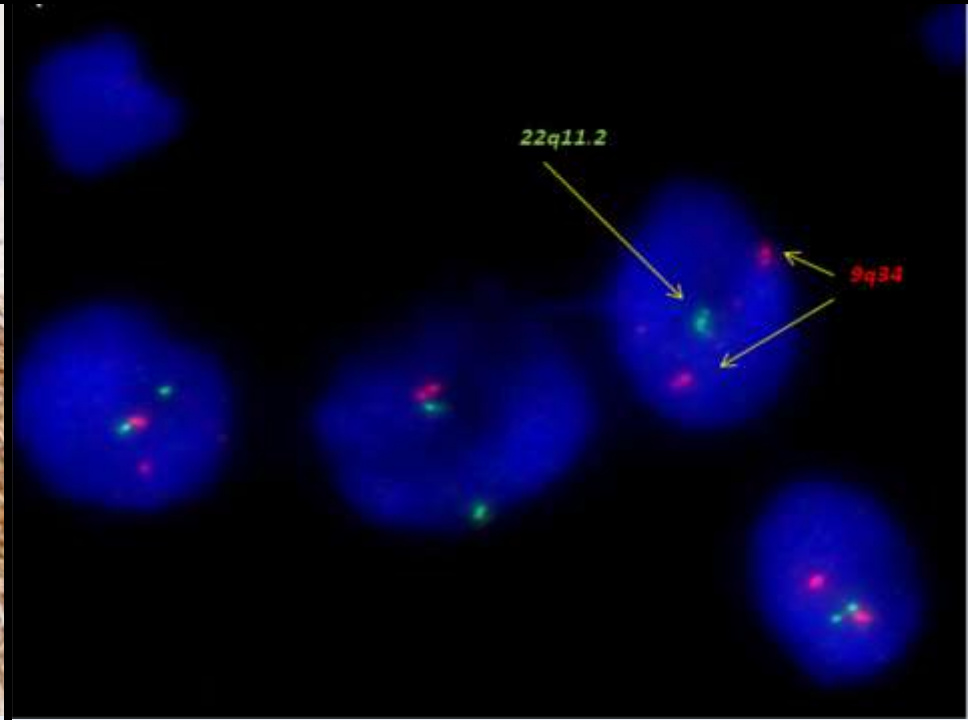
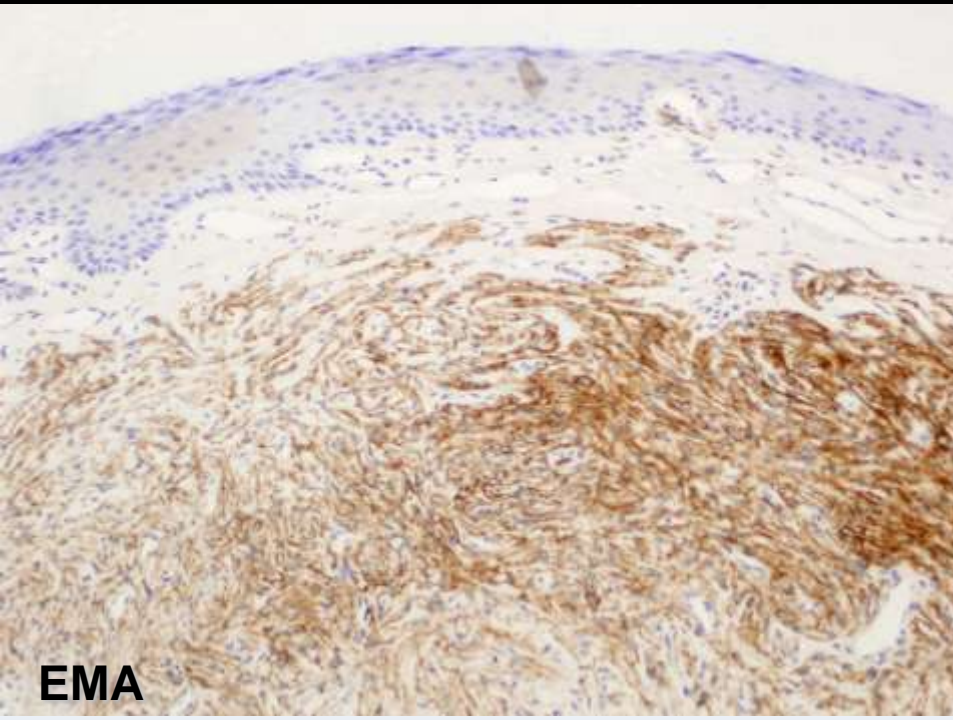
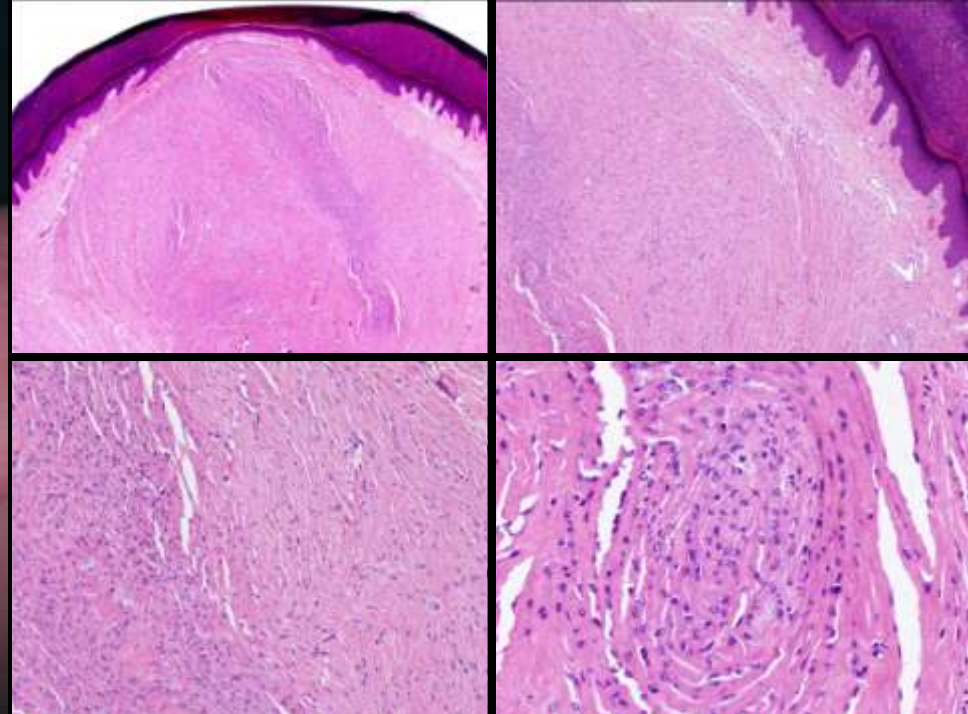
2. TUMORES

- Linfomas
- Tumores de partes blandas

2011

ZARAGOZA

PERINEUROMA ESCLEROSANTE



FISH:

APLICACIONES:

2. TUMORES

- Linfomas
- Tumores de partes blandas
- Melanomas: Citogenética: FISH

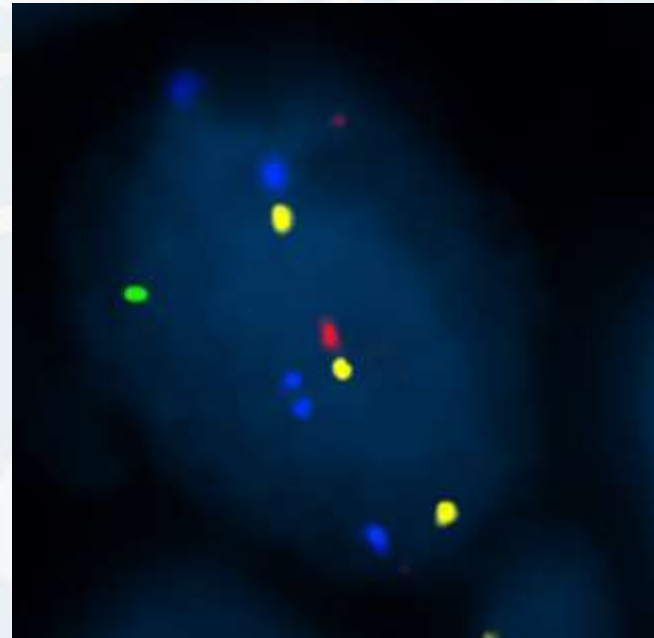
MULTICOLOR

RREB1 6p25

MYB 6q23

CCND1 11q13

CEP6



FISH:

APLICACIONES:

Melanomas: FISH MULTICOLOR

Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) as an Ancillary Diagnostic Tool in the Diagnosis of Melanoma

Pedram Gerami, MD, Susan S. Jewell, PhD,† Larry E. Morrison, PhD,†
Beth Blondin, BSc,† John Schulz, BSc,† Teresa Ruffalo, BSc,† Paul Matushek, IV, MS,†
Mona Legator, BSc,† Kristine Jacobson, MS, MAJ,† Scott R. Dalton, MC,‡
Susan Charzan, MS,§ Nicholas A. Kolaitis, BS,§ Joan Guitart, MD,*
Terakeith Lertsbarapa, MD,* Susan Boone, MD,*
Philip E. LeBoit, MD,§ and Boris C. Bastian, MD§*

Am J Surg Pathol • Volume 33, Number 8, August 2009

Estudios iniciales demostraron alta sensibilidad y especificidad en el diagnóstico diferencial entre nevus de melanoma :

- Sensibilidad 87%
- Especificidad 95%

FISH:

APLICACIONES:

Melanomas: FISH MULTICOLOR

MODERN PATHOLOGY (2010) 23, 413–419

© 2010 USCAP, Inc. All rights reserved 0893-3952/10 \$32.00



413

Classifying ambiguous melanocytic lesions with FISH and correlation with clinical long-term follow up

Timo Gaiser^{1,2}, Heinz Kutzner³, Gabriele Palmedo³, Markus D Siegelin^{1,4}, Thomas Wiesner⁵, Thomas Bruckner⁶, Wolfgang Hartschuh⁷, Alexander H Enk⁷ and Maria R Becker⁷

1. No útil para lesiones ambiguas de difícil diagnóstico histológico.
2. Existen MM sin alteraciones citogenéticas
3. Concordancia de valoración interobservador moderada
4. No concordancia con datos CGH

HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA

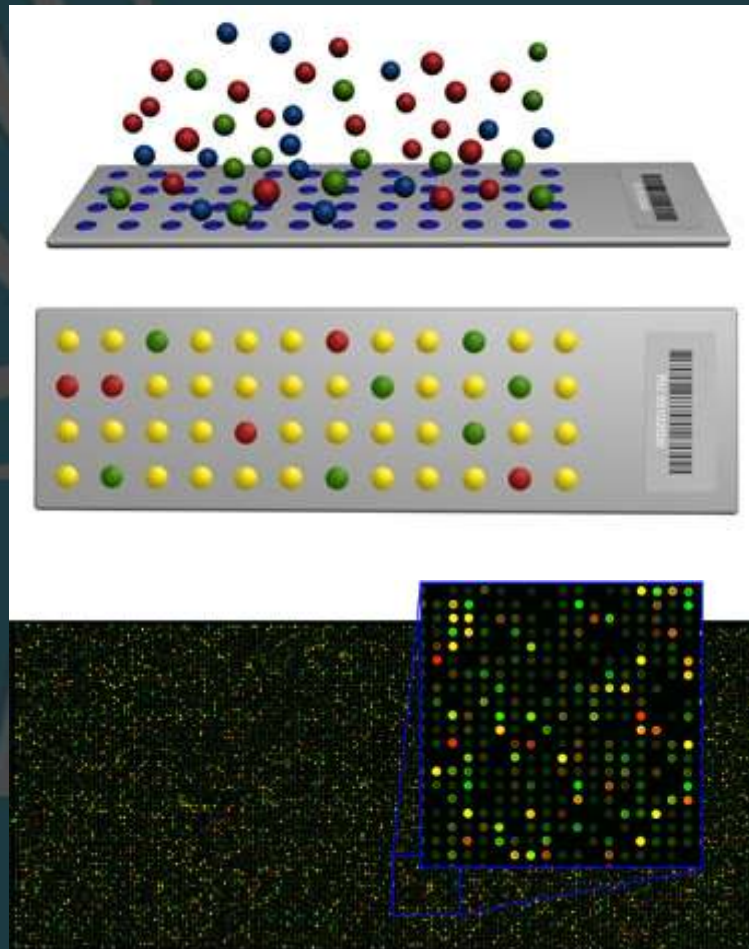
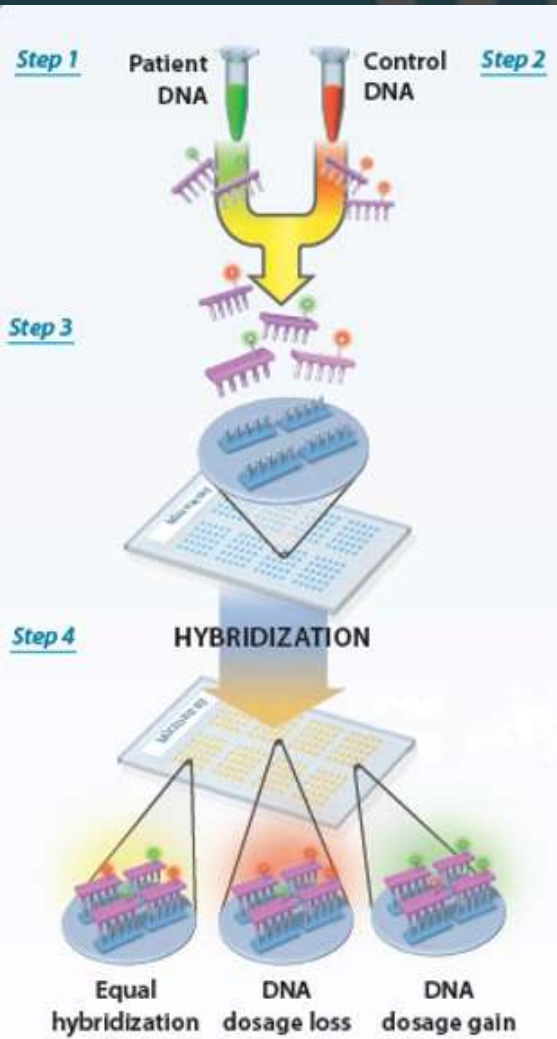
ZARAGOZA

HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA CGH ARRAYS:

DNA TUMORAL

ADN Cot-1

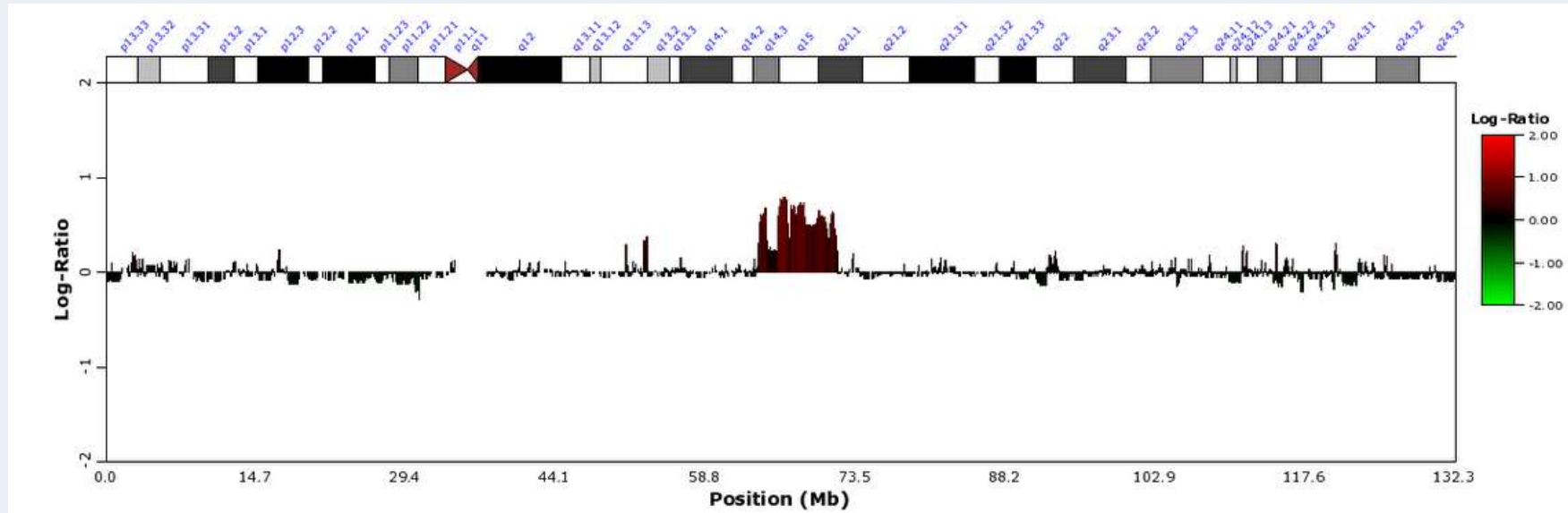
DNA NORMAL



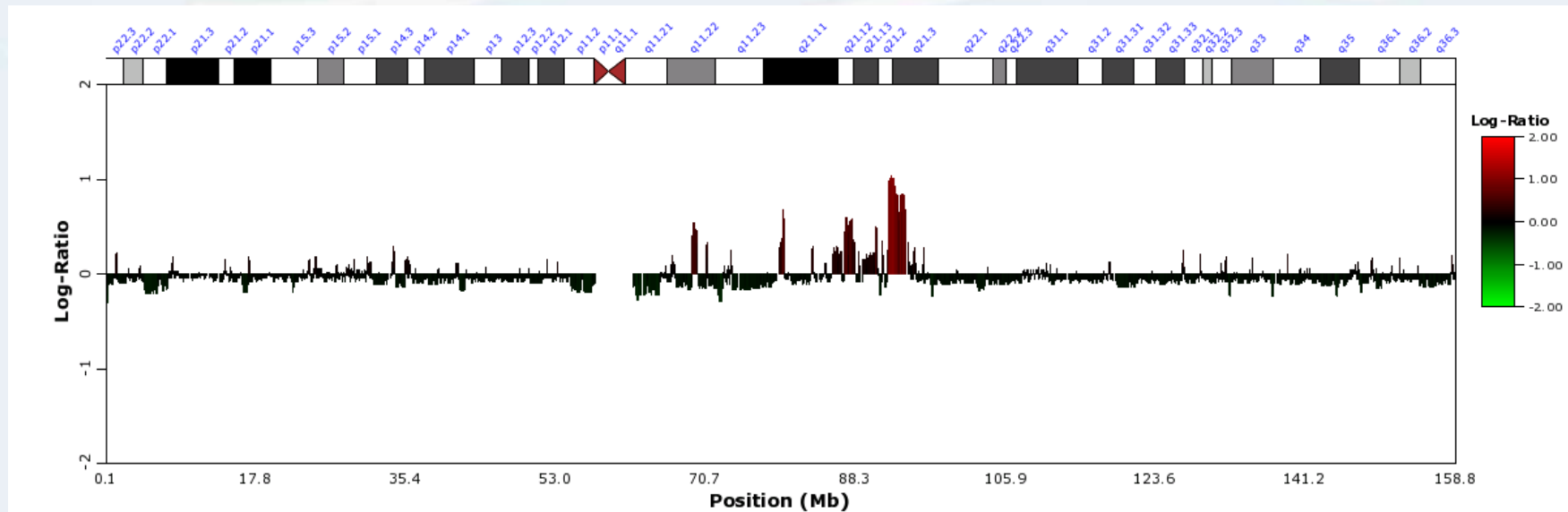
180.000 €



7q21.2-q21.3



12q14.2-q15



HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA:

VENTAJAS:

Ideal para descubrir nuevas alteraciones citogenéticas

Detecta alteraciones no identificables por FISH

2011

ZARAGOZA

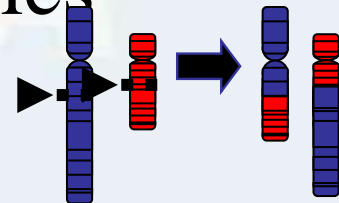
HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA:

INCONVENIENTES:

- Carísima y muy laboriosa



- Alteraciones numéricas cromosómicas sólo si un % importante de células tumorales
- No identifica cromosomopatías estructurales
- Translocaciones balanceadas.



HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA:

APLICACIONES EN DERMATOPATOLOGÍA:

Investigación: +++

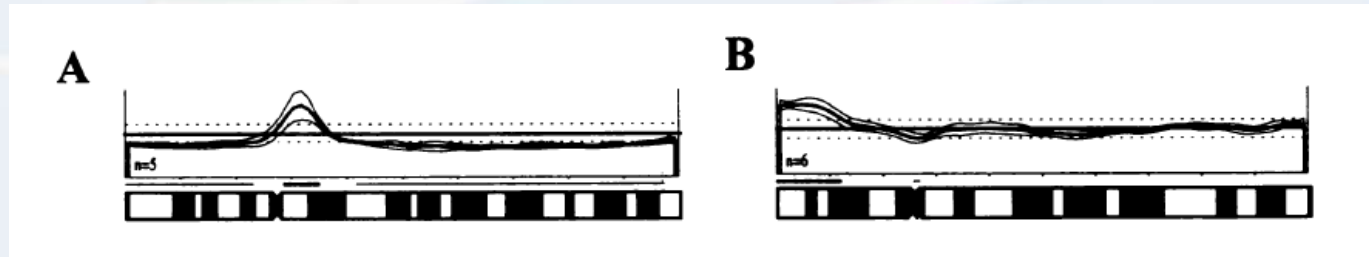
Melanoma / nevus: factores diagnósticos

[CANCER RESEARCH 58, 2170-2175, May 15, 1998]

Chromosomal Gains and Losses in Primary Cutaneous Melanomas Detected by Comparative Genomic Hybridization¹

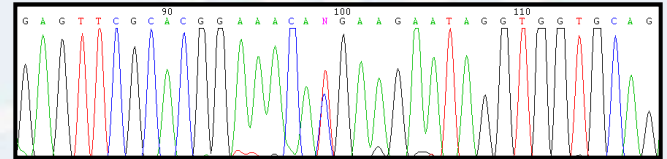
Boris C. Bastian,² Philip E. LeBoit, Henning Hamm, Eva-Bettina Bröcker, and Dan Pinkel

Cancer Genetics Program, Cancer Center [B. C. B., D. P.] and Dermatopathology Section, Departments of Pathology and Dermatology [P. E. L.], University of California San Francisco, San Francisco, California 94143-0808, and Department of Dermatology, University of Würzburg, D-97080 Würzburg, Germany [B. C. B., H. H., E-B. B.]



Asistencia: -

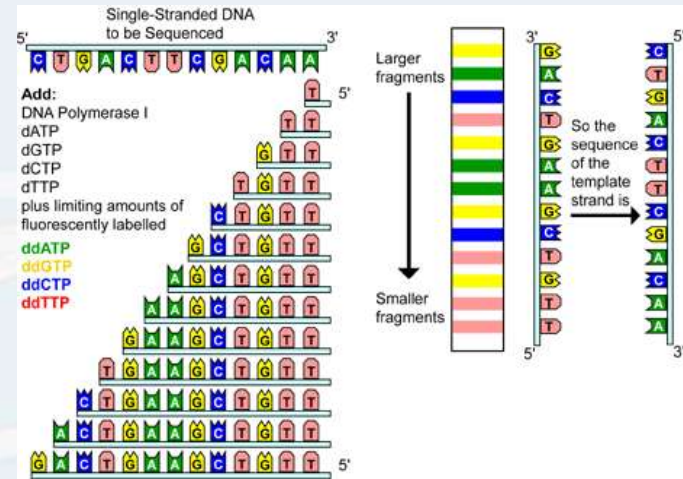
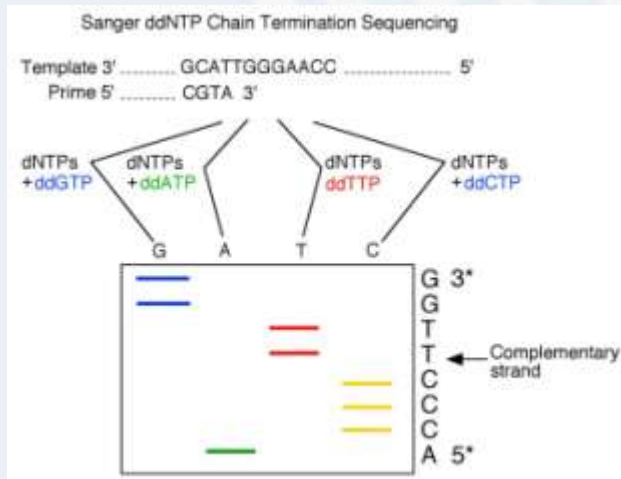
SECUENCIACIÓN



ZARAGOZA

SECUENCIACIÓN:

Conjunto de métodos y técnicas bioquímicas para determinar el orden de los nucleótidos.



SECUENCIACIÓN:

VENTAJAS:

- Permite identificar nuevas alteraciones moleculares y eventos oncogénicos.

Science. 2008 February 22; 319(5866): 1096–1100. doi:10.1126/science.1152586.

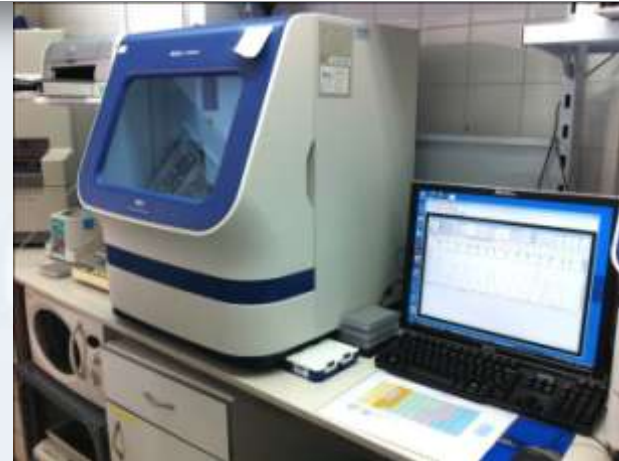
Clonal Integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinoma

Huichen Feng, Masahiro Shuda, Yuan Chang*, and Patrick S. Moore*

Molecular Virology Program, University of Pittsburgh Cancer Institute, University of Pittsburgh, 5117 Centre Avenue, Suite 1.8, Pittsburgh, PA 15213, USA

INCONVENIENTES:

- Muy cara y laboriosa.
- Complejidad técnica

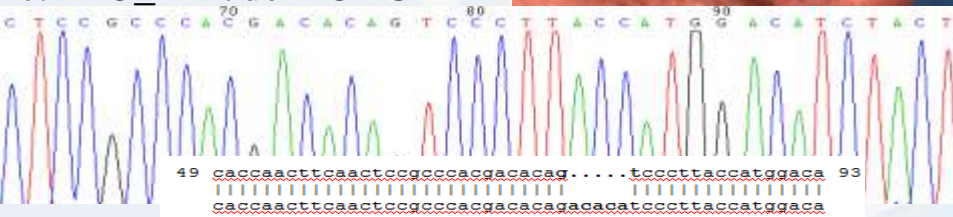


SECUENCIACIÓN: ICTIOSIS LAMINAR

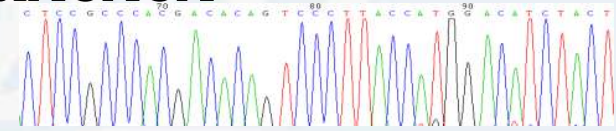
Dr. Pablo de Unamuno



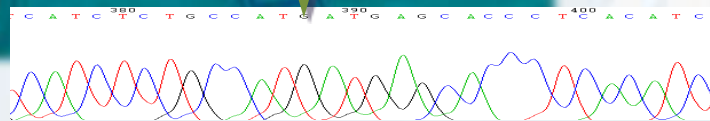
c.1223_1227delACACA



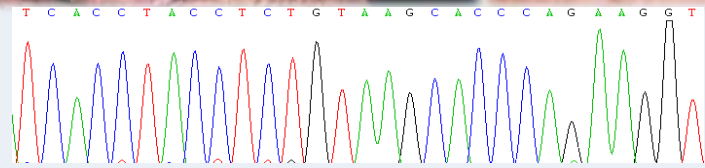
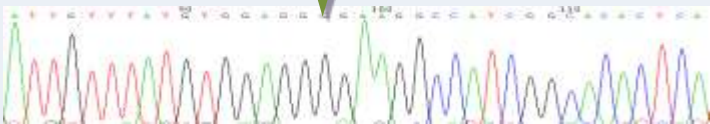
c.1223_1227delACACA



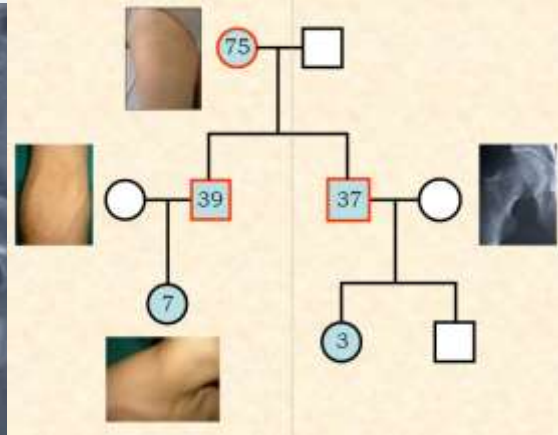
EXÓN 6



EXÓN 11



SECUENCIACIÓN: S.DE BUSHKE-OLLENDORFF

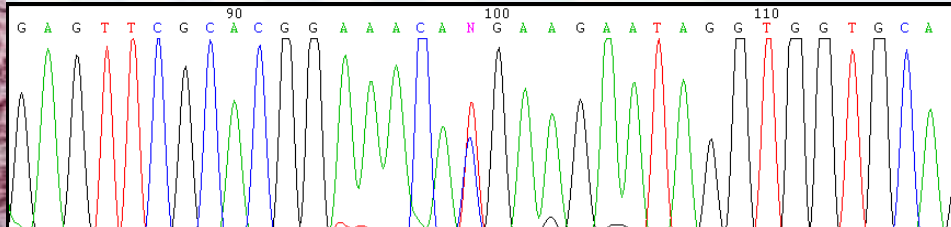
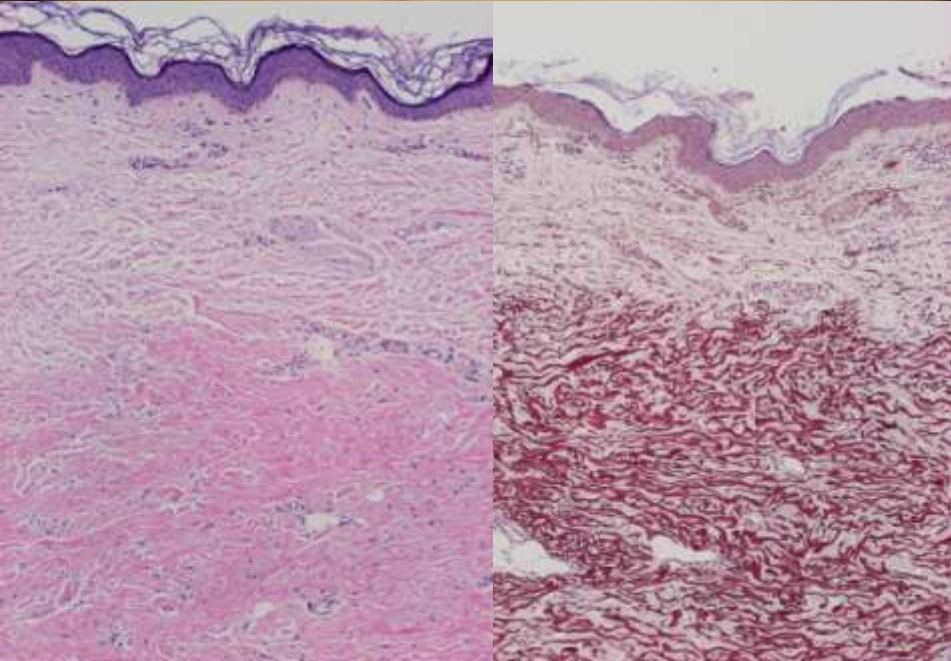


Pediatric Dermatology 1-4, 2010

Buschke-Ollendorff Syndrome with Striking Phenotypic Variation Resulting from a Novel c.2203C > T Nonsense Mutation in *LEMD3*

Manuela Yuste-Chaves, M.D., Ph.D.,^{1,*} Javier Cañueto, M.D.,^{1,*} Ángel Santos-Briz, M.D., Ph.D.,[†] Sara Ciria, B.Sc.,[‡] Rogelio González-Sarmiento, M.D., Ph.D.,^{‡,§} and Pablo Unamuno, M.D., Ph.D.[¶]

Mutación *LEMD3*
[c.2203C>T;p.R735X]
Codón de stop prematuro.



SECUENCIACIÓN:

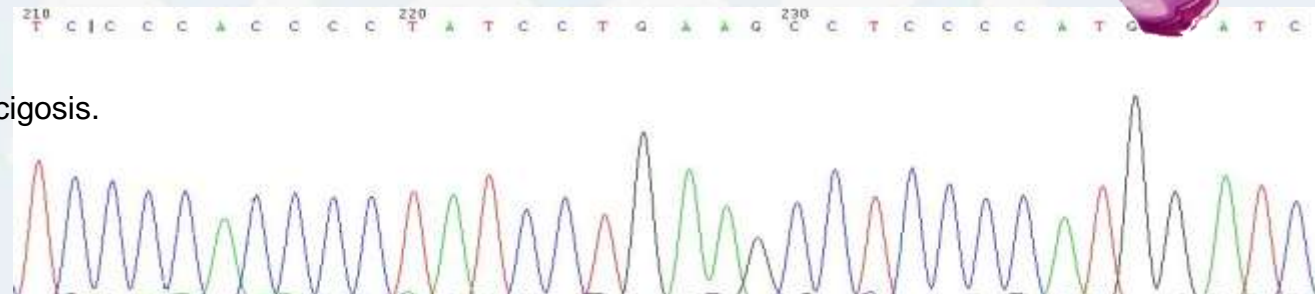
PROTEINOSIS LIPOÍDICA (CROM1) ASOCIADA A SÍNDROME DE PENDRED (CROM7)



ECM1 EX3

Mutación c.157C>T; pR53X en homocigosis.

CODON STOP



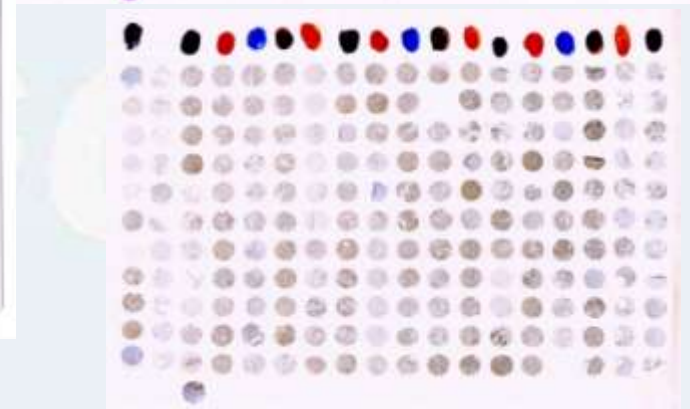
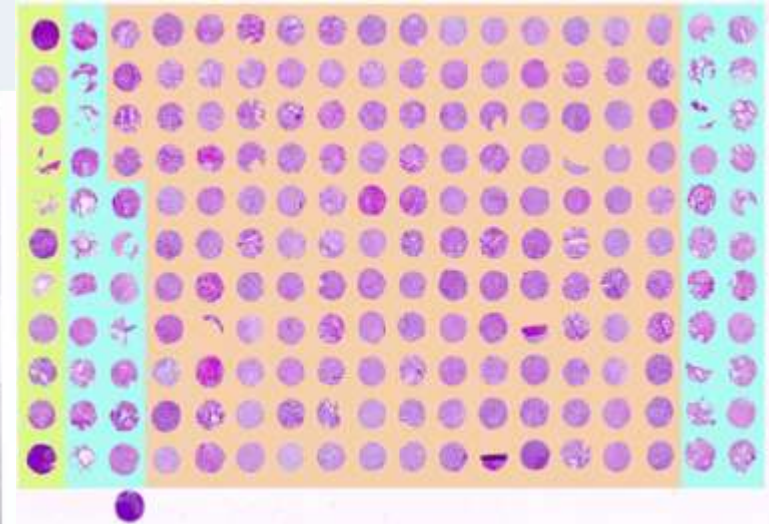
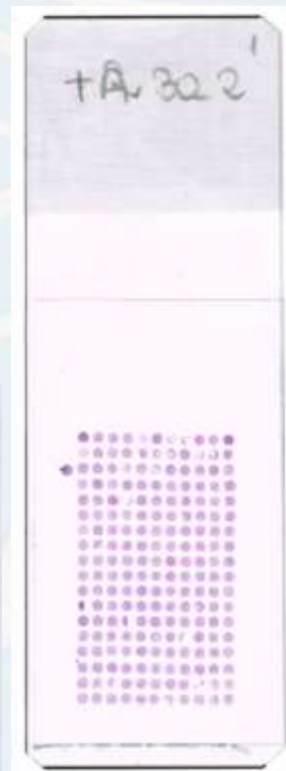
TMA

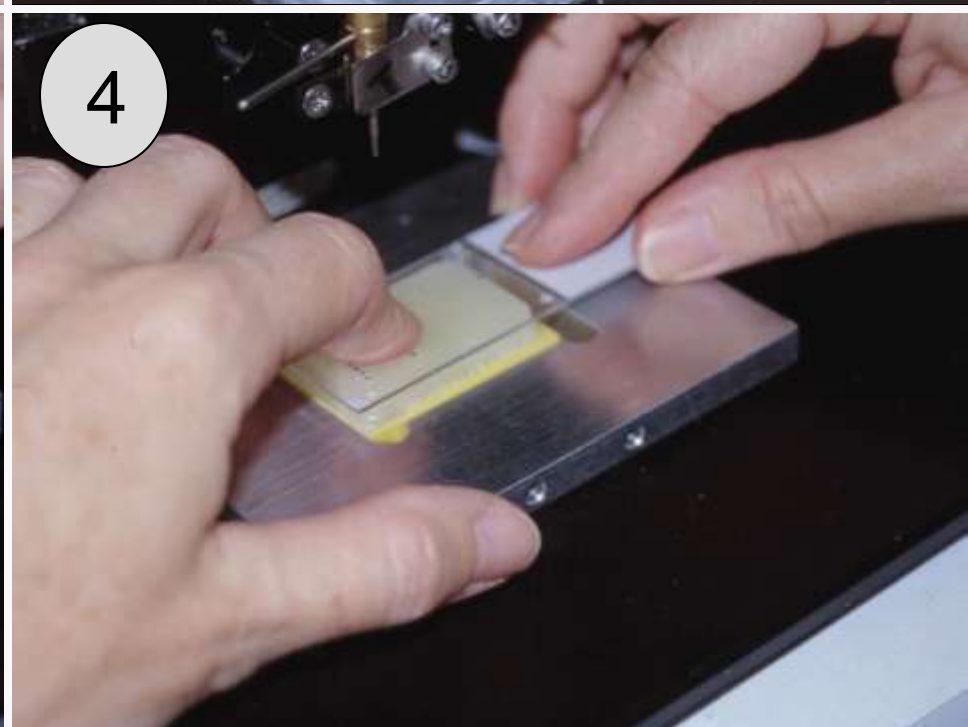
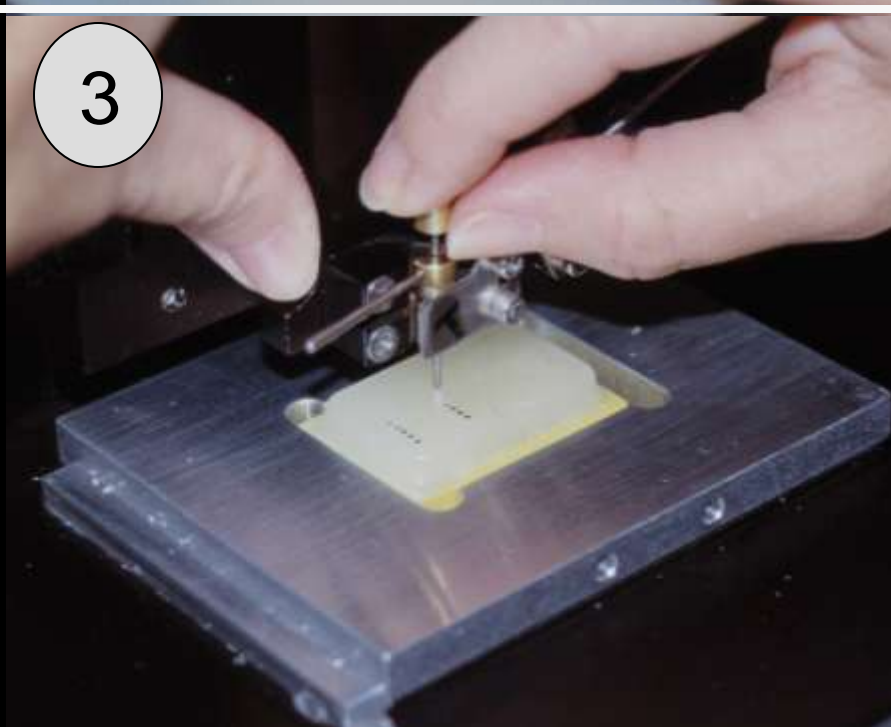
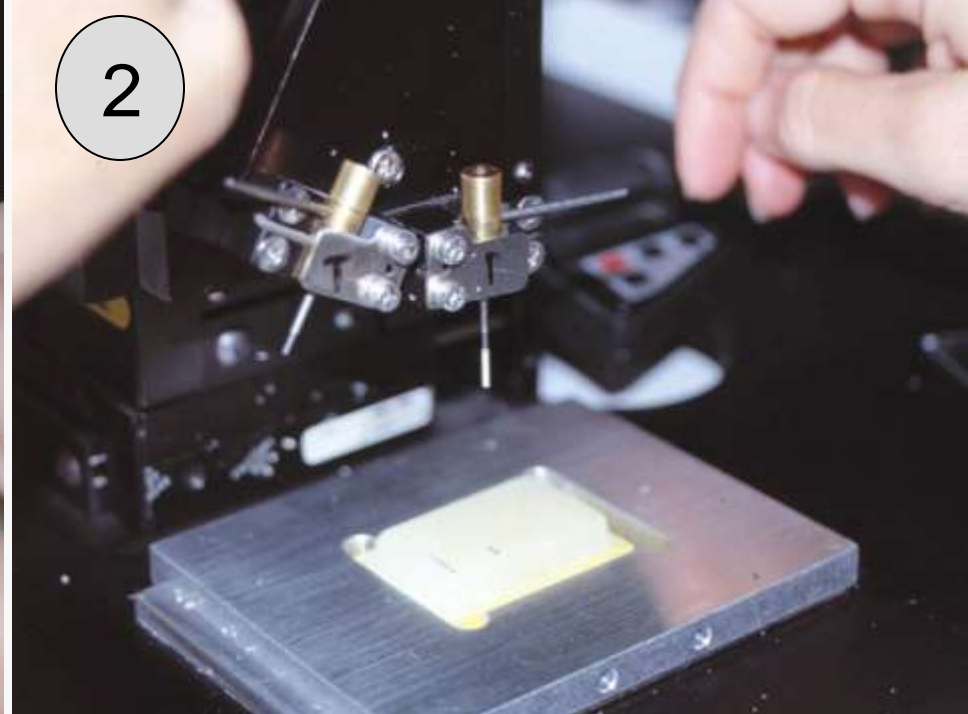


ZARAGOZA

TISSUE MICROARRAYS

Técnica que permite evaluar de una sola vez centenares de muestras de tejido, tanto sus características inmunohistoquímicas como moleculares: FISH.





TISSUE MICROARRAYS



TISSUE MICROARRAYS:

VENTAJAS:

- Metodología estandarizada en cientos de muestras.
- FISH
- Estudios en archivos históricos de muestras.

ZARAGOZA

TISSUE MICROARRAYS:

VENTAJAS:

- Metodología estandarizada en cientos de muestras.
- FISH
- Estudios en archivos históricos de muestras.

INCONVENIENTES:

- Muy laboriosa.
- Dudas sobre representatividad de la lesión: tumores genéticamente heterogéneos.

TISSUE MICROARRAYS:

APLICACIONES:

TMA:

1. **CONVENCIONALES:** Estudio de anticuerpos.
2. **PROGRESIÓN:** Alteraciones en distintas fases de un tumor.
3. **MULTITUMOR:** Nuevos biomarcadores.
4. **PRONÓSTICO:** Marcadores pronóstico.
5. **EXPERIMENTALES:** Selección de líneas celulares.

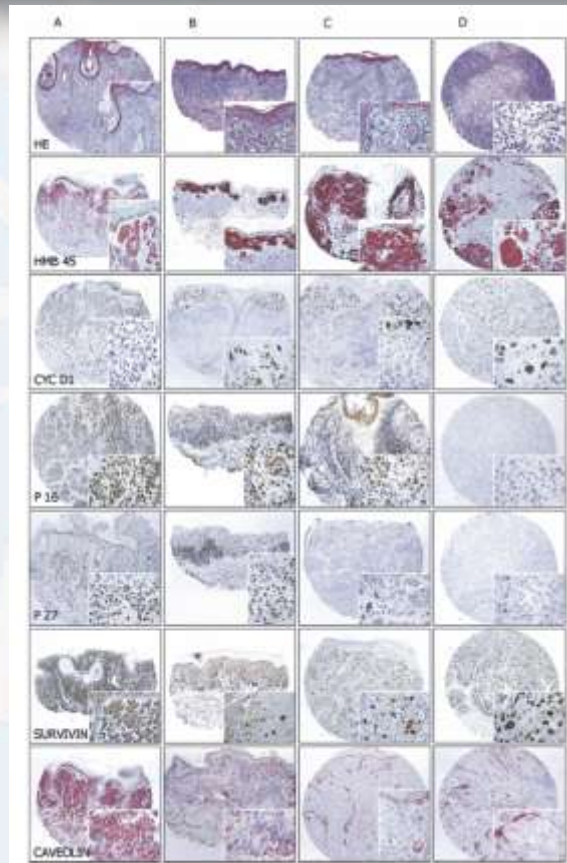
TISSUE MICROARRAYS

Progression in Cutaneous Malignant Melanoma Is Associated with Distinct Expression Profiles

A Tissue Microarray-Based Study

Soledad R. Alonso,* Pablo Ortiz,[†] Marina Pollán,[‡]
Beatriz Pérez-Gómez,[‡] Lydia Sánchez,[§]
M^a Jesús Acuña,[§] Raquel Pajares,[§]
Francisco J. Martínez-Tello,[¶] Carlos M. Hortelano,^{||}
Miguel A. Piris,* and José L. Rodríguez-Peralto[¶]

Am J Pathol 2004, 164:193–203



TISSUE MICROARRAYS

175 casos x **39 anticuerpos**

CONVENCIONAL

TMA



**6825
PREPARACIONES**



Ahorro 99,5%



**39
PREPARACIONES**

TISSUE MICROARRAYS

Immunohistochemical expression of cyclin-dependent kinase-2 in psoriasis

Á. SANTOS-BRIZ

M. RONCERO*

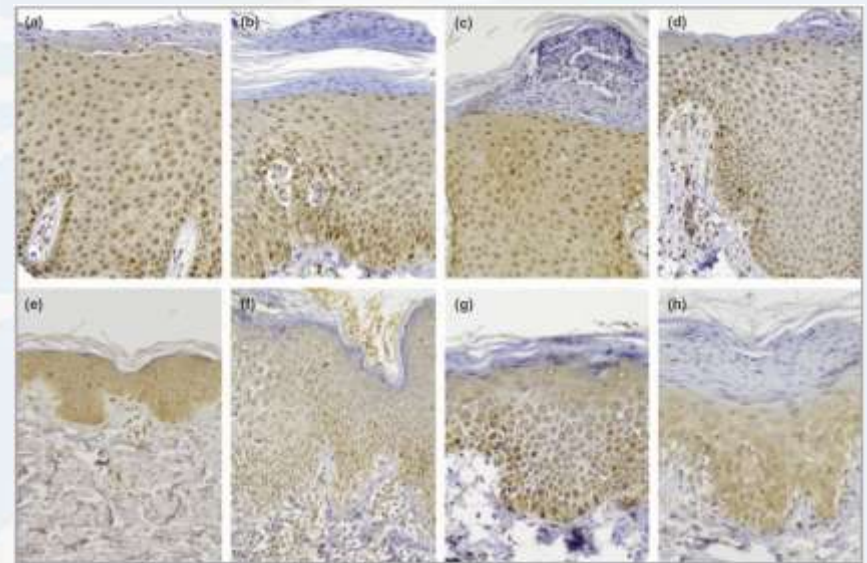
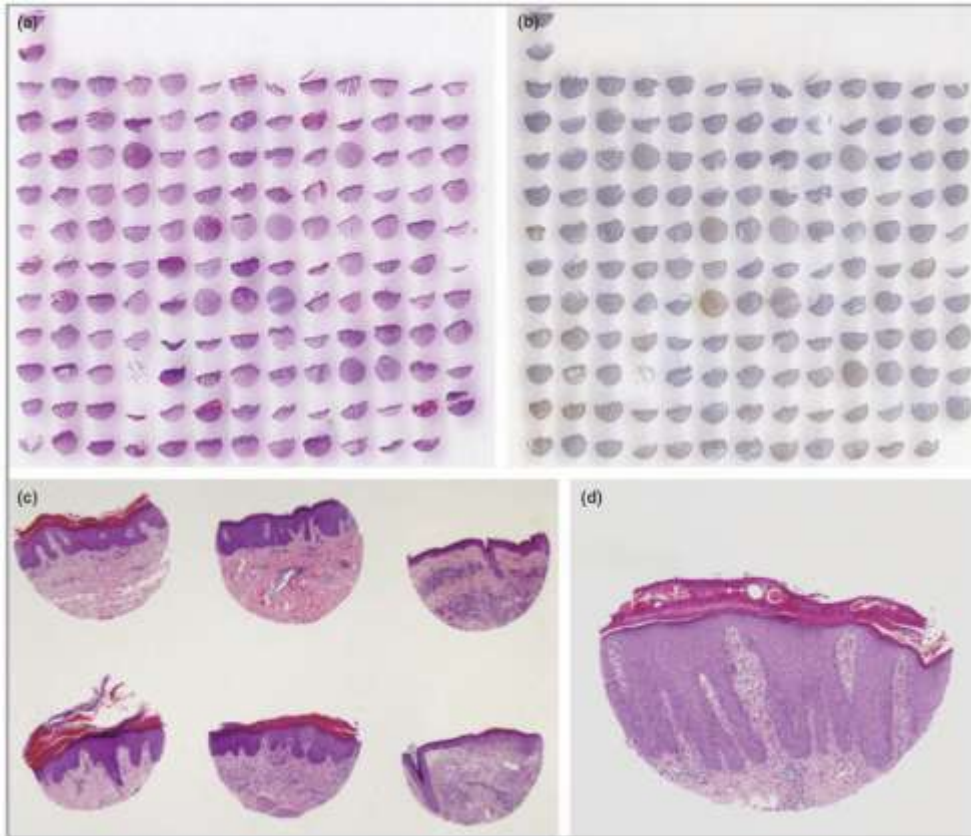
P. ANTÚNEZ

E. FERNÁNDEZ-LÓPEZ*

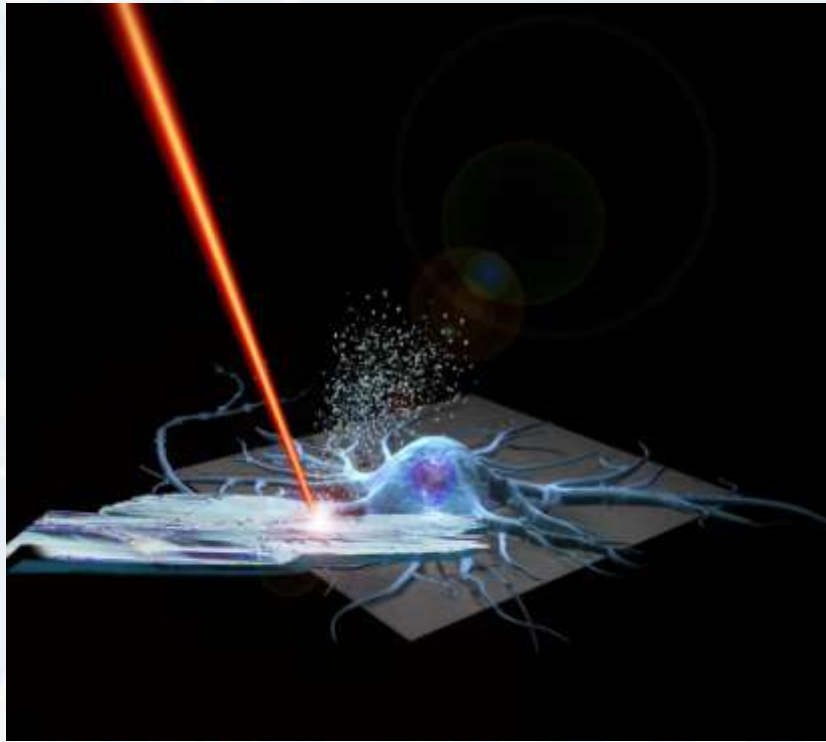
A. BULLON

P. UNAMUNO*

British Journal of Dermatology 2009 161, pp691–720



MICRODISECCIÓN



MICRODISECCIÓN:

- Método no molecular para seleccionar células morfológicamente diferentes en muestras heterogéneas.
- Microscopio óptico con láser.

Microdissection Techniques for Molecular Testing in Surgical Pathology

Jennifer L. Hunt, MD; Sydney D. Finkelstein, MD

Arch Pathol Lab Med. 2004;128:1372-1378

MICRODISECCIÓN:

TIPOS:

a) **Captura con láser infrarrojo**: funde una membrana termoplástica pegada al tejido

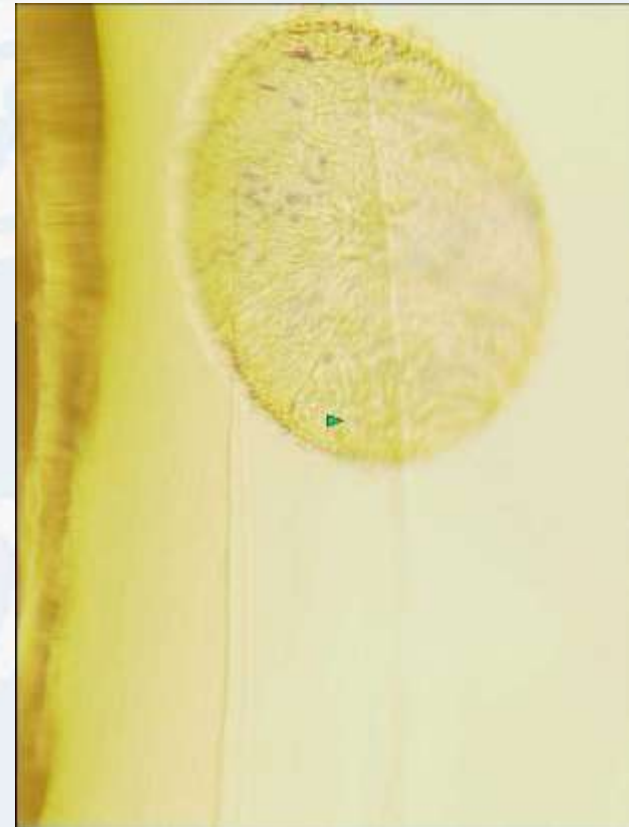
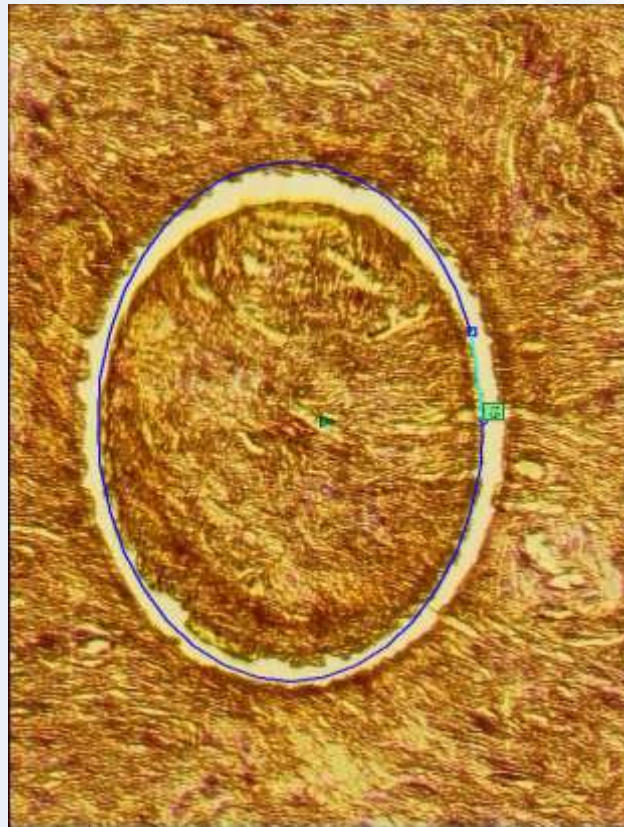


180.000 €

MICRODISECCIÓN:

b) Microdissección por corte con **láser ultravioleta que corta el tejido.**

En algunos modelos el propio laser lo catapulta a tubos de colección.



MICRODISECCIÓN:

VENTAJAS:

- Seleccionar células de muestras heterogéneas
- Rápida y precisa
- Material parafinado
- Estudios DNA, RNA, proteínas

2011

ZARAGOZA

MICRODISECCIÓN:

VENTAJAS:

- Seleccionar células de muestras heterogéneas
- Rápida y precisa
- Material parafinado
- Estudios DNA, RNA, proteínas

INCONVENIENTES:

- Técnica muy cara
- Muy laboriosa
- Imprescindible que el patólogo esté presente para seleccionar el material
- Dificultad de identificar células

MICRODISECCIÓN:

APLICACIONES:

Investigación: +++

Aislar células de melanoma sobre nevus

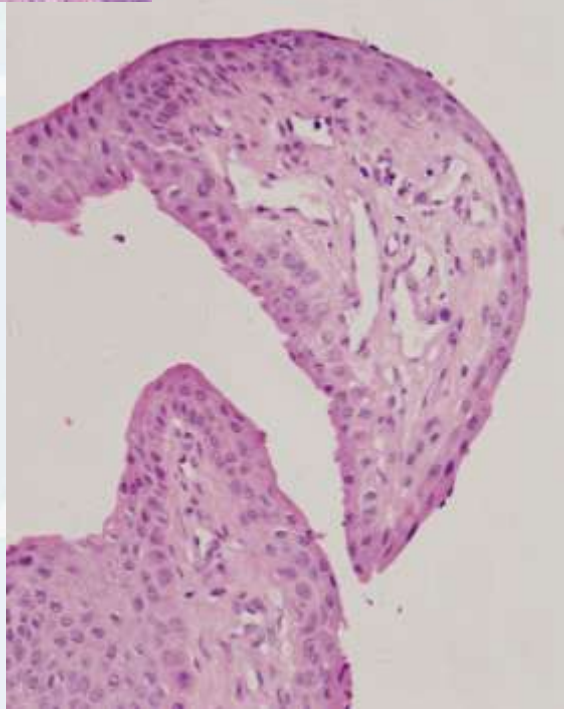
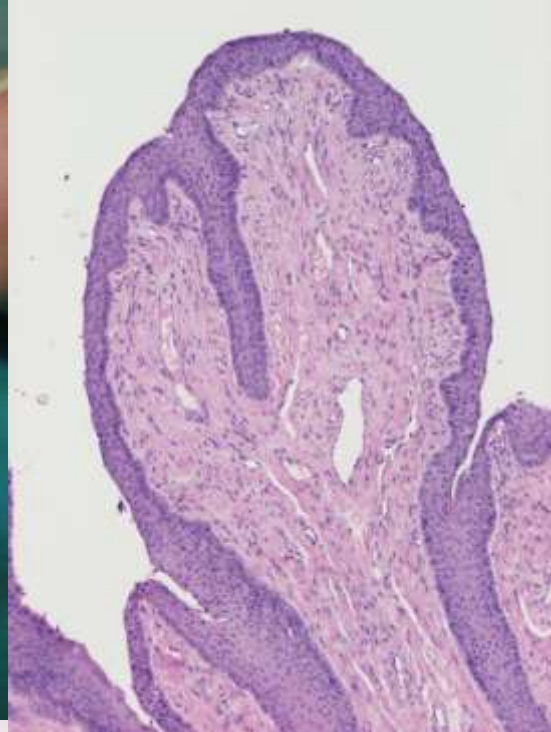
Proliferative Nodules Arising Within Congenital Melanocytic Nevi: A Histologic, Immunohistochemical, and Molecular Analyses of 43 Cases

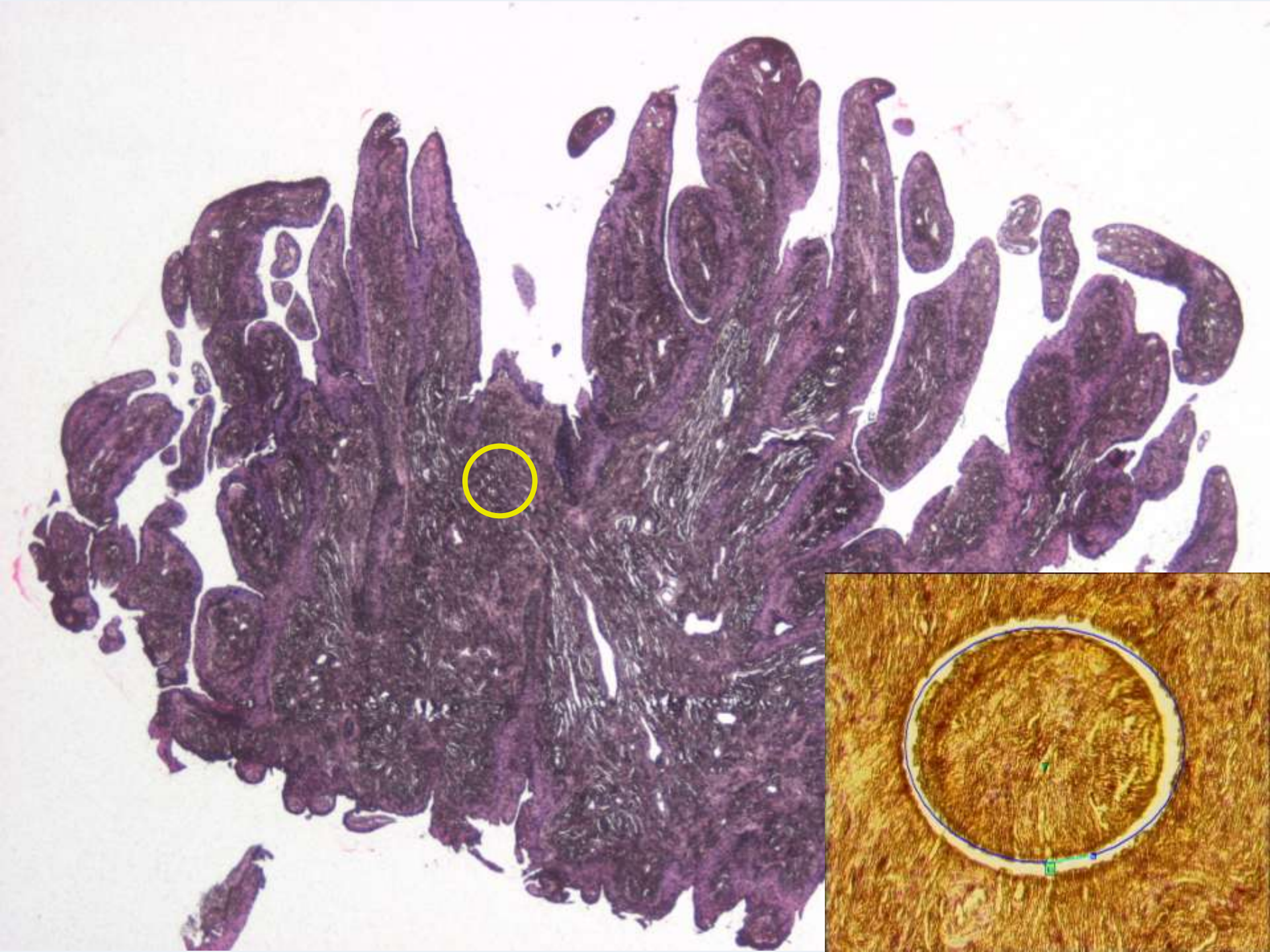
Pushkar A. Phadke, MD, PhD, Dinesh Rakheja, MD,† Long P. Le, MD, PhD,*
Maria Angelica Selim, MD,‡ Payal Kapur, MD,† Amy Davis, BS,† Martin C. Mihm, Jr, MD,*
and Mai P. Hoang, MD**

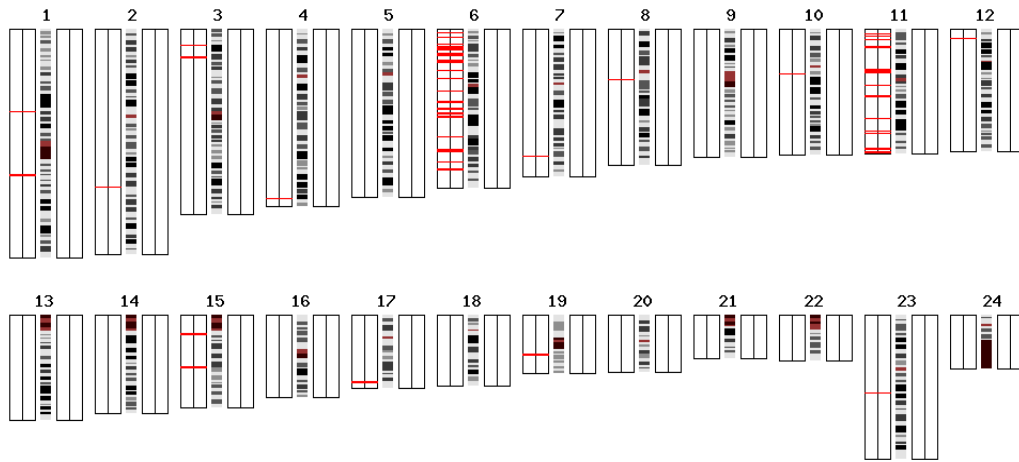
Am J Surg Pathol • Volume 35, Number 5, May 2011

Tumores heterogéneos (papulosis linfomatoide).

Asistencia: -

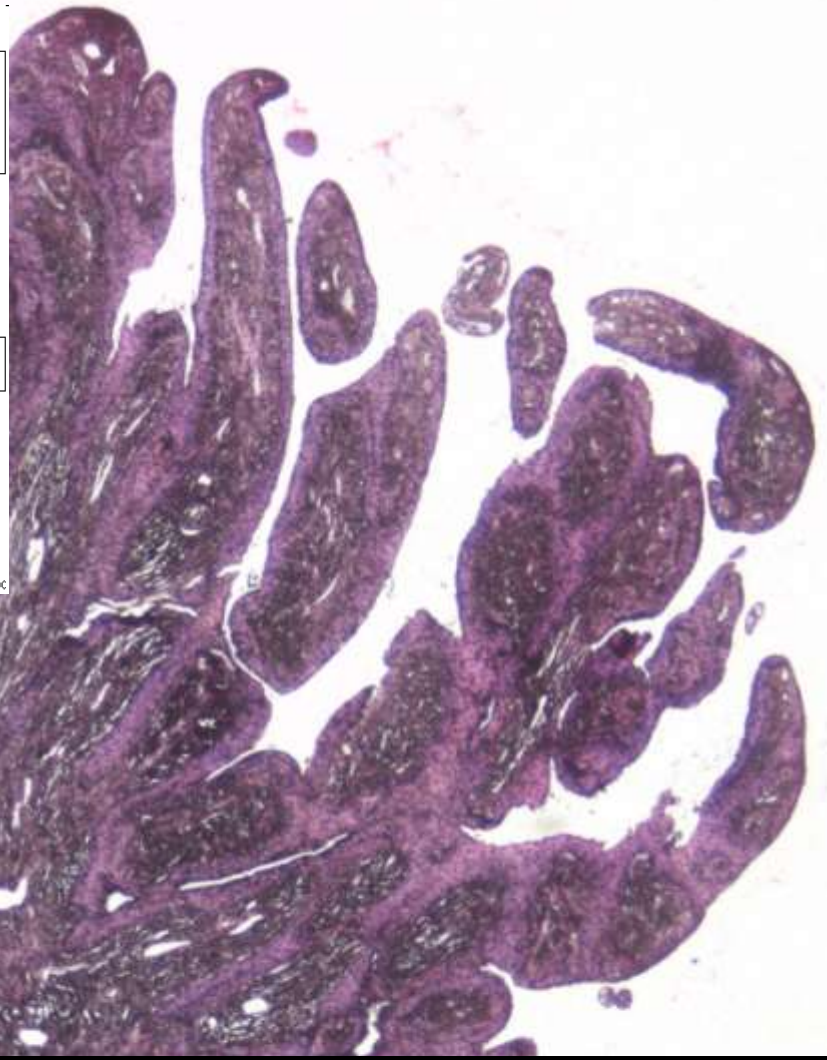






[1] AW-3: p-38: no sample, no test label - no sample, no control label

The Dresden Build - v4.1.4 29.10.20c



Onychomatricoma: Genome-wide analyses of a rare nail matrix tumor

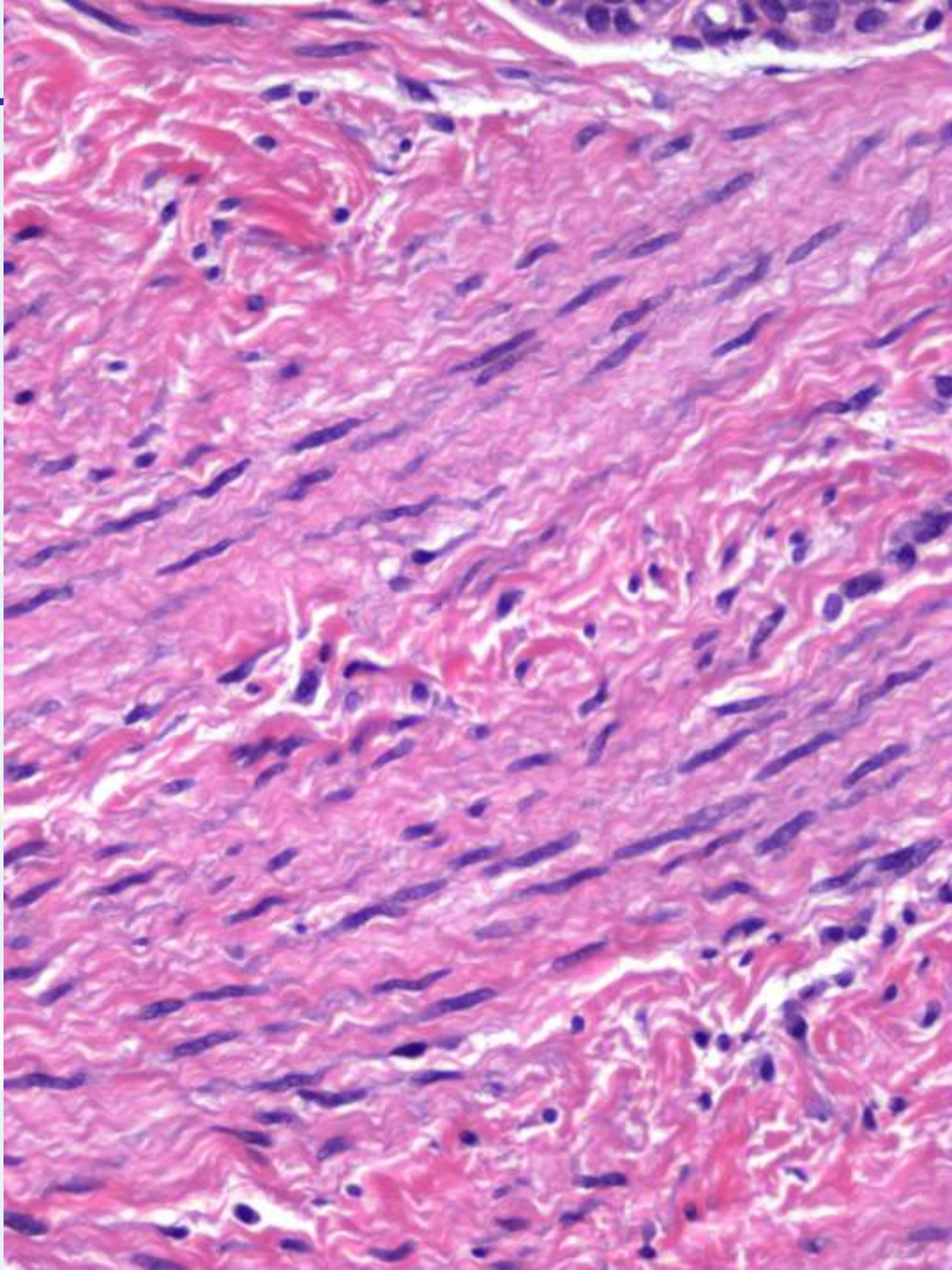
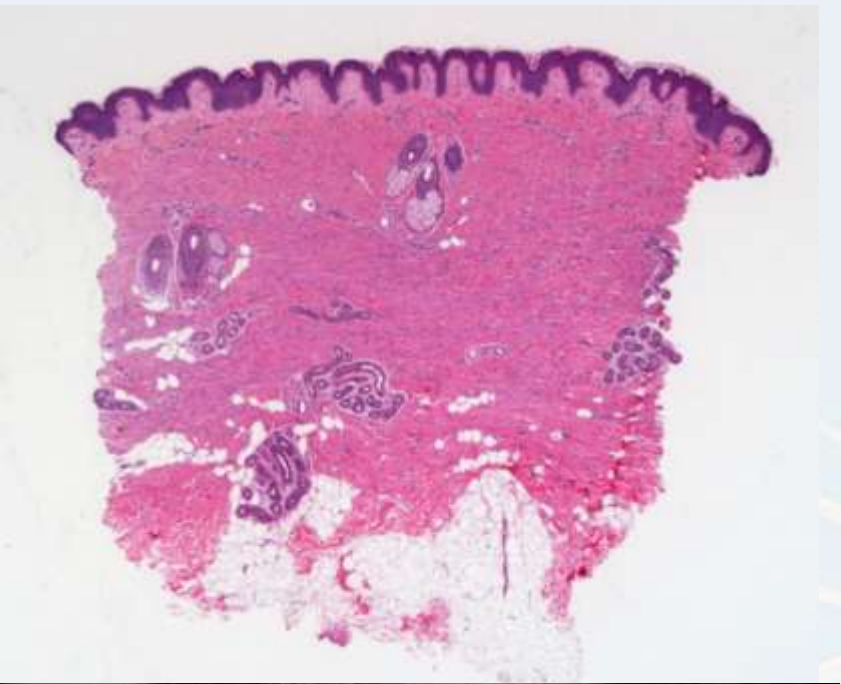
Javier Cañueto, MD,^a Ángel Santos-Briz, MD, PhD,^b Juan Luis García, MD, PhD,^c Cristina Robledo, PhD,^c and Pablo Unamuno, MD^a
Salamanca, Spain

MICRODISECCIÓN:

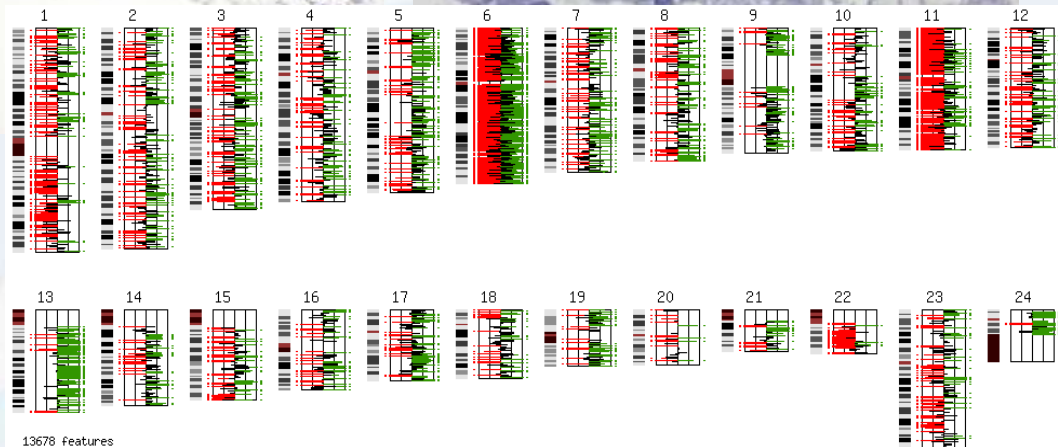
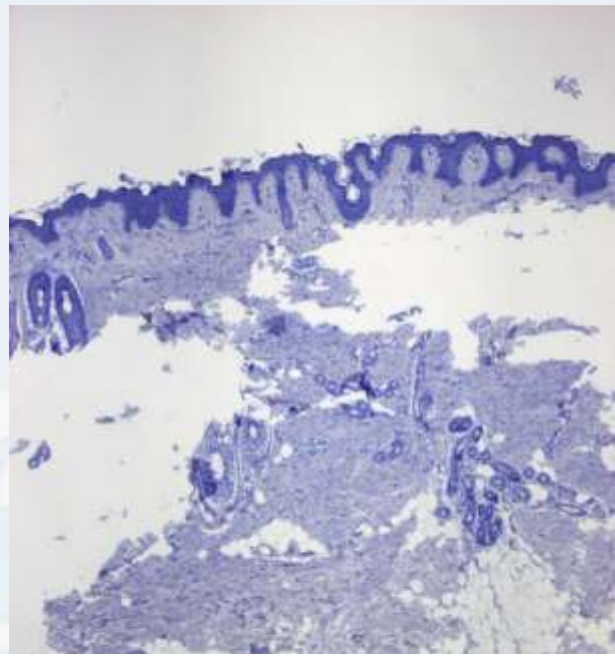
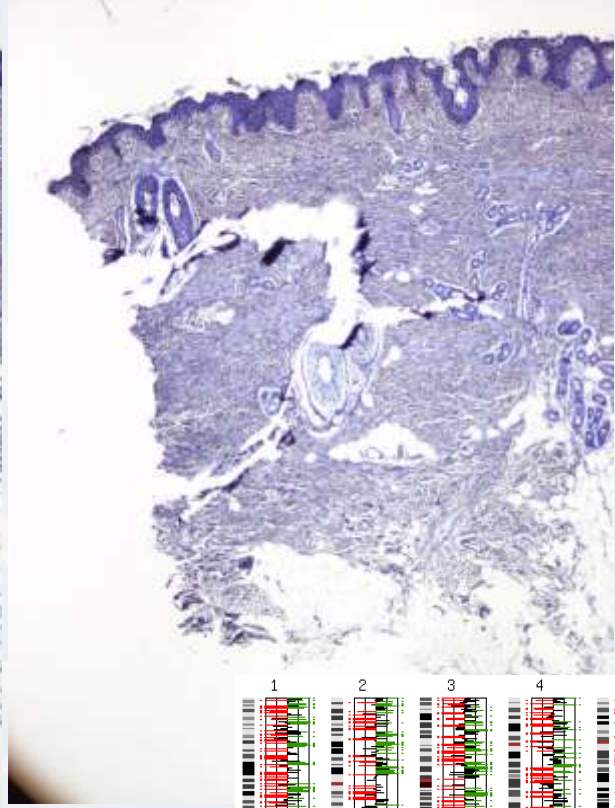
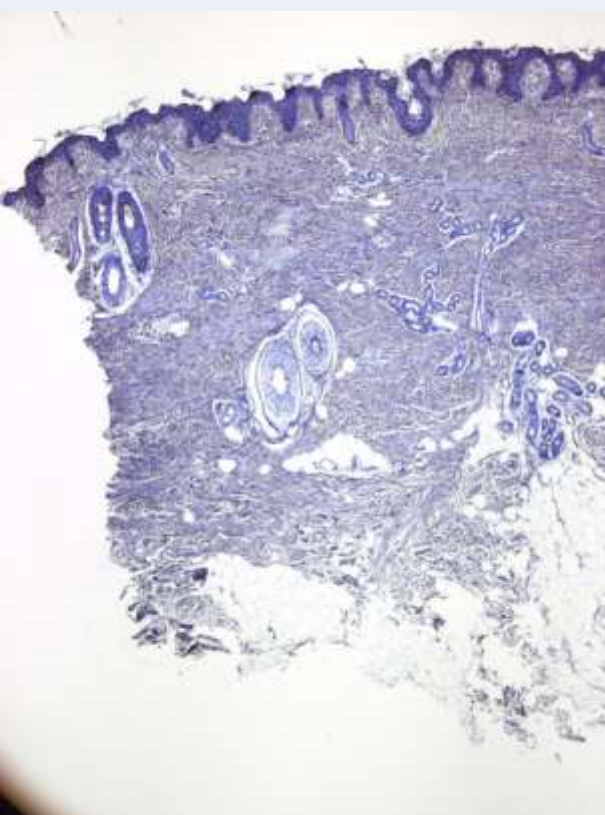
MANUAL CON AGUJA.



DERMATOMIOFIBROMA



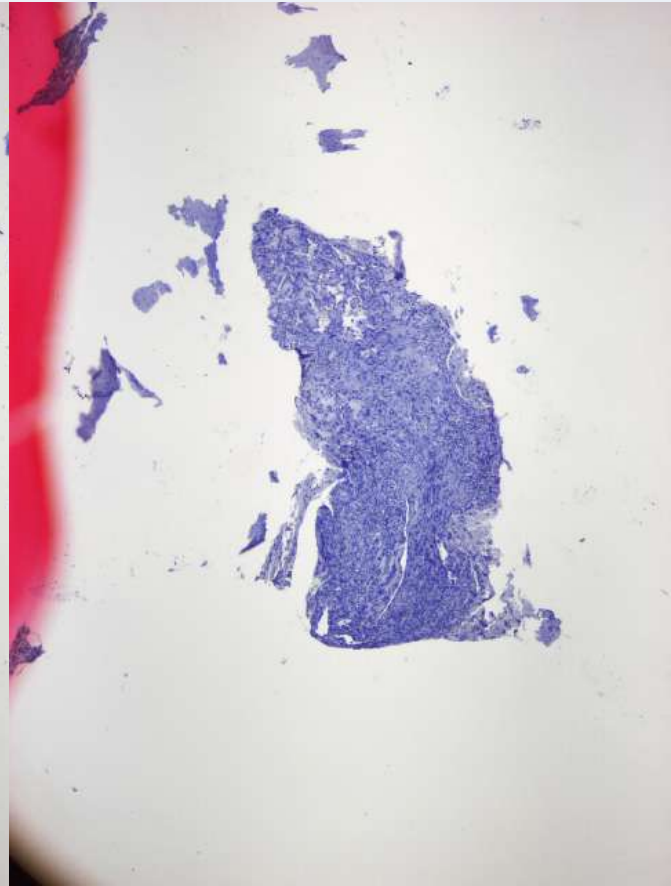
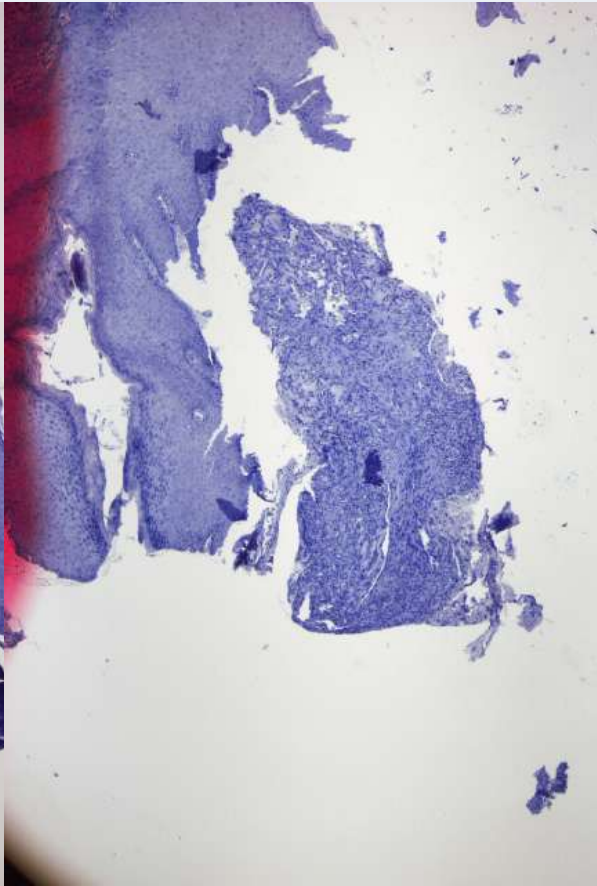
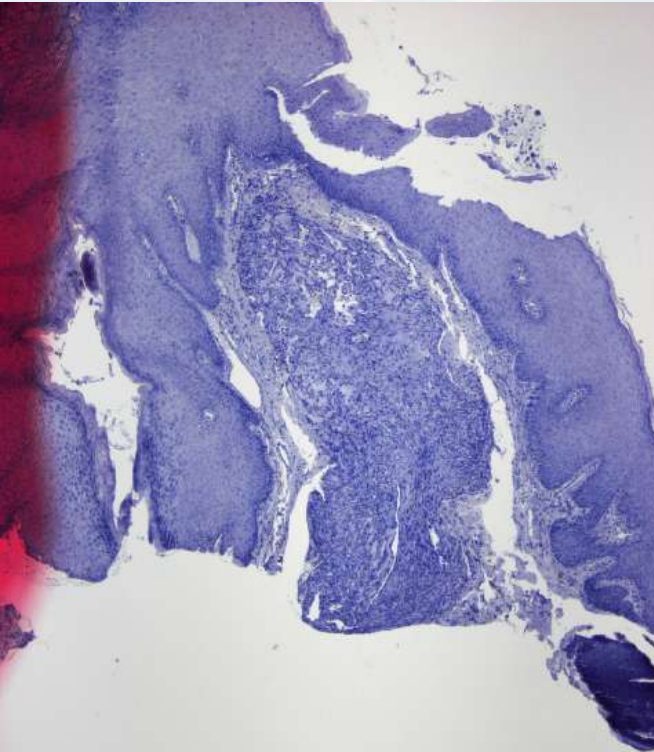
DERMATOMIOFIBROMA



13678 Features
13678 unFlagged Features
5276 reporters
5276 unFlagged reporters

[1] AW-2: p-39: no sample, no test label - no sample, no control label

NÓDULO ANGIOMATOSO EPITELIOIDE:

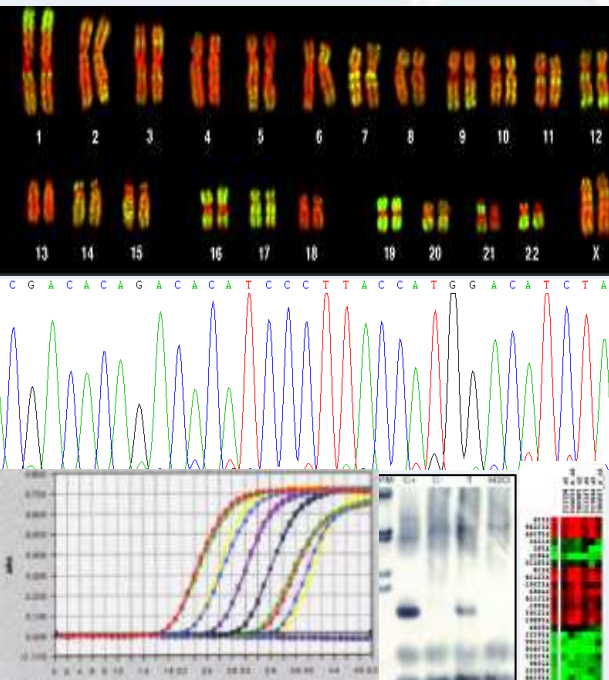


LAMAGUZA

DIAGNÓSTICO MOLECULAR:

ANATOMÍA PATOLÓGICA: MÉTODOS MOLECULARES:

- Campo intimidatorio
- Recursos limitados
- Sobrecarga de trabajo





Necesaria participación activa del patólogo en técnicas moleculares

SI EL PATÓLOGO NO PARTICIPA EN B. MOLECULAR:

1.- Alguien lo hará: riesgo de perder control de los especímenes quirúrgicos.

2011

ZARAGOZA

SI EL PATÓLOGO NO PARTICIPA EN B. MOLECULAR:

- 1.- Alguien lo hará: riesgo de perder control de los especímenes quirúrgicos.
- 2.- Se **perderá posición estratégica** de AP entre la clínica y la etiopatogenia de la enfermedad.

ZARAGOZA

SI EL PATÓLOGO NO PARTICIPA EN B. MOLECULAR:

- 1.- Alguien lo hará: riesgo de perder control de los especímenes quirúrgicos.
- 2.- Se perderá posición estratégica de AP entre la clínica y la etiopatogenia de la enfermedad.
- 3.- **Perderemos financiación:** Diagnóstico molecular: área de crecimiento rápido con grandes presupuestos.

ZARAGOZA

DIAGNÓSTICO MOLECULAR:

Participación activa del patólogo en técnicas moleculares

- Pequeños laboratorios

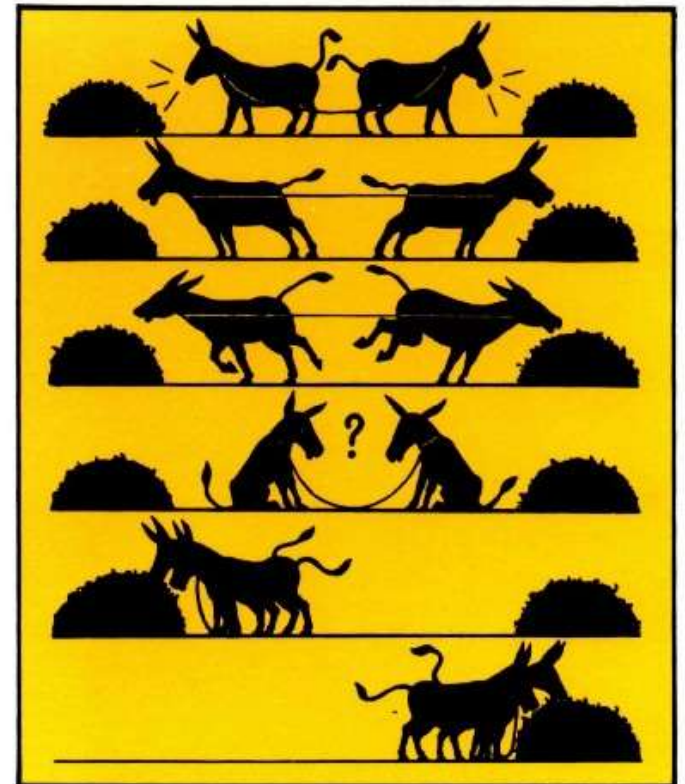


DIAGNÓSTICO MOLECULAR:

Participación activa del patólogo en técnicas moleculares

- Pequeños laboratorios
- Colaboración:
 - Otros servicios
 - Centros de referencia
 - Centros de investigación

CO-OPERATION



IS BETTER THAN CONFLICT

DIAGNÓSTICO MOLECULAR:

ANATOMÍA PATOLÓGICA:

Dra. MD Ludeña

Dr. O. Bengoechea

Dra. P. Antunez

Dra. MC García Macias

Dra. T. Flores

Dra. M Abad

Srta. Sonia López

Srta. M^a Carmen

Srta. E. Moyano

HEMATOLOGÍA:

Dr. Marcos Gonzalez

Dr. Ramón García

Dr. Norma Gutierrez

Dra. Ana Balanzategui

MICROBIOLOGÍA:

Dra. Nieves Gutierrez

DERMATOLOGÍA:

Dr. P. de Unamuno

Dr. M. Morán

Dr. J. Bravo

Dra. M. Yuste

Dra. C. Román

Dra. MT. Alonso

Dr. JC. Santos Durán

Dra. E. Fernandez.

Dra. G. Fernandez

Dra. S. Blanco

Dr. A. Romo

Dr. J. Cañueto

Sra. Rosa Rodríguez

CENTRO DE INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER:

Dr. JL. García

Dr. R. González

Dr. I. Sánchez

Dr. Jesús P. Losada