

# APLICACIONES CLÍNICAS DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN ENDOCRINOLOGÍA

**Clara V. Álvarez.** Investigadora del Grupo: Neoplasia y Diferenciación Endocrina. Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CIMUS). Instituto de Investigaciones Sanitarias de Santiago. Catedrática de la Facultad de Medicina. Universidad de Santiago de Compostela.

**Miguel Chenlo.** Investigador del Grupo: Neoplasia y Diferenciación Endocrina. Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CIMUS). Instituto de Investigaciones Sanitarias de Santiago de Compostela.

## Introducción

Las mejoras en técnicas de secuenciación, junto a la recolección de datos de secuenciación masiva en cientos de miles de individuos han permitido el conocimiento estadístico de variaciones genéticas entre individuos de una población. Esas variaciones pueden afectar a la secuencia (diferencia de lectura con los nucleótidos validados en el genoma humano para ese lugar del genoma), o pueden afectar al número de nucleótidos (más o menos de los que corresponden). La variación genética se cataloga patogénica o no patogénica. Sin embargo, hay muchas variantes todavía clasificadas como VUS o de significado incierto. Para estudiar si un paciente tiene una variante patogénica, la técnica dependerá de si hay un gen candidato, con una variante concreta muy frecuente, o si debemos buscar en varios genes distintos, con múltiples variantes patogénicas posibles en cada uno de dichos genes.

## Diagnóstico

### Clasificación de la variación genética

<p><b>SNP</b></p> <p>Un solo nucleótido es distinto al validado para esa posición</p>	<p><b>STR</b></p> <p>Grupo de 2 a 6 nucleótidos, que se repiten un número de veces seguidas. El número de repeticiones varía en cada alelo heredado, de nuestro padre y madre, y son consideradas normales hasta un número de repeticiones.</p>	<p><b>In/Dels</b></p> <p>1 a 50 nucleótidos que se incorporan o desaparecen en un punto concreto.</p>	<p><b>CNV</b></p> <p>Número de copias de un gen, distinto de 2 que son las esperadas (una por cada cromosoma heredado que contiene ese gen).</p>
---	---	---	--

### Repercusiones patogénicas de la variación genética

Secuencia normal	Mutaciones puntuales			Frameshift		Alteración de CNV
	Silente	Nonsense	Missense	Inserción	Delección	
GCATTCCGAGGAGTA CGUAAGGCCUCCUCAU ↓ Arg Lys Ala Gly Val	GCATTTCGAGGAGTA CGUAAAGGCCUCCUCAU ↓ Arg Lys Ala Gly Val	GCAATCCGAGGAGTA CGUAGGCCUCCUCAU ↓ Arg STOP	GCATCCGAGGAGTA CGUACGCCUCCUCAU ↓ Arg Thr Ala Gly Val	GCAATGCCGAGGAGTA CGUAACGCCUCCUCAU ↓ Arg Thr Ala Gly Val	GCATTCCGAGAGT CGUAAGGCCUCCUCAU ↓ Arg Arg Leu Ser	
	Variante que no genera en la traducción de la proteína un cambio de aminoácido	Variante que genera un STOP en la traducción de la proteína, que pierde una parte relevante de su secuencia	Variante en un gen codificante de proteína que origina un cambio de un aminoácido, que altera la función de la proteína	Variante en un gen codificante de proteína que altera la pauta de lectura de grupos de tres nucleótidos que codifican un aminoácido. La secuencia de la proteína cambia completamente a partir de la variante. Los In/Dels también pueden alterar el número de repeticiones en un elemento STR de forma patológica	Pérdida de uno de los dos genes, o ganancia de otro gen más por encima de los dos que ya tenemos, causa enfermedad	

Mutaciones en promotor	Splicing alternativo	Fusiones
<p>Mutación puntual en el elemento de control</p> <p>Gen no expresado</p> <p>Expresión patológica (ej. TERT)</p> <p>Variante genética que causa desregulación en la zona promotora, con la consecuencia de que se expresa el gen cuando no debe, o no se expresa ese alelo.</p>	<p>Splicing normal</p> <p>Splicing alternativo patogénico en el intrón</p> <p>Exclusión de un exón entero</p> <p>Variantes de splicing "de novo"</p> <p>Variante que altera el procesamiento de los mRNAs, provocando que un exón se considere intrón, o viceversa, con la consecuencia de que la proteína resultante pierda dominios o los gane alterando su función. También pueden generarse variantes de RNA de novo, que no existen en el genoma normal.</p>	<p>Fragmentos de los genes se reordenan y generan una nueva proteína de fusión. Especialmente relevante en los genes de receptores tirosina, donde el dominio quinasa final queda fusionado a otra proteína no regulada que permite que esté dimerizando y activo permanentemente (TRK, ALK, RET, MET).</p>

### VUS: Variantes de significado incierto

Variantes de Significado Incierto, que todavía no se han clasificado como patogénicas o no patogénicas por falta de estudios funcionales. Los algoritmos bioinformáticos, como CADD, intentan predecir su patogenicidad con una puntuación o score.

### Tipos de muestras

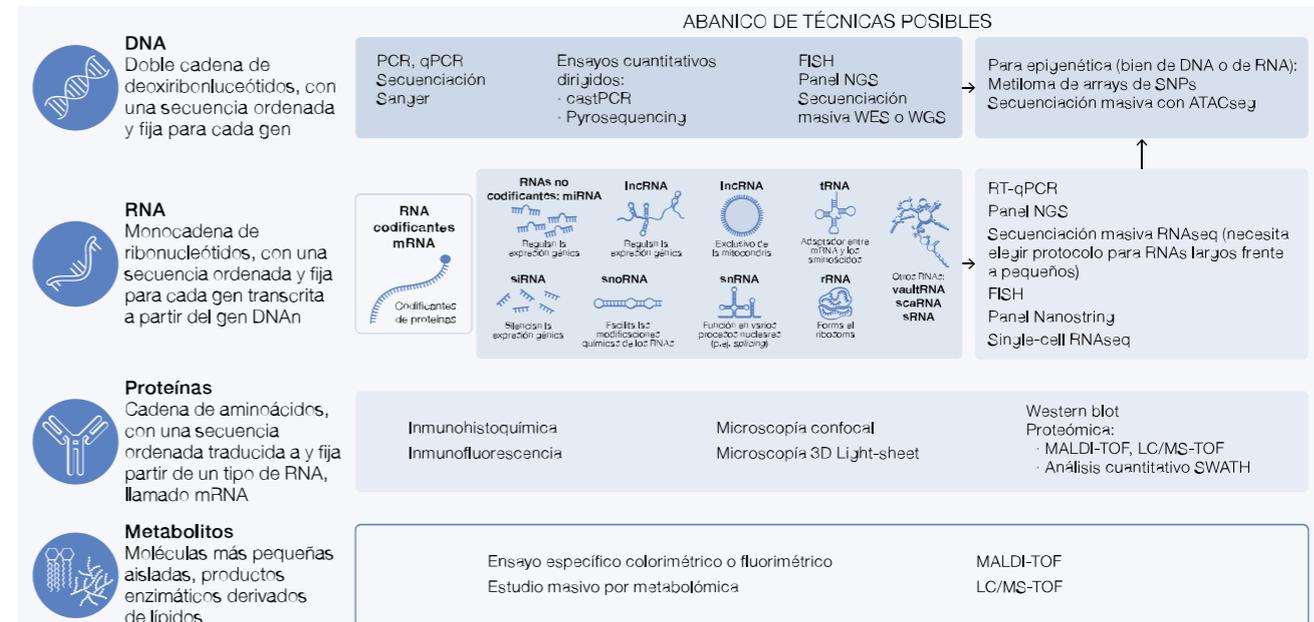
Dependiendo de la enfermedad que sospechemos, y si la hipótesis es esporádica o hereditaria utilizaremos distintas muestras obtenidas del paciente. Debemos garantizar que la recogida de la muestra es correcta, para que el estudio sea fiable, ya que las técnicas que se utilizan son de muy alta sensibilidad. Un aspecto clave son los consentimientos informados que deberá firmar el paciente, y deberán ser actualizados a la legislación vigente, y aprobados por el Comité de Ética en investigación clínica correspondiente. La investigación sobre las enfermedades de causa desconocida, o sin tratamiento, es norma en nuestro trabajo, y muchas veces exige del establecimiento de colecciones de tejidos muestras para acumular suficiente n, sobre todo en enfermedades raras o de baja frecuencia. Debemos asegurarnos de que las colecciones o Bancos de Muestras se conservan adecuadamente y que cada muestra esté correctamente identificada.

### Tipos de muestras para análisis molecular:



## Enfoque terapéutico

### Tipos de macromoléculas a investigar



### Estrategia de estudio

Se elegirá la técnica más costo-eficiente según la estrategia admitida para el estudio. En general existen tres estrategias:

#### 1. Estrategia del Gen Candidato

Dirigida a interrogar una sola variante o expresión de un gen, junto con alguna otra medición que se utiliza de control, para poder distinguir verdaderos negativos de aquellos negativos por culpa de problemas técnicos en la muestra o los aparatos.

**Ejemplos:** búsqueda de c.1799T>A, p.BRAFVal600Glu en DNA de carcinoma papilar de tiroides; expresión del RNA o proteína de una hormona en un tumor hipofisario no-funcionante para su reclasificación; detección de PD-L1 por inmunohistoquímica en una sección tumoral como biomarcador para tratar con inmunoterapia.

**Ventajas:** es la más costo-eficiente y rápida

**Inconvenientes:** si sale negativo, no podemos sacar conclusiones claras

#### 2. Estrategia por etapas según algoritmos de frecuencias encontradas en la enfermedad

Dirigida a interrogar grupos de genes limitados, tanto en DNA como RNA, metilación epigenética o proteínas. También en un solo gen, cuando se han descrito multitud de variantes patogénicas de DNA en diferentes exones, y se conoce la frecuencia de cada una.

Se dibuja un algoritmo según las frecuencias posibles, y se va utilizando bien métodos individuales para cada gen de forma ordenada según van saliendo negativos, o se interrogan todos juntos ver cual sale.

Siempre hay la duda de si una estrategia masiva sería más costo-eficiente.

**Ejemplos:** mutaciones de gen RET en DNA de MEN2 o carcinoma medular de tiroides esporádico, estudiando las mutaciones en los exones más frecuentes; estrategia BRAF + RAS + promotor TERT en carcinoma papilar de tiroides; mutaciones de enzima CYP21A2 en hiperplasia adrenal congénita; reordenamientos RET-PTC1, RET-PTC2, RET-PTC3 en RNA de carcinoma papilar de tiroides

**Ventajas:** es relativamente rápida y barata si el algoritmo de frecuencias está muy bien diseñado, por tener mucha información previa

**Inconvenientes:** resultados negativos no indican conclusiones, ninguna (!)

#### 3. Estrategia de estudio masivo, no sesgado

Puede ser más o menos amplia, pero intenta estudiar en profundidad grandes grupos de variaciones genes. Obligatorio que se almacenen los datos en repositorios informáticos.

**Ejemplos:** panel NGS con dianas terapéuticas tratables en cáncer avanzado, secuenciación masiva WES o WGS de DNA o RNAseq en enfermedad familiar heredable de causa desconocida.

**Ventajas:** son técnicas no sesgadas, y muy probablemente encuentran alteración causal

**Inconvenientes:** son caras, lentas exigen personal especializado de bioinformática. Ocupan muchísimo en cuanto a gigas informáticos, obligando a tener almacenes de supercomputación. No todos los hospitales tienen acceso, o todas las coberturas sanitarias los incluyen. La muestra tiene que estar garantizada en estabilidad y concentración. A veces son demasiado lentas para o que se necesita (por ejemplo, tratamientos de carcinoma anaplásico de tiroides)

## No olvides...

- La mayoría de los pacientes son generosos y están interesados en buscar la causa última de su condición, pero el consentimiento informado es esencial para cualquier estudio con muestras derivadas de pacientes.
- Si buscas una alteración molecular, debes estudiar muy bien el gen y lo descrito para esa mutación encontrada. El fenotipo de la enfermedad puede variar según la mutación concreta.
- Resultados negativos con estrategias parciales, no sirven para sacar conclusiones de ningún tipo. Frente a eso, las estrategias masivas, que son útiles por ser no sesgadas, a veces dan exceso de información que dificulta conclusiones claras.
- Debes conocer los límites de cada técnica: qué te puede decir y qué no; límite de detección y sensibilidad