

nota de tapa

EN ARGENTINA:



DE IZQ. A DER. MARÍA MUHLMANN - MARIELA NIEVES - DAVID MARAÑÓN - ALEJANDRO LAUDICINA
Laboratorio de Citogenética Molecular - Centro Atómico Constituyentes - Comisión Nacional de Energía Atómica

BIOTECNOLOGÍA

EN EL DIAGNÓSTICO CITOGENÉTICO

Investigación y desarrollo de reactivos de diagnóstico (sondas) para realizar estudios de la estructura cromosómica por medio de la técnica de FISH (Hibridación In Situ Fluorescente)



LAS IDEAS QUE ME LLEVARON A REALIZAR LAS TAREAS EN LAS QUE ESTAMOS TRABAJANDO COMENZARON DESDE MI REGRESO AL PAÍS HACE SIETE AÑOS, DESPUÉS DE HABER VIVIDO CATORCE EN EEUU REALIZANDO INVESTIGACIÓN BÁSICA. EN ESE MOMENTO CONSIDERÉ QUE CON ESTE ENFOQUE PODRÍA APORTAR MÁS A LA SOCIEDAD EN LA CUAL ESTOY INMERSA.

Dra. Maria Muhlmann

Ph. D. Investigadora CONICET
Dirección Científica y Técnica del
Laboratorio de Citogenética Molecular. CNEA

Doctorandos participantes:



Lic. Alejandro Laudicina



Lic. David Marañon



Lic. Mariela Nieves

En nuestro Laboratorio de Citogenética Molecular desempeñamos tres tipos de tareas:

SERVICIOS

Diagnóstico y pronóstico por citogenética molecular. Genética constitutiva (hereditaria) y somática (cáncer)

DESARROLLO

Síntesis de sondas para Citogenética Molecular (Fluorescence in situ hybridization, FISH) para distintas especies. (Hasta el presente: humanos, primates, peces, reptiles)

INVESTIGACIÓN

TÉCNICA:

* Sondas para FISH por microdissección de cromosomas y por BAC (Bacterial artificial chromosome).

* Sondas monocatenarias unidireccionales para detectar inversiones.

CIENTÍFICA:

Distintas áreas de Radiobiología. Influencia de la compactación cromatinica en el Daño y Reparación de ADN por radiación Ionizante.

Antecedentes

La gran mayoría del material genético de un individuo se encuentra en el núcleo celular constituyendo los denominados cromosomas.

El estudio de los cromosomas y su comportamiento en la división celular en relación a la patología, es el objeto de la Citogenética médica. Esta disciplina es más reciente que la Genética Humana, ya que recién en 1956 fue determinado el número normal de cromosomas y en 1959 se describió la primera anomalía cromosómica humana.

Es a partir de entonces que la Citogenética se constituyó en un campo propio de estudio dentro de la Genética médica, especialmente mediante el uso de técnicas de bandeado que permiten caracterizar zonas específicas de cada cromosoma.

Actualmente, la Citogenética usa metodologías derivadas de la Genética

Molecular. Así, desde 1984, la técnica de Hibridación In Situ Fluorescente (FISH, del inglés: Fluorescence in situ hybridization) permite la localización de secuencias específicas del ADN en una región cromosómica. De esta manera, los estudios microscópicos convergen con los estudios moleculares, complementándose mutuamente.

¿Qué es el FISH y las sondas de ADN?

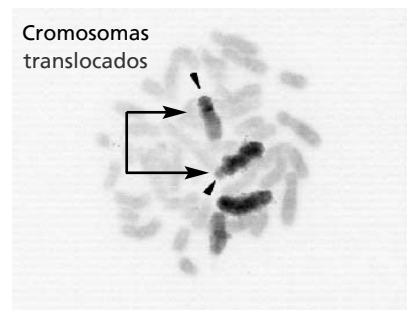
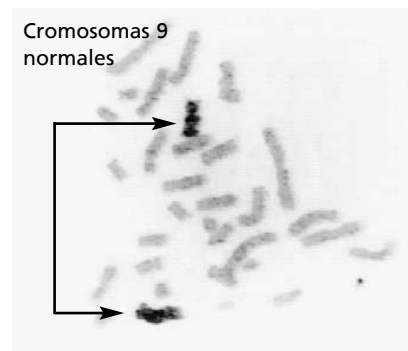
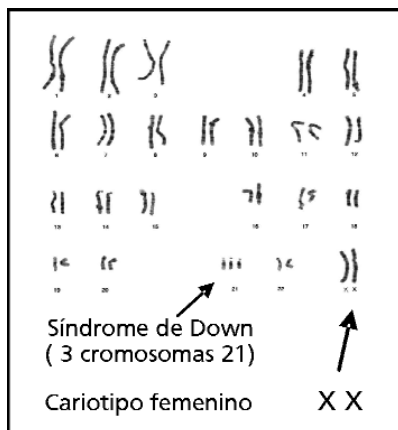
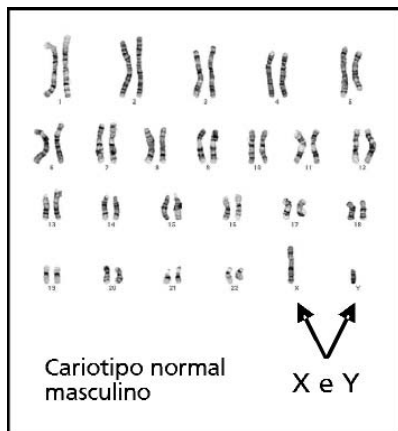
Fluorescence in situ hybridization (FISH) o hibridación fluorescente in situ, es una técnica que combina citogenética clásica con biología molecular. Con esta asociación se logra obtener la información genética manteniendo la estructura de las células o tejidos estudiados. Debido a sus características, FISH es una herramienta importante en investigación y se incrementa su uso en diagnóstico humano. Encontramos ejemplos de su aplicación en distintas áreas como: genética pre y pos-natal; diagnóstico, seguimiento y/o pronóstico en cáncer; determinaciones de anomalías en embriones de preimplantación; microbiología; radiobiología; medio ambiente y evolución.

La técnica FISH permite localizar un gen o grupos de genes (llamados "target o segmento de ADN") dentro del ADN celular. Se logra así detectar la ausencia o la presencia y/o el número de copias del segmento estudiado.

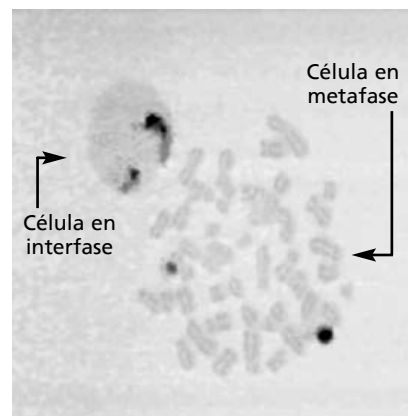
El segmento de ADN contiene un gen o grupos de genes cuya alteración por exceso, defecto o cambio de localización, dentro de los cromosomas, determina una enfermedad.

Las sondas de ADN, son los reactivos que se utilizan para localizar de forma fluorescente el target de la patología a estudiar. Las sondas no son más que fragmentos de ADN cuya secuencia es complementaria al ADN target y que están marcadas con moléculas que nos permiten la detección posterior a la hibridación.

Cada patología requiere una sonda específica, ya que involucra un gen diferente o un segmento de ADN diferente. Es decir, la técnica FISH es el procedimiento que por medio de distintas sondas permite el estudio de todas las enfermedades genéticas para las cuales hoy existe un segmento de ADN identificado. Esto permite que la técnica de FISH sea aplicable a una gran variedad de determinaciones que diagnostican y/o estudian distintas patologías. A su vez nos mantiene ocupados en



Cromosoma 9 translocado con cromosoma 3



el laboratorio elaborando continuamente nuevas sondas para distintos genes o fragmentos cromosómicos.

¿Cuál es el aporte más importante de esta técnica?

La células atraviesan distintas fases durante su ciclo. Groseamente éstas son interfase (preparación para la división) o metafase (proceso de división). En la metafase las células condensan su ADN en cromosomas de modo tal que puedan distribuirlos igualmente en las células hijas. Es aquí donde la citogenética clásica puede estudiar la estructura cromosómica, ya que aparecen como estructuras discretas. Algunas células cuando maduran ya no se dividen, por lo tanto permanecen en interfase, etapa en la que no podemos observar los cromosomas típicos de una célula en metafase.

Previo al desarrollo de esta técnica, solamente se podían analizar células que estuvieran en metafase. Ya que en un núcleo en interfase era imposible clasificar una célula citogenéticamente.

La técnica FISH, hoy, nos permite localizar determinados genes, sospechados de estar alterados según la enfermedad y calificarlos dentro de la célula de interfase.

De este modo logramos obtener información que en épocas anteriores permanecía totalmente oculta.

Las indicaciones para esta técnica son variadas según las áreas de salud.

Algunos ejemplos son descriptos brevemente a continuación

ONCOLOGÍA

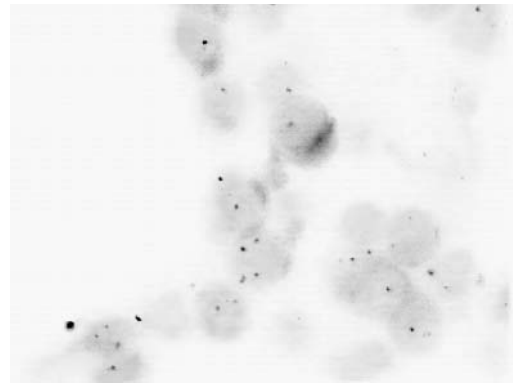
Caracterización de cáncer de mama.

En estos casos además de los típicos marcadores se debe estudiar si existe una amplificación de un oncogen llamado Her2/neu o erb-c.

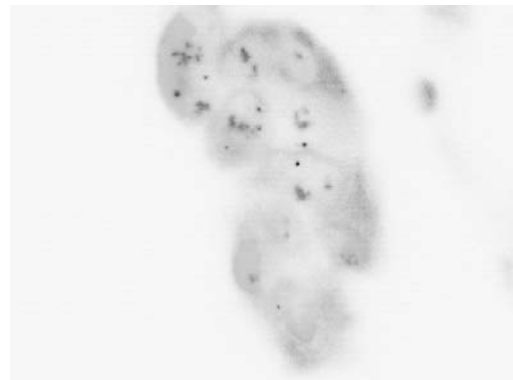
Este gen fue identificado en sus principios como un oncogen que aparece en tumores neuronales inducidos en rata. El homólogo humano codifica un receptor transmembránico de un factor de crecimiento emparentado al factor de crecimiento epidermal. Existen evidencias de que el Her2/neu inhibe la apoptosis de las células en el tumor, modificando el equilibrio "crecimiento-muerte" hacia la proliferación celular.

Las primeras observaciones que correlacionaron la sobre-expresión del Her2/neu con un mal pronóstico fueron realizadas en 1997. La sobre-expresión del Her2/neu en modelos de transfección descubre varios fenotipos del tumor, incluyendo mayor agresividad, invasividad y potencial metastásico. También está alterada la respuesta a la te-rapia hormonal y a los agentes citotóxicos.

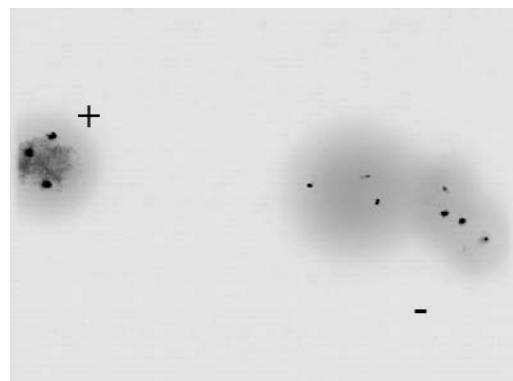
Como marcado predictivo su amplificación es un parámetro que ayuda a seleccionar a los pacientes que se beneficiarían con el uso de terapias alternativas.



Tejido cáncer de mama
sin amplificación del her 2-neu



Tejido cáncer de mama
con amplificación del her 2-neu



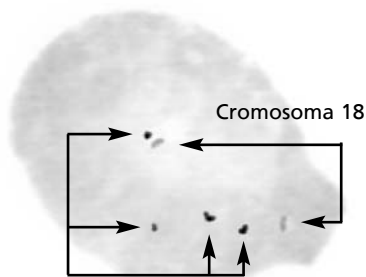
Célula positiva: dos sondas superpuestas
Célula negativa: cuatro señales separadas

En estas muestras es donde se toma ventaja de la posibilidad cuantificar estos oncogenes en células que no están en división, es decir células en interfase.

Otros ejemplo clásico se presenta en el seguimiento de Leucemia Mieloide Crónica. Para esto se utilizan dos sondas combinadas. Una es

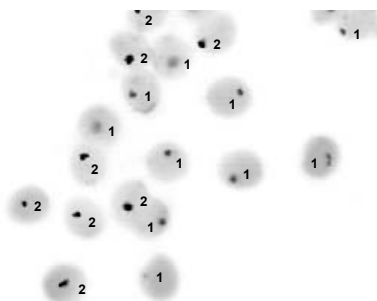


Síndrome de Williams:
Microdelección del gen de Elastina en un cromosoma 7 (señal roja)



Cromosomas 21-13

Blastómera biopsiada de un embrión in vitro con señales normales para cromosoma 18 (señales rojas) y 21-13 (señales verdes)



Espermatozoides:
1: cromosoma X
2: cromosoma Y

el protooncogen c-abl localizado en el cromosoma 9 y el otro el BCR localizado en el cromosoma 22. Cuando una translocación ocurre se forma el cromosoma Filadelfia.

En este caso se necesita una estadística importante para poder observar si el número de células con el cromosoma Filadelfia, aumentan o disminuyen en respuesta al tratamiento.

GENÉTICA

En alteraciones genética es importante poder discernir entre distintos síndromes a modo de poder tratar al paciente de forma específica, además de poder dar un soporte y por caso, aconsejar adecuadamente a los progenitores sobre riesgos futuros.

FERTILIDAD ASISTIDA

En problemas de esterilidad y tratamientos de fertilidad asistida, nos abre la posibilidad de estudiar una única célula y determinar si existe una anomalía cromosómica específica. Tal es el caso de una translocación balanceada o normal de una no balanceada en un blastomera.

También nos permite estudiar la proporción de espermatozoides cromosómicamente anormales en paciente con problemas para determinar la posibilidad de concebir un bebe normal u afectado.

IMPACTO SOCIAL

El trabajo en citogenética molecular da al operador una oportunidad única de apreciar un tipo de "arte", que se observa directamente bajo en el microscopio y que no está al alcance de todos. Sin embargo, en el área de la salud, la utilidad que la citogenética molecular provee, sí, debería estar al alcance de todos. Este no es el caso del presente. Las sondas para FISH (reactivos básicos necesarios para citogenética molecular) se deben importar a altísimos costos. Una producción bajo un buen control de calidad debe lograr la integración multidisciplinaria para crear una nueva industria y, al mismo tiempo, colaborar a resolver muchos de los problemas en salud.

La hibridación in situ mediante fluorescencia representa dentro del campo de la Genética Médica un paso más hacia adelante en cuanto a técnicas diagnósticas. Es de suma importancia que estas técnicas recientes sean implementadas rápidamente en nuestro país dada su importancia en el estudio de enfermedades genéticas y del cáncer.

Una apreciación inapropiada lleva a concluir que la producción de kits diagnósticos por biotecnología no juega un papel tan importante como la aplicación biotecnológica en agricultura o productos medicinales, pero en salud sabemos que el buen diagnóstico es igualmente necesario.

Un ejemplo típico es el estudio de este oncogen Her 2-neu mencionado más arriba. Este gen se encuentra amplificado en un 25 a 30 % de las pacientes afectadas modificando su respuesta a los tratamientos clásicos. Anualmente un 1% de las mujeres es diagnosticada con cáncer de mama. Debido a la gran diferencia que implica el tratamiento a seguir si tiene o no amplificado el oncogen Her2neu, las ventajas de dar un correcto diagnóstico y por ende un correcto tratamiento sobrepasa ampliamente al costo de la determinación. Sin embargo, muchas obras sociales o pre-pagas no toman conciencia de la importancia social y económica que significa esta determinación. Ya que el correcto diagnóstico, no sólo salva vidas sino que concluye siendo menos costoso que tratamientos equívocos y paliativos. Nosotros estamos trabajando en la síntesis de esta sonda para reemplazar las importa-

das, de modo de hacer el estudio accesible a la mayor cantidad de pacientes.

Otros métodos de determinación del Her-2/neu (ELISA y IHC) han demostrado tener un alto porcentaje de falsos positivos y falsos negativos (aprox. 20%). Estos falsos resultados pueden conducir a una decisión terapéutica, equívoca constituyendo un perjuicio importante de salud para la paciente y económico tanto para la paciente como para los seguros médicos.

La enumeración del Her-2/neu por el método de FISH ha sido aprobada por el FDA en EEUU y es el método de elección de los estudios más importantes del gen en cuestión. Actualmente esta técnica se conoce bien en el ambiente médico argentino, pero el costo de las sondas importadas es excesivo para los presupuestos generales. Es por eso que nuestro proyecto incluye la síntesis de las sondas en el país.

Las sondas son sintetizadas de distintos modos de acuerdo a las áreas del cromosoma que se requiere cubrir. La descripción detallada sería material para otro artículo por lo que me limitaré a mencionarlas brevemente:

- Para sondas de pintado total o parcial de cromosomas

utilizamos la técnica de microdissección de cromosomas

- Para sondas de satélites marcadores de cromosomas, utilizamos cebadores específicos en la técnica de PCR.

- Para sondas de genes específicos utilizamos la técnica de BAC's.

Una combinación de las tres anteriores se utiliza para el desarrollo de las sondas monocatenarias unidireccionales para detectar inversiones.

En definitiva la filosofía de nuestro proyecto busca esencialmente lograr un doble efecto a nivel país, uno social, que consiste en elevar el nivel de salud de la población bajando los costos para lograrlo, y uno económico, ya que los productos se dejarán de importar (ahorro), se producirían internamente (creación de valor + trabajo local) y se exportarán (mayor ingreso de divisas). Como beneficio adicional, también es importante destacar este emprendimiento como modelo para otros muchos casos de desarrollos científicos con posibilidades de comercialización, dándole así oportunidad, a los investigadores, de desarrollarse en su país y al país de no perderlos.

Agradecimientos

Estos trabajos se llevan a cabo gracias a subsidios adjudicados por concursos de la SECYT (Secretaría de Ciencia y Tecnología)

Bibliografía general

- Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. Proceedings of the National Academy of Science, USA 83 : 2934-2938. Pinkel, D.; T. Straume; J.W. Gray (1986).
- Cancer Cytogenetics. Methods and Protocols. Humana Press 2003. Edited by John Swansbury ISBN: 1-58829-080-8.
- Molecular Cytogenetics In Metaphase And Interphase Cells For Cancer And Genetic Research, Diagnosis And Prognosis. Application In Tissues Sections And Cell Suspensions. María Muhlmann Review, Genetics and Molecular Research 1 (2002) 117-127. Revista On-line.
- Assessment of Her2-neu overexpression and/or gene amplification in breast carcinomas. Should in situ hybridization be the method of choice?. Sauer, T et al. 2003 APMIS 111:444-450.
- Plan Nacional Plurianual de Ciencia y Tecnología 1999-2001. El documento N 5 de la Secretaría de Ciencia y Tecnología, Anexo IX. Diciembre de 1997.
- Addition of Herceptin® (humanized anti-HER2 antibody) to first line chemotherapy for HER2 overexpressing metastatic breast cancer (HER2+MBC) markedly increases anticancer activity: a randomized multinational controlled phase III trial. Proc Am Soc Clin Oncol. 1998;17:98A. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al.
- Application of 5'Bromo-2' deoxyuridine as a Label for in situ Hybridization in Chromosome Microdissection and Painting and 3' OH DNA end labeling for Apoptosis. (1996) María C. Mühlmann-Díaz, Robert G. Dullea, Joel S. Bedford. Biotechniques, 21:82-86.

nota del editor

En el original de autor, las imágenes de este artículo son a color.