

CIRCULATING DNA IN PLASMA OR SERUM

PHILIPPE ANKER & MAURICE STROUN

Department of Plant Biochemistry and Physiology, University of Geneva, Pavillon des Isotopes, 20 bvd. d'Yvoy, 1211 Genève

Abstract Small amounts of DNA circulate in both healthy and diseased human plasma/serum, and increased concentrations of DNA are present in the plasma of cancer patients. Characteristics of tumor DNA have been found in genetic material extracted from the plasma of cancer patients. These features include decreased strand stability, the presence of specific oncogene or tumor suppressor gene mutations, microsatellite alterations, Ig rearrangements and hypermethylation of several genes. The results obtained in many different cancers have opened a new research area indicating that plasma DNA might eventually be a suitable target for the development of non-invasive diagnostic, prognostic and follow-up tests for cancer. Following the discovery of tumor derived DNA in plasma or serum, cell-free fetal DNA has also been found in maternal plasma and serum. This discovery provides an easily accessible source of fetal genetic material for prenatal diagnosis.

Circulating DNA is linked to several kinds of disease

The interest in circulating DNA began in the seventies with the discovery of DNA in the serum of patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE)¹⁻². Further work showed that DNA was not only found in the plasma of patients with SLE, but was also present in patients with rheumatoid arthritis, glomerulonephritis, pancreatitis, cholelithiasis, inflammatory bowel disease, peptic ulcer disease, hepatitis and oesophagitis¹.

DNA is found in increased amounts in plasma/serum DNA of cancer patients

Leon and colleagues³ found that cancer patients tended to have even higher levels of circulating DNA than those with non-malignant diseases. Significantly greater amounts of DNA were found in the serum of patients with metastases compared to localized disease. Furthermore, DNA levels decreased by up to 90% following radiotherapy, especially in lymphoma, lung, ovary, uterus and cervical tumors. In contrast, persistently high or increasing DNA levels were associated with a lack of response to treatment.

Working with various malignancies (leukemia, lymphoma, lung, breast and gastrointestinal tumors) and after having extracted and purified the DNA from the plasma, it was found that detectable amounts of circulating DNA were found only in patients with advanced malignancies bearing a large tumor cell burden (see review 4).

Further work by researchers working with lung cancer patients found a correlation between circulating levels of DNA and prognosis (see 4).

Tumor DNA in the plasma/serum of cancer patients: biophysical properties

In the results showing increased levels of plasma DNA in cancer patients was not determined if the circulating DNA was released from activated lymphocytes reacting towards the disease as some data from SLE studies might suggest⁴ or from the tumor cells themselves. In 1989 it was shown that this plasma DNA from cancer patients shared some biophysical properties (decreased strand stability) common to DNA of cancer cells and hence was of tumoral origin⁵. This approach was interesting but it required microgram amounts of DNA. Luckily PCR techniques became available allowing oncogene mutation detection in minute quantities.

Plasma DNA N-RAS mutations and rearranged Ig heavy chain DNA in hematological malignancies

The first mutational analyses performed on plasma DNA concentrated on the K-RAS and N-RAS oncogenes (see 4,6,7).

N-RAS mutations have been found in DNA extracted from the bone marrow of patients with myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia (AML). These alterations have been also found in the plasma,

leukocytes and bone marrow of such patients (see 4). In-patients with N-RAS alterations, mutant DNA was always present in plasma DNA, though sometimes absent in the DNA of peripheral blood cells or bone marrow. This indicates that a single bone marrow biopsy or aspiration does not necessarily contain all the malignant clones involved in the disease.

Follow-up of hematological malignancies by analysis of markers in circulating DNA.

The second work on hematological disorders was done on B-cell malignancies where rearranged Ig heavy chain DNA was detected in plasma or serum samples of patients (see 4, 6). Tumor derived clonal CDRIII DNA was found in serum or plasma in 47% of 110 patients with non-Hodgkin's lymphoma or acute B-precursor lymphoblastic leukemia. Follow-up showed a close correlation between persisting tumor derived plasma/serum DNA and resistant disease or early relapse.

K-RAS mutations in circulating DNA of colorectal cancer patients

To our knowledge seven publications (see 4, 6,7) report the presence of K-RAS mutations in the circulating DNA corresponding to the mutation found in the tumor. In one of these studies, the authors have been able to follow-up a number of patients after surgery⁷. Post op., K-RAS mutations were found in the serum of five patients, two of which developed a relapse. The plasma mutation detection predated the clinical recurrence by 1 year in one case.

K-RAS mutations in circulating DNA of pancreatic cancer patients

The K-RAS gene is mutated in approximately 90% of pancreatic adenocarcinomas, suggesting that a comprehensive analysis of many genes would be unnecessary to detect the majority of cases. Five studies have therefore concentrated on detecting this gene in pancreatic cancer (see 4,6).

In a study^{4,6}, plasma DNA was isolated from 21 pancreatic cancer patients and K-RAS alterations was detected in the plasma of 17 patients (81%). In cases in which both plasma and pancreatic tissue were available, DNA mutations were similar in corresponding plasma and tissue samples. Plasma DNA alterations were found 5-14 months before clinical diagnosis in four patients who had been diagnosed as suffering from pancreatitis showing again that circulating tumor DNA may be an early event in oncogenesis. Mutant DNA was not found in the plasma of three patients with chronic pancreatitis who did not develop a carcinoma.

A follow-up study of patients with pancreatic adenocarcinoma also resulted in plasma DNA alterations being detected in a high proportion of cases in which a K-RAS mutation was found in tumor tissue^{4,6}. Treatment resulted in disappearance of K-RAS gene mutations in plasma DNA in six of nine (67%) patients. Three patients with a persistently positive K-RAS gene mutation in pre- and post-treatment plasma samples showed early recurrence or a progressive disease.

Microsatellite alterations in circulating DNA of cancer patients

All tumors, however, do not have high mutation rates on easily testable hot spots. This is the reason why several groups looked for microsatellite alterations in the plasma/serum DNA of cancer patients. Microsatellite DNA is composed of simple repeats of unknown function. It is unstable in cancer cells and subject to alterations, which appear as new alleles, allele expansion or loss of heterozygosity (LOH). Microsatellite DNA alterations are part of neoplastic progression and they may serve as clonal markers.

We initiated a study to detect microsatellite alterations in paired samples of plasma and tumor DNA from patients with small cell lung carcinoma compared to the same repeat sequences of normal cells from the same patients. A microsatellite alteration was present in 16/21 (76%) SCLC tumors and in 15 out of 21 (71%) corresponding plasma samples⁸.

Microsatellite alterations were also found in the circulating DNA of head and neck cancer patients⁹. In this study, positive serum samples seemed to be related to patients with advanced disease, suggesting they may prove useful as prognostic factors.

Microsatellite alterations have also been detected in the circulating DNA of patients suffering from a variety of malignancies: non-small cell lung (see 4,6), renal^{4,6}, bladder⁶, breast¹⁰, HNPCC and sporadic colon¹¹, ovarian cancers¹² and melanoma^{4,6}.

Other approaches to cancer detection or follow-up through circulating DNA

Other cancer related markers have been reported in the circulating DNA of cancer patients such as EBV sequences (see 4,6,13) and promoter hypermethylation of several genes particularly p16 (see 4,6,14). It is known that p16 mutations are rare but promoter hypermethylation resulting in gene inactivation are found to be common in a variety of different primary tumors. New markers are available since multiple genes are now known to be somatically silenced by promoter hypermethylation.

Twenty two patients with non-small cell lung cancer were tested¹⁴, searching for promoter hypermethylation of the tumor suppressor gene p16, the putative metastasis suppressor gene death-associated protein kinase, the detoxification gene glutathione S-transferase P1, and the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA-methyltransferase. Aberrant methylation of at least one of these genes was detected in 15 of 22 (68%) NSCLC tumors but not in any paired normal lung tissue. In these primary tumors with methylation, 11 of 15 (73%) samples also had abnormal methylated DNA in the matched serum samples. Similarly, in the study of liver cancer⁶, p16 methylation was found in the plasma/serum samples of 81% (13/16) of patients presenting p16 methylation in their tumor. Hypermethylation of p16 was also reported in tumor and plasma DNA of a series of breast¹⁰ and head and neck patients¹⁵.

Medical implications of circulating DNA for Oncology

The data about this novel approach for cancer detection, prognosis and follow-up, are still preliminary from the clinical point of view. What are the implications of plasma DNA for clinical medicine? Firstly, the possibility of non-invasive plasma DNA test for cancer diagnosis is challenging. Secondly, the association between mutant plasma DNA and tumor stage, the presence of residual disease and outcome suggests that it might potentially serve as a prognostic marker in the absence of clinically detectable metastases. Follow-up tests might be valuable in assessing response to therapy, identifying residual disease and recurrence at an asymptomatic and early stage.

Implications in prenatal diagnosis

Following the discovery of tumor derived DNA in plasma or serum, cell-free fetal DNA has been also been found in maternal plasma and serum¹⁶. This discovery opens up a new field of investigation and provides an easily accessible source of fetal genetic material for prenatal diagnosis. Prenatal diagnostic applications of fetal DNA in maternal plasma include the investigation of sex-linked disorders and fetal rhesus D status determination. The prenatal diagnosis of fetal rhesus D (RhD) status is useful for the management of RhD-negative women with partners heterozygous for the RHD gene. Conventional methods for prenatal fetal RhD status determination involve invasive procedures such as fetal blood sampling and amniocentesis. The possibility of determining fetal RhD status by analysis of maternal plasma or serum DNA has recently been realized by three independent groups of investigators (see 6).

Moreover cell-free fetal DNA has been found to be present in much higher fractional concentrations than fetal nucleated cells in maternal blood (see 6). The concentration of fetal DNA increases throughout pregnancy, with a sharp rise towards the end of gestation. Abnormally high levels of cell-free DNA have been found in pregnancies complicated by preeclampsia and preterm labor, an observation that has potential diagnostic and physio-pathologic implications (see 6).

This development represents an important step towards the routine application of noninvasive fetal blood group diagnosis in sensitized pregnancies and may become a model for developing safer noninvasive prenatal tests for other single-gene disorders. An example of the possibilities offered by this new approach has recently been shown by the detection in the maternal plasma DNA of paternally inherited fetal aneuploidy¹⁷ or of myotonic dystrophy¹⁸.

Acknowledgements: The authors acknowledge generous funding by La Ligue Suisse contre le Cancer.

References

1. Koffler D, Agnello V, Winchester R, Kunkel HG: The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. *J Clin Invest* 1973; 52: 198-204.
2. Rumore M, Steinman CR: Endogenous Circulating DNA in Systemic Lupus Erythematosus. Occurrence as Multimeric Complexes Bound to Histone. *J Clin Invest* 1990; 86: 69-74.
3. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ: Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977; 37: 646-650.
4. Anker P, Mulcahy H, Chen X Q, Stroun M: Detection of circulating tumor DNA in blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev* 1999; 18: 65-73.
5. Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M: Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncol* 1989; 46: 318-322.
6. Circulating Nucleic Acids in Plasma or Serum; in Anker P & Stroun M (ed): *Ann New York Acad Sci*, 2000, vol 906
7. Ryan BM, McManus RO, Daly JS, Keeling PW, Weir DG, Lefort F, Kelleher D: Serum mutant K-RAS in the colorectal adenoma-to-carcinoma sequence; in Anker P & Stroun M (ed): *Ann New York Acad Sci*, 2000, vol 906, pp 29-30.
8. Chen Xq., Stroun M, Magnenat JL, Nicod LP, Kurt AM, Lyautey J, Lederrey C, Anker P. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nature Med* 1996; 2: 1033-1035.
9. Nawroz H, Koch W, Anker P, Stroun M, Sidransky D: Microsatellite alterations in plasma DNA of head and neck cancer patients. *Nature Med* 1996; 2: 1035-1037.
10. Silva J, Dominguez G, Garcia JM, Gonzalez R, Villanueva MJ, Navarro F, Provencio M, Martin SST, Espana P, Bonilla F: Presence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients: Clinicopathological correlations. *Cancer Res* 1999; 59: 3251-3256.
11. Kölbl K, Ullrich OM, Pidde H, Barthel B, Diermann J, Rudolph B, Dietel M, Schlag PM, Scherneck S: Microsatellite alterations in serum DNA of patients with

- colorectal cancer. *Laboratory Investigation* 1999; 79: 1145-1150.
12. Hickey KP, Boyle DP, Jepps HM, Andrew AC, Buxton EJ, Burns PA: Molecular detection of tumor DNA in serum and peritoneal fluid from ovarian cancer patients. *J Cancer* 1999; 80: 1803-1808.
 13. Mutirangura A, Pornthanakasem W, Theamboonlers A, Sriuranpong V, Lertsanguansinchi P, Yenrudi S, Voravud N, Supiyaphun P, Poovorawan Y: Epstein-Barr viral DNA in serum of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 665-669.
 14. Esteller M, Sanchez-Cespedes EM, Rosell M, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG: Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res* 1999; 59: 67-70.
 15. Eisenberger CF, Schoenberg M, Enger C, Hortopan S, Shah S, Chow NH, Marshall FF, Sidransky D. Diagnosis of renal cancer by molecular urinalysis. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91: 2028-32.
 16. Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CWG, Wainscoat JS: Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350: 485-487.
 17. Chen CP, Chern SR, Wang W. Fetal DNA in maternal plasma: the prenatal detection of a paternally inherited fetal aneuploidy. *Prenat Diagn.* 2000 Apr; 20(4): 355-7.
 18. Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clin Chem.* 2000 Feb; 46(2): 301-2.

GENÉTICA MOLECULAR DE LA ENFERMEDAD HEREDITARIA TIROIDEA**HÉCTOR M. TARGOVNIK**

Cátedra de Genética y Biología Molecular. Facultad de Farmacia y Bioquímica y División Genética del Hospital de Clínicas "José de San Martín". Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Introducción

El actual conocimiento sobre la fisiología y bioquímica tiroidea comprende complejos mecanismos en los que intervienen receptores nucleares y de membrana, proteínas estructurales, enzimas microsomales y transportadores. Todas estas proteínas requieren de una normal expresión de sus respectivos genes, es decir de una transcripción correcta y posterior traducción de las respectivas proteínas maduras para que puedan cumplir su función. Mutaciones en los diferentes genes originan una variada gama de enfermedades genéticas tiroideas, tanto de naturaleza germinal como somática, con hiper o hipofunción tiroidea. Los bocios congénitos, el hipotiroidismo congénito, el hipertiroidismo no autoinmune por adenoma o hiperplasia tiroidea tóxica, la resistencia a TSH o a T3 y el síndrome de Pendred, son ejemplos de patología tiroidea donde el componente genético y sus respectivas mutaciones fueron descritas en la última década.

Bases moleculares de la biosíntesis de hormonas tiroideas

La biosíntesis de hormonas tiroideas se realiza en la interfase célula-coloides, en la membrana apical de la célula tiroidea, sobre una proteína estructural que es la tiroglobulina (TG) (Fig. 1)¹. Las tres etapas de la organificación del yoduro: oxidación del yoduro, su incorporación a los residuos tirosílicos de la TG y finalmente el acoplamiento de las monoyodotirosinas y las diyodotirosinas para formar T3 y T4 son catalizadas por una misma enzima microsomal: la tiroperoxidasa (TPO) y en presencia de una fuente de H₂O₂.

El yoduro ingresa al citoplasma celular a través del transportador Na⁺/I⁻ Symporter² ubicado en la membrana basolateral del tirocitos y, un segundo transportador en la membrana apical, la pendrina³, lleva al yoduro hacia la interfase célula/coloides donde la TPO lo organifica. El gen del Na⁺/I⁻ symporter fue mapeado en el cromosoma 19 y consiste en 15 exones que

codifican una proteína de 643 aminoácidos. El gen de la Pendrina se localiza en el cromosoma 7q22-31.1 comprende 21 exones que codifican una proteína de 780 aminoácidos y tiene 11 dominios de transmembrana.

La tirotrófina (TSH) controla la función y el crecimiento de la tiroides por regulación de los niveles intracelulares de AMPc por vía de su unión con el receptor de TSH en la superficie celular. El receptor de TSH es una cadena glicoproteica de 744 aminoácidos, ubicado en la membrana basolateral de la célula tiroidea, es un miembro de una superfamilia de receptores acoplados a la proteína G. El gen del receptor de TSH se encuentra localizado en el cromosoma 14. Su tamaño es de alrededor de 60 Kb, distribuidos en 10 exones.

La TSH se fija a su receptor y como resultado de esa interacción hormona - receptor se activa la adenilciclase que genera el AMPc. La activación de la cascada adenilciclase - AMPc desencadena las modificaciones intracelulares que dan lugar a las manifestaciones relacionadas a la acción de la TSH sobre el funcionamiento y el crecimiento tiroideo. La proteína G es el intermediario entre el receptor y la activación de la adenilciclase y al igual que esta última, se ubica en la membrana basolateral del tirocitos.

La activación de la cascada adenilciclase-AMPc produce los efectos fisiológicos conocidos de la TSH: estimulación de la captación del yoduro por parte de la célula tiroidea, la síntesis y la secreción de las hormonas tiroideas. El AMPc estimula la expresión de los genes de TG y TPO (Fig. 1).

El gen de la TG humana está ubicado en el brazo largo del cromosoma 8 (8q24.2-8q24.3), posee 300 Kb de longitud; la información para la síntesis de un ARNm de 8.5 Kb está contenida en 48 exones separados por intrones de gran tamaño, que representan el 96 % de las secuencias del gen⁴. El monómero está compuesto por un péptido señal de 19 aminoácidos seguidos por un polipéptido de 2.749 aminoácidos, incluidos 66 tirosinas de las cuales 3 a 17 son iodinadas "in vivo". La TG es una glicoproteína homodimérica de 660 kDa, sintetizada y secretada por las células tiroideas a la luz del foliculo.

El gen de la TPO humana se localiza en el cromosoma 2, contiene 17 exones, que representa 3.000 bases y el gen consta de 150 kb⁵. La TPO es una glicoproteína de 933 aminoácidos.

Organización estructural del gen de la TG

En los últimos dos años se completó la organización estructural del gen de la TG humana por caracterización de recombinantes, proveniente de dos genotecas construidas en los vectores λ Dash II y λ Charon 4A y por sondas de rt-PCR de la región central y 3' del gen de tiroglobulina humano (3.053 a 8.451 bases). La región estudiada fue a partir del exón 11, último exón conocido por secuenciación. La evaluación de los datos obtenidos de los experimentos de Southern blot y secuenciación con el ADN de 27 clones (7 proveniente de la genoteca λ Charon 4A y 20 de la λ Dash II) permitió estimar cuáles y cuántos exones incluía cada clon⁴. Se estableció que los 27 clones estudiados contienen 36 exones del 12 al 48. La secuenciación determinó el límite de los 48 exones y las secuencias intrónicas lindantes y de esta forma se estableció la organización estructural del gen de la TG humana. Los sitios hormonogenéticos aceptores fueron establecidos en los exones 2 (aminoácido: 5), 18 (aminoácido: 1291), 44 (aminoácido: 2554), 45 (aminoácido: 2568) y 48 (aminoácido: 2747) (Fig. 2). Gran parte de la proteína está organizado en 19 repetitivos agrupados en 3 dominios diferentes, repetitivos de tipo 1, tipo 2 y tipo 3 [figura 2], la región carboxilo terminal, no presenta zonas de homología interna y tiene características constitutivas diferentes a la región amino-terminal, lo que sugiere distintos orígenes evolutivos de las dos regiones. Los 11 elementos de tipo 1 se localizan entre las posiciones 12 y 1.191 y entre 1.492 y 1.546. El tipo 2 esta compuesto de 3 elementos localizados entre los aminoácidos 1.437 y 1.484 y el tipo 3 comprende cinco (3a y 3b) elementos entre los residuos 1.584 y 2.168. Esta organización proteica repetitiva hace a la TG un ejemplo de evolución génica por eventos de duplicación intragénica y de fusión.

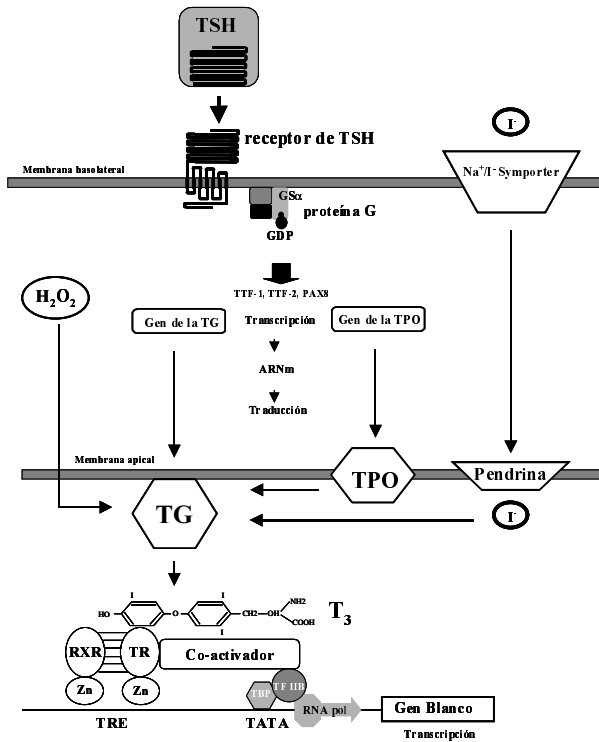


Fig. 1.- Biosíntesis, regulación y mecanismo de acción de las hormonas tiroideas.
 RXR: Retinoid X receptor, TR: Thyroid hormone receptor, TRE: Thyroid hormone receptor regulatory element, TBP: TATA binding protein, TF IIB: Transcription factor IIB.

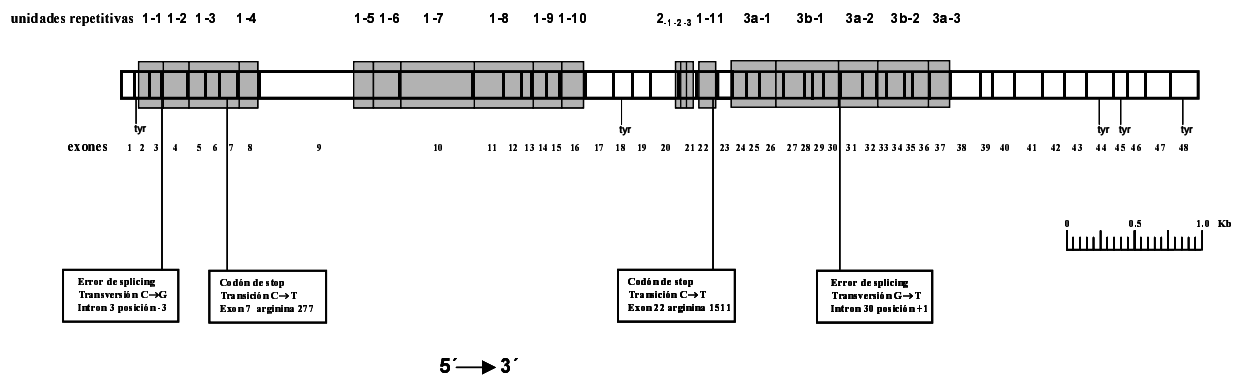


Fig. 2.- Organización exónica del gen de la TG humana y su correlación con las unidades repetitivas de tipo 1, 2 y 3. Los sitios hormonogenéticos (tyr) y las mutaciones identificadas son indicadas.

Dos probables mecanismos de control de la hormonogénesis tiroidea fueron identificados en la mitad N-terminal de la secuencia. El primero sugiere que un receptor endógeno apical interactúa con las TG inmaduras secretadas y previene su prematura transferencia lisosomal y consecuente degradación. En segundo lugar los 11 elementos de tipo 1 regularían la degradación de la TG madura por una selectiva y reversible inhibición de las proteasas lisosomales.

Genética molecular del hipotiroidismo neonatal

La prevalencia de hipotiroidismo neonatal en general es de 1/4.000 (de 1/2000 a 1/8.000)¹. Dentro del hipotiroidismo varias entidades poseen características propias con desordenes bioquímicos y clínicos muy heterogéneos. El hipotiroidismo congénito puede ser clasificado o asociados en dos grupos bien definidos: 1. hipotiroidismo neonatal sin bocio y 2. hipotiroidismo neonatal con bocio. El grupo sin bocio es debido a agenesia de la glándula tiroidea (atireosis), disgenesias (glándula ectópica) o a una glándula tiroidea hipoplásica. En gran parte de los casos la etiología es desconocida, en algunos pacientes el hipotiroidismo congénito está asociado con mutaciones en los genes responsables en el desarrollo de las células foliculares tiroideas: genes de receptor de TSH⁶, TTF-1⁷, TTF-2⁸ y PAX-8⁹.

La presencia de bocio congénito usualmente resulta de un número de anomalías relacionadas a los componentes proteicos de la hormonogénesis tiroidea. Mutaciones en los genes del Na⁺/I⁻ Symporter², pendrina³, TG^{10,11,12,13} y TPO⁵, originan un amplio espectro de bocio congénito hipotiroideo transmitidos en forma autosómica recesiva.

Los defectos de la producción de TG (fig. 2) y TPO comprende un cuadro clínico con bocio e hipotiroidismo y distintos grados de cretinismo. La integridad de la estructura de la TG como proteína es esencial para la adecuada síntesis de las hormonas tiroideas y como consecuencia permite el normal desarrollo neurológico en los primeros años de vida.

La primera mutación en el gen de la TG identificada, correspondió a una delección del exón 4 en el transcripto mayor de la TG¹⁰, debido a una transversión citosina a guanina en la posición -3 en el sitio aceptor de splicing del intrón 3. Luego, en dos individuos con bocio y marcada falla en la síntesis de TG se identificó una transición citosina a timina creando un codón de terminación prematuro en la posición 1511¹¹. La mutación es removida por acumulación preferencial de un mensajero con 171 nucleótidos delecionados correspondientes al exón 22. Estudios posteriores de ligamiento indican que esta familia además de la mutación sin

sentido caracterizada posee 1 o 2 mutaciones adicionales en el gen de TG que determinan un genotipo heterocigota compuesto en los dos individuos estudiado y en otro integrante de la familia (sobrino) con bocio congénito y falta del codón de stop en la posición 1511. Un error de splicing fue observado en un bocio congénito con una delección de 138 nucleótidos del ARN mensajero correspondientes al exón 30 (12), en este caso una transversión guanina→timina en el sitio +1 5' de splicing (GT→TT) es la causante de la eliminación del exón 30.

Recientemente, van de Graaf y col¹³, identificaron una transición citosina a timina en la posición nucleotídica 886 en el exón 7, creando un codón de stop en reemplazo del aminoácido arginina 277, en tres hermanos con bocio y moderado grado de hipotiroidismo.

Otros estudios indican que sustituciones de cisteínas (C1245R y C1977S en los exones 17 y 33, respectivamente) causa una anormal estructura tridimensional de la TG y un consecuente defecto en el transporte intracelular.

Se han informado distintas mutaciones en el gen de la TPO cosegregando con bocio e hipotiroidismo. La amplificación por PCR de 4 segmentos de ADNc obtenidos por transcripción reversa del ARNm de TPO, permitió identificar la primera mutación en el gen, correspondiente a una delección de 124 pb en la región comprendida entre los nucleótidos 1000-1550⁵. La secuenciación demostró que la delección corresponde a los primeros 124 bases del exón 9 (bases 1379-1502). La lectura de la secuencia del ADNc de la TPO corriente arriba a la delección (a 152 pb) identificó una inserción de 4 bases en la posición 1227 en el exón 8 debido a la duplicación del tetranucleótido GGCC. La duplicación origina un codón de stop que es eliminado por el splicing alternativo corrector del marco de lectura, pero funcionalmente la TPO es inactiva por pérdida de la histidina distal a la cual está unida el grupo hemo.

Referencias

1. Medeiros-Neto G, Targovnik HM, Vassart G. Defective thyroglobulin synthesis and secretion causing goiter and hypothyroidism. *Endocr Rev* 1993; 14: 165-183.
2. Miki K, Harada T, Miyai K, Takai S-I, Amino N. Congenital hypothyroidism caused by a mutation in the Na⁺/I⁻ symporter. *Nature Genet* 1997; 16: 124-125.
3. Everett LA, Glaser B, Beck J C, Idol J R, Buchs A, Heyman M, Adawi F, Hazani E, Nassir E, Baxevanis AD, Sheffield V C, Green E D. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat Genet* 1997; 17: 411-422.
4. Mendive FM, Rivolta CM, Vassart G, Targovnik HM. Genomic organization of the 3' region of the human thyroglobulin gene. *Thyroid* 1999; 9: 903-912.
5. Abramowicz MJ, Targovnik MH, Varela V, Cochaux P, Krawiec L, Pisarev MA, Propato FEV, Juvenal G, Chester HA, Vassart G. Identification of a Mutation in the Coding Sequence of the Human Thyroid Peroxidase Gene

- Causing Congenital Goiter. *J Clin Invest* 1992; 90: 1200-1204.
6. Sunthornthepvarakul T, Gottschalk M E, Hayashi Y, Refetoff S. Resistance to thyrotropin caused by mutations in the thyrotropin-receptor gene. *N Engl J Med* 1995; 332: 155-160.
 7. Acebron A, Aza-Blanc P, Rossi DL, Lamas L, Santisteban P. Congenital human thyroglobulin defect due to low expression of the thyroid-specific transcription factor TTF-1. *J Clin Invest* 1995; 96: 781-785.
 8. Clifton-Bligh R J, Wentworth J M, Heinz P, Crisp M S, John R, Lazarus J H, Ludgate M, Chatterjee V K. Mutation of the gene encoding human TTF-2 associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia. *Nat Genet* 1998; 19: 399-401.
 9. Macchia PE, Lapi P, Krude H, Pirro MT, Missero C, Chiovato L, Souabni A, Baserga M, Tassi V, Pinchera A, Fenzi G, Gruters A, Busslinger M, Di Lauro R. 1998 PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis. *Nat Genet* 1998; 19: 83-86.
 10. Ieiri T, Cochaux P, Targovnik HM, Suzuki M, Shimoda S - I, Perret J, Vassart G. A 3' splice site mutation in the thyroglobulin gene responsible for congenital goiter with hypothyroidism. *J Clin Invest* 1991; 88: 1901-1905.
 11. Targovnik HM, Medeiros-Neto G, Varela V, Cochaux P, Wajchenberg BL, Vassart G. A nonsense mutation causes human hereditary congenital goiter with preferential production of a 171-nucleotide-deleted thyroglobulin ribonucleic acid messenger. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 210-215.
 12. Targovnik H, Vono J, Billerbeck AEC, Cerrone G, Varela V, Mendive F, Wajchenberg BL, Medeiros-Neto G. A 138 - nucleotide deletion in the thyroglobulin ribonucleic acid messenger in a congenital goiter with defective thyroglobulin synthesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80 : 3356-3360.
 13. van de Graaf SAR, Ris-Stalpers C, Veenboer GJM, Cammenga M, Santos C, Targovnik HM, de Vijlder JJM, Medeiros-Neto G. A premature stopcodon in thyroglobulin mRNA results in familial goiter and moderate hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2537-2542.

PRUEBAS GENÉTICAS PREDICTIVAS. ASPECTOS MÉDICOS, ÉTICOS Y SOCIALES

Dr. VICTOR B. PENCHASZADEH

Profesor de Pediatría, Albert Einstein College of Medicine y Jefe de la División de Genética Médica del Beth Israel Medical Center, Centro Colaborador de la Organización Mundial de la Salud para Genética Comunitaria y Educación. 350 East 17th Street, Nueva York, NY 10009, USA. Email: vpenchas@bethisraelny.org

Los avances en el conocimiento del genoma humano están detectando la base molecular de centenares de enfermedades genéticas monogénicas, en forma de mutaciones puntuales, deleciones, amplificaciones de triplete, etc. Este conocimiento se está aplicando en forma de pruebas genéticas (análisis de ADN) en el diagnóstico de esas afecciones (al 25 de septiembre de 2000, la base de datos de Genetests registraba 774 enfermedades diagnosticables por análisis del ADN). Estas pruebas genéticas pueden aplicarse a: a) individuos sintomáticos, para confirmación diagnóstica; b) embarazos en riesgo genético para alguna de estas enfermedades (diagnóstico fetal); y c) individuos asintomáticos, pero cuya historia familiar los pone en riesgo de desarrollar una enfermedad genética en el futuro (diagnóstico presintomático).

Por otra parte, se están detectando mutaciones genéticas que otorgan una susceptibilidad individual o predisposición para contraer alguna enfermedad común del adulto de origen multifactorial, como los cánceres de mama, de próstata o de colon, la arteriosclerosis coronaria, la hipertensión arterial, la epilepsia, la diabetes y muchas otras. Esta lista está aumentando a diario, a medida que van realizándose investigaciones genéticas en poblaciones especiales, como parte del proyecto del genoma humano. Dado lo reciente de estos desarrollos y la escasez de datos fidedignos sobre validez y utilidad clínicas de las pruebas de predisposición, aún no existen normas o lineamientos clínicos adecuados para su aplicación. Su introducción prematura en el mercado genera problemas médicos y éticos de gran magnitud.

En esta presentación analizaré algunos aspectos relacionados con las principales aplicaciones "predictivas" de las pruebas genéticas, es decir cuando se aplican a personas sanas o cuando se desconoce el fenotipo, como es el caso del diagnóstico prenatal. Las pruebas genéticas tienen ciertos atributos que definen criterios para analizar sus posibles beneficios y riesgos en la práctica. El primer atributo es su **validez analítica**, es decir cuál es la performance de la prueba en el laboratorio. Componentes de la validez analítica de una prueba de ADN son su

sensibilidad (capacidad de detectar una mutación si está presente), su *especificidad* (que la prueba sea negativa cuando la mutación está ausente), su *certeza* (probabilidad que el valor medido esté en un rango predefinido) y su *confiabilidad* (probabilidad de obtener el mismo resultado consistentemente). Si bien estos son atributos propios de cada prueba, es obvio que además importan las características del laboratorio y sus técnicos. Por ello es tan importante la acreditación de laboratorios que efectúan análisis de ADN y el control de calidad de las pruebas.

Un segundo atributo de una prueba genética es su **validez clínica**, es decir la certeza con la cual la prueba de ADN diagnostica o predice el riesgo de una enfermedad en la práctica clínica. La validez clínica de una prueba incluye su *sensibilidad clínica* (probabilidad que la prueba sea positiva en pacientes que tienen la enfermedad), *especificidad clínica* (probabilidad que la prueba sea negativa en pacientes sin la enfermedad), *valor predictivo positivo* (probabilidad que las personas con pruebas positivas desarrollen la enfermedad) y el *valor predictivo negativo* (probabilidad que las personas con resultados negativos no manifiesten la enfermedad).

El tercer atributo de una prueba genética es su **utilidad clínica**, es decir qué manera el resultado incide en la salud y bienestar de las personas. La utilidad clínica de una prueba genética incluye, pero no se limita a, posibilitar intervenciones médicas para prevenir, mejorar o curar la enfermedad. La información que brinda también puede servir en la planificación reproductiva para evitar hijos afectados, para reducir la ansiedad por incertidumbre o para evitar controles médicos innecesarios. Sin embargo, la información genética no es inocua, y pueden ocasionar perjuicios tales como daños psicológicos, estigmatización y discriminación en seguros de salud y en el empleo. Entre los diferentes factores que afectan la utilidad clínica de las pruebas genéticas se cuentan: a) cuán penetrante es la mutación, es decir qué potente es la asociación entre una mutación determinada y la enfermedad; b) las características propias de la enfermedad (severidad, frecuencia en la

población, estigmatización social); c) cuál es el objetivo del análisis (diagnóstico en un contexto clínico individual o familiar, diagnóstico prenatal, predicción en una persona sana, o screening poblacional); d) existencia o no de prevención o tratamiento de eficacia comprobada; e) beneficios y perjuicios potenciales (médicos y psicosociales); f) implicancias para la familia (conflictos intra-familiares, "culpa del sobreviviente", etc); g) consecuencias sociales (estigma, seguros, empleo, etc).

Lamentablemente, todavía son muy pocos los ejemplos en que una prueba genética diagnóstica o predictiva va seguida de una intervención médica de eficacia comprobada para mejorar el curso natural de la enfermedad. Un ejemplo es la adenomatosis poliposa familiar, de herencia autosómica dominante, que produce cáncer de colon en los portadores de mutaciones en el gen APC. En los pacientes asintomáticos en riesgo, la prueba genética permite enfocar los métodos preventivos y terapéuticos (colonoscopías seriadas, colectomía) sólo en aquéllos que presentan la mutación. El ejemplo opuesto es la corea de Huntington, para la cual todavía no existen medidas para contrarrestar el desarrollo inexorable de la enfermedad. La utilidad clínica de la prueba genética presintomática de corea de Huntington es menor que la de adenomatosis poliposa familiar, pues no va seguida de medidas médicas que beneficien al paciente. Sin embargo, un paciente individual le puede encontrar utilidad a la información sobre si posee la mutación, ya sea para planificar su vida, para evitar tener hijos afectados, etc.

En el caso de mutaciones asociadas al desarrollo de ciertas enfermedades multifactoriales, la situación es más compleja, pues no se trata de genes determinísticos sino que solamente son predisponentes. En última instancia, la aparición de la enfermedad en personas "predispuestas" genéticamente va a depender probablemente más de factores ambientales que de la predisposición genética. Ejemplos de este tipo son las mutaciones de los genes BRCA1 y BRCA2 que aumentan el riesgo de cáncer de mama y ovario, y aquellas en genes de reparación del ADN que predisponen al cáncer de colon no poliposo. En la mayoría de los ejemplos conocidos la penetrancia de estas mutaciones es relativamente baja y su contribución al total de la frecuencia de la enfermedad es reducida. Además, en la mayoría de las enfermedades multifactoriales complejas mencionadas, los métodos de prevención y tratamiento no dependen todavía del conocimiento genómico. Más allá de posiciones simplistas y reduccionistas, y de las exageraciones de los medios periodísticos, el análisis de genes predisponentes no tiene aún una utilidad clínica manifiesta en enfermedades comunes del adulto.

La introducción en el mercado de pruebas genéticas de predisposición se hace por intereses comerciales y con poca relación con su validez y utilidad clínicas. Esto

ha traído como reacción que el gobierno de Estados Unidos haya instalado un Comité Asesor sobre pruebas genéticas, que acaba de expedirse recomendando una supervisión más estricta por parte de la Administración de Drogas y Medicamentos (FDA), que tiene jurisdicción sobre este tipo de análisis.

Desde el punto de vista de la ética del uso de pruebas genéticas predictivas en la práctica médica, existe consenso en que son los pacientes mismos los que deben decidir voluntariamente si desean realizarse un análisis genético de cualquier tipo. Para que la autonomía de decisión sea efectiva, el paciente debe ser informado y asesorado en forma objetiva de todas las implicancias, beneficios y perjuicios potenciales que pueden darse como consecuencia de un análisis genético. Uno de los mayores obstáculos a la aplicación de pruebas genéticas predictivas es que para la mayoría de ellas, aún se desconoce su real poder predictivo. Este conocimiento se logrará a mediano y largo plazo, en la medida que se realicen estudios poblacionales longitudinales. Entretanto, no debieran promoverse las pruebas genéticas predictivas para enfermedades exentas de métodos de prevención o tratamiento eficaces. En cambio, sí debieran estar disponibles para aquellos adultos que las soliciten voluntariamente, siempre y cuando la persona esté mentalmente estable, se le provea de información sobre las limitaciones de la prueba, reciba asesoramiento genético y apoyo psicológico, existan garantías de confidencialidad y el paciente esté en condiciones de absorber la información y usarla en su beneficio. En el caso de menores de edad, existe consenso de que las pruebas genéticas predictivas para enfermedades de comienzo tardío no tienen cabida, excepto cuando la información genética en un niño es necesaria para instaurar un método de prevención o tratamiento de eficacia comprobada.

En conclusión, las pruebas genéticas de ADN tienen una aplicación indiscutible en el diagnóstico de centenares de enfermedades debidas a genes determinísticos, incluyendo el diagnóstico prenatal. En cambio son escasas aún las aplicaciones para la predicción de enfermedades por genes determinísticos o predisponentes dado que la mayoría de estas dolencias no tienen aún métodos de prevención o tratamiento de eficacia comprobada y que dependan del conocimiento genómico. Es posible que en el futuro esta situación cambie con el avance del conocimiento del papel de los genes y los factores ambientales en el desarrollo de enfermedades complejas.

Lectura recomendada

Enhancing the Oversight of Genetic tests. Recommendations of the Secretary's Advisory Committee on Genetic Testing, 2000. (<http://www4.od.nih.gov/oba/sacgt.htm>)