

Impacto de las nuevas técnicas de biología molecular en el diagnóstico endocrinológico

J. ORIOLA

Servei d'Hormonologia. Hospital Clínic i Universitari. Barcelona.

En los años sesenta, el desarrollo del radioinmunoanálisis dio lugar a un gran avance en muchos campos de la medicina, y en especial de la endocrinología, ya que facilitó en gran medida la valoración de hormonas en suero. Este avance repercutió en diferentes ámbitos, como el básico, el diagnóstico y el terapéutico. El siguiente empuje empezó a principios de los años ochenta cuando gracias al desarrollo de las técnicas de biología molecular se empezaron a conocer diferentes genes, entre ellos los involucrados en enfermedades endocrinas hereditarias. La mayoría de éstos se descubrieron en la década de los noventa. En la actualidad el número de enfermedades endocrinas hereditarias que se puede estudiar mediante técnicas de biología molecular es ya significativo (tabla 1). Muchas de ellas presentan herencia mendeliana (hiperplasia suprarrenal congénita, cáncer medular de tiroides familiar, MODY, etc.), otras están ligadas al sexo (síndrome de Morris, diabetes insípida nefrogénica, etc.) y algunas presentan impregnación génica (paraganglioma familiar, síndrome de Prader-Willi).

La detección de mutaciones en estos genes permite conocer mejor las causas de cada una de las enfermedades, así como confirmar su diagnóstico. Entre éstas, cabe destacar, por su importancia en el diagnóstico precoz, algunos cánceres endocrinos familiares: las neoplasias endocrinas múltiples tipos 1, 2A y 2B¹, la enfermedad de Von Hippel-Lindau², los cánceres de mama hereditarios³, etc. La búsqueda de genes aún no ha acabado. Podemos citar entre los que aún faltan por descubrir el del síndrome del hiperparatiroidismo con tumoración en la mandíbula.

El conocimiento del gen responsable de una enfermedad permite el diagnóstico molecular de la afección en el caso índice. A partir de ahí, se realiza el cribado familiar para conocer quiénes son portadores y quiénes no. En algunos casos, se puede prevenir la aparición de la enfermedad (p. ej., cáncer medular de tiroides) o paliar de manera importante sus efectos (p. ej., hiperplasia suprarrenal congénita). También permite dar un consejo genético, pues se puede conocer el riesgo de aparición de nuevos casos en la familia. Además, existe la posibilidad de realizar un diagnóstico prenatal, mediante el estudio molecular del ADN procedente de vellosidad coriónica o de líquido amniótico, lo que permite, en algunos casos, un tratamiento temprano⁴.

Mediante este tipo de diagnóstico no sólo se puede predecir, en muchos casos, quiénes van a desarrollar la enfermedad, sino en qué grado (fenotipo). Esto repercute en beneficio del paciente, pues se le puede diagnosticar y tratar antes de que desarrolle la enfermedad (importantísimo en el caso de

las neoplasias) y en según qué casos, ofrecer un tratamiento farmacológico más adecuado en relación con el fenotipo que se prevé que tendrá. De igual importancia diagnóstica cabe considerar la exclusión de los no portadores, los cuales no precisarán ningún seguimiento bioquímico, eliminando pues las molestias físicas y psíquicas que esto conlleva. El conocimiento de ambas situaciones (portador o no) repercute además en un menor coste clínico y económico. Pero quedan muchas más enfermedades endocrinas en las que el componente hereditario no es tan notorio debido a que su desarrollo depende de varios genes, por una parte, y del ambiente, por otra.

Si el presente es ya de por sí sorprendente, uno se pregunta qué nos depara el futuro o, mejor dicho, el presente inmediato. Los avances en biología molecular están lejos de acabarse⁵. En la actualidad se está produciendo otro salto significativo con el uso de los llamados *chips* o *microarrays* de ADN. Éstos son filtros, placas de silicio, cristal o plásticos de plástico, compuestos de multitud de pequeñas casillas que actúan cada una a modo de tubo de ensayo. En cada casilla hay un oligonucleótido diferente que sirve de sonda⁶. Esta metodología se está introduciendo en tres campos y los tres son de suma importancia para la endocrinología: a) cribado de mutaciones en genes; b) cribado de los polimorfismos llamados SNP (*single nucleotide polymorphisms*)⁷, y c) estudio de la expresión génica.

En el primero, el cribado facilita la detección de mutaciones, especialmente en los casos en que deben buscarse en genes muy grandes como el BRCA1 o el BRCA2, responsables del cáncer de mama/ovario familiar⁸. Con las técnicas actuales, su cribado se hace largo y tedioso.

En el segundo, el cribaje de SNP permitirá el estudio de enfermedades poligénicas como la enfermedad de Graves, la diabetes, el ovario poliquístico o la osteoporosis, entre otras y, de esta forma, se podrán asociar a unos determinados genes^{9,10}. Habrá casos en que estos SNP serán sólo marcadores de asociación y en otros serán realmente los responsables en parte de la enfermedad. En estas enfermedades sólo un porcentaje de sus manifestaciones es debido a la herencia, y esta susceptibilidad puede estar repartida entre diferentes genes, cada uno con su propia cuota de participación. Por tanto, el hecho de que un paciente presente un conjunto de polimorfismos determinado querrá decir que tiene más o menos riesgo de desarrollar una enfermedad determinada. Al igual que en las analíticas corrientes, el diagnóstico no lo da un solo valor bioquímico, y los polimorfismos aportarán un valor más en estos análisis.

Otra aplicación que se desprende del estudio de los SNP es la llamada farmacogenómica. Se sabe que hay personas que metabolizan un fármaco más rápidamente o más lentamente que otras, por lo que, en teoría, la dosis farmacológica debería ser diferente, dependiendo del individuo. El co-

Correspondencia: Dr. J. Oriola.
Servei d'Hormonologia. Hospital Clínic i Universitari.
Villarroel, 170. 08036 Barcelona.
Correo electrónico: joriola@clinic.ub.es

TABLA 1. Enfermedades endocrinológicas genéticas

| Enfermedad endocrina | Genes implicados |
|--|------------------------------|
| Deficiencias hormonales | |
| Diabetes insípida central | AVP-NPII |
| Deficiencia aislada de GH familiar tipo IA | GH1 |
| Hipoparatiroidismo | PTH |
| Síndrome de Kallmann | KAL1 |
| Deficiencias enzimáticas | |
| Hiperplasia suprarrenal congénita | CYP21, CYP11B1, CYP17, ... |
| Aldosteronismo suprimible por glucocorticoides | Híbrido CYP11B1/CYP11B2 |
| Hiperplasia suprarrenal congénita lipoidea | StAR |
| MODY 2 | Glucocinasa |
| Nesidioblastosis familiar dominante | Glucocinasa, Glut. desh. |
| Nesidioblastosis familiar recesiva | SUR1, Kir6.2 |
| Seudohermafroditismo masculino | 5 α-reductasa |
| Neoplasias endocrinas | |
| Neoplasia endocrina múltiple tipo 1 | MEN1 |
| Neoplasias endocrinas múltiples tipos 2A y 2B | Protooncogén RET |
| Enfermedad de Von Hippel-Lindau | VHL |
| Cáncer de mama/ovario familiar | BRCA1, BRCA2 |
| Hiperparatiroidismo familiar | MEN1, protooncogén RET |
| Receptores/canales | |
| Hipoplasia suprarrenal congénita | DAX1 |
| Resistencia a las hormonas tiroideas | TRβ |
| Síndrome de Laron | Receptor de la GH |
| Síndromes de Morris y Reifenstein | Receptor de andrógenos |
| Resistencia a la insulina | Receptor de la insulina |
| MODY 1 | HNF4α |
| MODY 3 | HNF1α |
| MODY 5 | HNFβ |
| MODY 4 | IPF1 |
| Diabetes insípida nefrogénica | AVPR2, AQP2 |
| Resistencia a la TSH | TSH-R (inactivación) |
| Hipertiroidismo familiar | TSH-R (activación) |
| Hipoparatiroidismo | CaR (activación) |
| Hipocalciuria hipercalcemia | CaR (inactivación) |
| Vías de transmisión de señales | |
| Síndrome de McCune-Albright | GNAS1 |
| Neurofibromatosis | NF1 |
| Carcinoma papilar de tiroides | Híbrido protooncogén RET/PTC |
| Adenomas paratiroides | Híbrido PTH/PRAD1 |

GH: hormona de crecimiento; TSH: hormona estimuladora del tiroides.

nocimiento de qué genes están implicados en la metabolización de diferentes fármacos y de qué SNP están relacionados con la metabolización en estos genes permitirá un tratamiento farmacológico más individualizado y más efectivo¹¹. Por primera vez podrán tratarse casos y no síntomas.

El tercer punto es especialmente importante para el diagnóstico del cáncer. Sabemos que hay pacientes que presentan tumores con características histológicas muy parecidas y que responden de una manera muy diferente a la radioterapia o a la quimioterapia, sin que la histopatología convencional pueda dar explicación de ello. Cabe pensar que si responden de modo diferente es que presentan alteraciones genéticas diferentes y, por tanto, su expresión génica será distinta. Para detectar la expresión génica de un tumor también se están utilizando los *chips* o *microarrays* de ADN mencionados. Las sondas corresponden a secuencias de regiones codificantes (conocidas como EST [*expressed sequence tagged sites*]) que pueden ser incluso desconocidas. Sobre estas secuencias, se hibridan los ADNc (ARN mensajeros copiados a ADN por retrotranscripción) procedentes de un determinado tumor. Los lugares en los que se produce hibridación se detectan mediante marcaje fluorescentes, obteniéndose un patrón de puntos cuantitativo y cualitativo. Esto da lugar a un patrón de expresión específico de cada tumor, que puede ser analizado informáticamente y que es

mucho más discriminativo que la histología convencional. Este patrón de expresión se puede correlacionar con el pronóstico de la enfermedad y ayudar a facilitar la terapia más adecuada para cada caso¹².

Evidentemente, cada uno de estos avances no sustituye al otro, sino que se potencian entre ellos, ampliando en mucho el arsenal metodológico del que disponemos (y dispondremos) para un mejor diagnóstico y tratamiento de las enfermedades endocrinas. Además, es importante destacar que muchos de estos avances proceden directamente de la investigación básica (localización e identificación de genes), reafirmando, pues, que el camino que hay entre el estudio básico y clínico es cada vez más corto y transitado en ambas direcciones.

Sin embargo, no todo son ventajas. Las posibilidades diagnósticas que nos brinda la biología molecular conllevan profundas implicaciones éticas. Hay que considerar que la obtención y almacenamiento de muestras de material genético no tiene las mismas características que el almacenamiento de sueros. Dichas muestras no sólo nos dan información del paciente sino que nos dan información de otros miembros de la familia, los cuales no son consultados y puede que no quieran conocer si son o no portadores de una determinada alteración génica. Además, debe pensarse que la penetración de una enfermedad (correlación genotipo-fe-

notipo) en general no es del 100%, por lo que debe valorarse el riesgo que, al predecir su desarrollo, ésta no aparezca. Incluso en enfermedades monogénicas se observa que la penetración no es completa, lo que nos lleva a pensar que otros factores (genéticos y ambientales) influyen en su desarrollo. Cabe añadir que la confidencialidad de los resultados ha de ser máxima, dado que estos datos pueden ser mal utilizados por empresas o compañías aseguradoras, y esto puede conllevar a discriminaciones sociales o laborales. Evidentemente, es labor del facultativo explicar al paciente o a la familia, todas las implicaciones que conlleva el estudio genético, específico para cada enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Koper JW, Lamberts SWJ. Sporadic endocrine tumours and their relationship to the hereditary endocrine neoplasia syndromes. *Eur J Clin Invest* 2000; 30: 493-500.
2. Zbar B, Kishida T, Chen F, Schmidt L, Maher ER, Richards FM et al. Germline mutations in the Von Hippel-Lindau disease (VHL) gene in families from North America, Europe, and Japan. *Hum Mutat* 1996; 8: 348-357.
3. Janezic SA, Ziogas A, Krumroy LM, Krasner M, Plummer SJ, Cohen P et al. Germline BRCA1 alterations in a population-based series of ovarian cancer cases. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 889-897.
4. White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev* 2000; 21: 245-291.
5. Lander ES. The new genomics: global views of biology. *Science* 1996; 274: 536-539.
6. www.gene-chips.com
7. <http://snp.cshl.org>
8. Hacia JG, Brody LC, Chee MS, Fodor SP, Collins FS. Detection of heterozygous mutations in BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two-colour fluorescence analysis. *Nat Genet* 1996; 14: 367-370.
9. Gray IC, Campbell DA, Spurr NK. Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2403-2408.
10. Chakravarti A. It's raining SNPs' Hallelujah? *Nat Genet* 1998; 19: 216-217.
11. Riley J, Allan C, Freeman A, Purvis I. The isolation and use of single nucleotide polymorphisms. *Biotech International* 2000; 12: 18-19.
12. Duggan DJ, Hedenfalk IA, Chen Y, Bittner M, Borg A, Trent JM. Microarray analysis discriminates BRCA2 mutation-positive from BRCA1 and sporadic breast cancer patient tumour biopsies. *Nat Genet* 1999; 23 (Supl): 43.