

ALCANCES DEL DESARROLLO Y APLICACION DE LAS TECNICAS MOLECULARES EN EL DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO DE LA PATOLOGIA ENDOCRINA

Dres. Roxana Marino, Nora Saraco, Marco A. Rivarola*, Alicia Belgorosky**

Las técnicas moleculares han tenido y aún tienen en la actualidad un fuerte impacto en la investigación clínica como así también en el diagnóstico de múltiples patologías endocrinas. Con el advenimiento, en los últimos años, de nuevas técnicas moleculares, los futuros avances en endocrinología analizarán el impacto de las características génicas particulares de un individuo sobre la síntesis y degradación de proteínas específicas.

Las técnicas moleculares han permitido conocer y entender muchos procesos celulares a nivel molecular. Durante muchos años se pensó que cada gen daba lugar a una única proteína; sin embargo, en la mayoría de los casos un único gen da lugar a varias proteínas. Por lo tanto, el tamaño del proteoma de un organismo no puede fácilmente predecirse por el tamaño y características particulares de su genoma. A través del Proyecto Genoma Humano se ha estimado que el número total de genes es de aproximadamente 20000, y el número de proteínas codificadas por esos genes se ha estimado entre 100000 y 2000000. Esta discrepancia entre el número de genes y proteínas puede ser explicada por al menos dos mecanismos importantes intracelulares: por procesamiento post-transcripcional del precursor de RNA mensajero (mRNA), y por modificación post-traduccional de las proteínas. La expresión del gen

de hormona de crecimiento humano (GH-1) es un ejemplo de procesamiento tanto a nivel del mRNA como también de modificaciones post-traduccional para generar a partir de un único gen múltiples formas proteicas moleculares.

Las primeras técnicas moleculares desarrolladas tanto para la investigación clínica como para el diagnóstico de patología endocrina fueron métodos de detección de secuencias específicas de ADN, RNA y proteínas: Southern blot, Northern blot y Western blot respectivamente. La aparición de las técnicas de PCR (polymerase chain reaction) y transcripción reversa-PCR, que consisten en la amplificación de cantidades mínimas de ADN o ARN, permitió su aplicación en toda el área de biología molecular, medicina forense y en los análisis arqueológicos. La PCR y la digestión con enzimas de restricción, PCR e hibridación con oligonucleótidos alelo específicos, amplificación por PCR alelo específica, son aplicaciones de la técnica de PCR que permiten de manera rápida y eficiente la detección de mutaciones génicas. Por último, la secuenciación directa es una metodología de elección para detección de mutaciones, permitiendo la confirmación de otras técnicas de detección de "screening". Sin embargo, la detección de cambios en la secuencia de bases nucleotídicas no significa necesariamente que sean responsables de la patología del paciente. Es importante tener el concepto que, frente a la detección de cambios en la secuencia genómica, este cambio debe ser interpretado evaluando si es probable que pueda

Servicio de Endocrinología.

* Investigador Superior CONICET.

** Investigadora Principal CONICET, Jefa del Servicio de Endocrinología.

Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan.

ser el responsable de alterar la funcionalidad de la proteína. Por otro lado, el análisis para evaluar la funcionalidad de una proteína, en presencia de un cambio de aminoácido, requiere técnicas moleculares complejas que deben ser realizadas por un laboratorio especializado.

La identificación de mutaciones en los genes candidatos relacionados con las distintas patologías permite la confirmación diagnóstica y esto se transfiere a un mejor manejo clínico del paciente a largo plazo, mejorando su tratamiento y calidad de vida. En el caso particular de una de las patologías más frecuentes dentro de la endocrinología como es la Hiperplasia Suprarrenal Congénita por déficit de la enzima 21-hidroxilasa, el estudio molecular permite 1) Confirmar el diagnóstico, sobre todo en las formas clínicas menos severas en las cuales, con frecuencia, los estudios hormonales no son contundentes para confirmar el diagnóstico. En algunos casos la identificación de las mutaciones permite predecir el grado de severidad de la patología, 2) El consejo genético al paciente y su familia y la detección de portadores heterocigotos, 3) El estudio prenatal en una familia con riesgo.

El avance en el conocimiento de los mecanismos moleculares ha modificado, en los últimos años, el pensamiento médico tradicional de la patología endocrinológica, basado en la secreción hormonal, en la que se distinguía o una hipofunción o una hiperfunción, por disminución o aumento de la secreción glandular, respectivamente. Ahora pensamos en la secreción endocrina de una hormona o factor (ligandos), en la producción local de esa hormona o factor (efecto paracrino o autocrino), en el receptor específico (de membrana o nuclear), en la transducción de la señal del complejo hormona-receptor, y en el promotor del gen que se regula. Todos estos pasos son inherentes a la hipo o hiperfunción. La problemática es cada vez más compleja, pero hemos ganado precisión en la comprensión de los mecanismos involucrados.

Recientemente, se han desarrollado nuevas técnicas moleculares para el estudio de múltiples genes y las proteínas que codifican. Hay diferentes áreas de estudio como la genómica (que estudia la función de los genes y su interacción), la proteómica (la identificación y función de las proteínas) y la farmacogenómica (interacción de las drogas con los genes). La técnica molecular más útil para el estudio de la genómica es el chip de ADN, (microarray); con el cual es posible analizar un gran número de genes al mismo tiempo en estudios de expresión génica. Los chips de ADN también pueden ser utilizados para detectar variaciones en el número de copias, que pueden asociarse a muchas patologías mediante hibridación

genómica comparativa (CGH). Los SNP's (single nucleotide polymorphisms) son alteraciones de un nucleótido a lo largo del genoma que ocurren con una frecuencia mayor a 1% en la población. Los SNP's pueden asociarse con patologías o predisposición a las mismas y pueden influenciar la forma en que cada individuo responde a enfermedades, entorno ambiental y drogas. Por ejemplo, la familia de enzimas citocromo P450 podría tener SNPs que predicen cómo un paciente puede metabolizar una droga en particular. Otro ejemplo de la farmacogenética aplicada al tratamiento de patologías ha surgido recientemente en el área de crecimiento. Existe una variante polimórfica en el receptor de GH (GHR) que carece del exón 3 y hay evidencias que en presencia de esta delección existiría una mayor respuesta al tratamiento con rhGH. La relevancia de esta variante polimórfica aún presenta controversias. Aunque aún se necesitan más estudios para profundizar en este tema en particular, es muy importante toda el área de farmacogenética para el futuro de la práctica clínica en general.

En este volumen de Medicina Infantil se describen en cada uno de los tópicos expuestos como impactan las anomalías génicas en la patología endocrina. También se hace referencia a que todavía se desconocen los mecanismos involucrados que expliquen muchas patologías. Se han propuesto mecanismos poligénicos, sin embargo se desconoce cuáles son y como interactúan.

Recientemente se han propuesto mecanismos epigenéticos, es decir cambios en los mecanismos que regulan la expresión de un gen, por ejemplo, anomalías en los sitios de metilación génica, lo que condiciona en su gran mayoría inhibición de la expresión de un gen. Estos cambios pueden quedar marcados en el genoma por factores que impactan durante la vida fetal y que condicionan la fisiopatología de un órgano en la vida postnatal. Por ejemplo, existen evidencias que la desnutrición fetal condiciona cambios epigenéticos en el feto que son capaces de generar un aumento del riesgo de padecer diabetes tipo 2 e hipertensión arterial en la vida adulta. En la actualidad, el análisis de los sitios de metilación de un gen, se ha incorporado a la estrategia de estudio, cuando se sospecha que cambios epigenéticos podrían ser los causantes de una determinada patología

Finalmente, en el Hospital de Pediatría Garrahan el desarrollo del Laboratorio de diagnóstico de patología endocrina a nivel molecular se inició, junto con otros laboratorios de estudios moleculares, en la década de los años 90 con el apoyo de la Dirección Médica Ejecutiva, dirigida por el Dr Juan Carlos O'Donnell, y la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Nación (FONCYT y CONI-

CET). Hoy es una realidad incontestable que nos ha permitido la incorporación del equipamiento específico y la formación de recursos humanos. En la actualidad el laboratorio de diagnóstico molecular en el área endocrina es Centro de Referencia Nacional para el diagnóstico molecular de diferentes genes que están involucrados en la patología endocrina. Por otro lado, es importante remarcar que la medicina del siglo XXI utilizará, ca-

da vez con más frecuencia, estas metodologías, no solo para confirmar diagnósticos sino también para diseñar tratamientos individualizados y lograr mayor eficiencia terapéutica, minimizando los efectos adversos de los fármacos utilizados, así como también para la aplicación de terapias génicas de reemplazo de la acción de genes que codifican para proteínas cuyas acciones son deficientes o ausentes.