

GENETICA

NEWSLETTER

CONCEPTOS Y NOVEDADES EN GINECOLOGIA, OBSTETRICIA Y NEONATOLOGIA

MARZO 1998

"Newsletter": el método más eficaz y económico para educación y actualización médica a distancia" (*).

NUMERO 5

Editorial

APLICACIONES CLINICAS DEL DIAGNOSTICO MOLECULAR

Watson y Crick, al establecer la estructura helicoidal de la cadena de ADN, no imaginaron que iban a contribuir en pocas décadas a generar profundos cambios en el conocimiento médico.

Las técnicas de genética molecular están hoy incorporadas, junto con las citogenéticas o cromosómicas, en el diagnóstico médico y en forma incipiente en algunos recursos terapéuticos. Ellas son utilizadas en numerosos trastornos, posibilitando el diagnóstico precoz y también como método de tamizaje o "screening" para identificar individuos con riesgo aumentado para ciertas enfermedades.

Hace treinta años un documento de la OMS estableció que los conocimientos de Genética eran importantes para asistir

mejor a los pacientes.

La genética molecular es una de las muchas áreas de la genética que debe incluirse en este concepto y aplicarla en la actualización de postgrado.

Como todo avance en el conocimiento científico, estos estudios han generado también dilemas sociales y éticos para nada soslayados; por el contrario, profundamente debatidos y contemplados.

En la presente edición brindaremos sólo algunos ejemplos que permitan comprender el significado de estos conceptos y su alcance en la práctica clínica así como familiarizarse con cierta terminología.

Dr. Enrique Gadow.

Hibridación "In Situ" por Fluorescencia (FISH) y diagnóstico prenatal

El cariotipo de material obtenido mediante amniocentesis o biopsia coriónica es una herramienta diagnóstica de gran ayuda en el seguimiento de embarazos con riesgo elevado para anomalías cromosómicas, posibilitando en estos casos un preciso asesoramiento genético. Las indicaciones más frecuentes de un cariotipo fetal incluyen la edad materna avanzada, una prueba de tamizaje bioquímica positiva y la detección por ultrasonido de malformaciones fetales.

La principal desventaja del estudio citogenético es que es sólo aplicable a células en división, por lo que el resultado demora entre 10 y 15 días. Por otra parte, algunas anomalías estructurales como micro deleciones/duplicaciones o translocaciones crípticas pueden no ser detectadas por las técnicas convencionales debido a que la región involucrada sea menor al tamaño de una banda cromosómica

FISH (Fluorescence in situ hybridization) es una técnica molecular complementaria de la citogenética clásica, basada en la alta especificidad de la unión entre consecuencias conocidas de ácidos nucleicos (sondas) y sitios específicos de cromosomas, tanto en metafase como en interfase.

La técnica consta de los siguientes pasos:

1) **Desnaturalización:** disociación de la doble cadena de ADN, tanto del cromosoma como de la sonda.

2) **Hibridización:** unión de la sonda con la secuencia complementaria del cromosoma.

3) **Detección:** captación de la señal fluorescente que emite la sonda.

Existen diversos tipos de sondas comerciales. Las más usadas son:

a- **Sondas de locus específicos:** de gran utilidad en el diagnóstico diferencial de la patología oncohematológica.

b- **Sondas "pintado de cromosoma":** cada sonda consta de una mezcla de muchas secuencias de diferentes sitios a lo largo de un cromosoma al que marcan en su totalidad, por lo que son útiles para detectar anomalías estructurales menores al límite de resolución de la citogenética convencional.

c- **Sonda alfa-satélite:** son secuencias que se unen específicamente a los centrómeros de cada cromosoma; se trata de las más usadas en diagnóstico prenatal. La técnica más común utiliza sondas para los cromosomas 21; 18; 13; X; e Y, debido a que la mayoría de las anomalías los involucran.

Las ventajas principales del FISH como método de diagnóstico prenatal pueden observarse en la siguiente tabla:

Ventajas del FISH

- Menos laborioso que la citogenética clásica.
- Aplicable cuando no es posible obtener cultivos celulares.
- Los resultados se obtienen en 24-48 hs.
- Disminución de la ansiedad materna.
- Mejor manejo obstétrico en situaciones críticas.

Sin embargo el método de FISH con sondas alfa-satélite presenta algunas desventajas, como puede verse a continuación:

Desventajas del FISH

- No detecta anomalías estructurales.
- No detecta anomalías numéricas de otros cromosomas que no sean 13; 18; 21; X o Y.
- Posibilidad de falsos negativos para estos cromosomas.

Por lo tanto, se considera que el FISH en interfase es una técnica complementaria que todavía no puede ser aplicada a nivel asistencial en forma independiente de la citogenética clásica, que sigue siendo hoy el método estándar de evaluación en diagnóstico prenatal.

Dr. T. Matayoshi. Dr. H. Aiello.

(*) American Journal of Human Genetics 52:225 y 53:1336, 1993

Nuevos síndromes

Defectos congénitos y microdelecciones

Además de los clásicos síndromes cromosómicos conocidos desde hace décadas (síndrome de Down, Turner, Klinefelter, etc.) una nueva metodología de análisis molecular permite identificar enfermedades que pueden detectarse en el recién nacido, denominada "Síndromes de delección de genes contiguos" (Schmickel, 1986).

La clínica fue el detonante para la investigación más profunda, esta vez en la citogenética, permitiendo los adelantos en biología molecular encontrar las herramientas para su estudio.

Un fenotipo constante permitía sospechar una misma etiología molecular génica. La investigación así dirigida permitió detectar la falta o delección de un pequeño trozo del brazo largo del cromosoma 15 (microdelección) (síndrome de Prader-Willi).

Se determina de esta manera el origen de 14 síndromes de delección de genes contiguos a los cuales cabe agregar dos más conocidos anteriormente como 4p- y 5p- y con la ayuda de sondas de ADN específicas para su utilización en la técnica de FISH. En el Cuadro I se describen los síndromes y su localización cromosómica como así también la técnica de elección para su diagnóstico.

El fenotipo anormal que resulta de una delección parece ser producto de una alteración en el dosaje normal de los genes involucrados o "haploinsuficiencia".

Dos copias del gen sensible a dosis serían necesarias para el desarrollo de un fenotipo normal.

Por definición, **microdelecciones son delecciones de un tamaño similar o inferior al nivel de resolución del microscopio óptico**. En general un cariotipo de rutina puede resolver 400 a 500 bandas. En este nivel de resolución se pueden detectar delecciones del orden de 5 a 10 megabases (Mb). En el caso de cariotipos de alta resolución donde es factible resolver de 850 a 1000 bandas se pueden detectar delecciones menores de 2 a 5 megabases, aproximadamente. En una banda cromosómica (= 3 Mb) pueden existir de 10 a 100 genes; por lo tanto, delecciones de algunas bandas pueden ser más deletéreas que otras, dependiendo de cuáles sean los genes involucrados.

Si las delecciones son más pequeñas que 2 Mb se requerirá de una técnica molecular para su detección.

La técnica de Hibridización In Situ por Fluorescencia (FISH) es una de las más usadas, ya que existen 11 sondas comerciales, por lo menos, para la detección de los siguientes síndromes: Williams, Langer-Gideon, Prader-Willi, Angelman, Rubinstein-Taybi, Smith-Magenis, HNPP, Miller-Dieker, ILS, Di George/VCFs.

Las ventajas y desventajas de la técnica de FISH sobre otras (RFLP, SSLP, densitometría, etc.) pueden observarse en otro artículo del presente número.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que en los casos en que el síndrome sea causado por disomía uniparental (doble dosis paterna o materna únicamente) y no por delección, no será detectado por FISH, como ocurre en el 30 % de los síndromes de Prader-Willi y Angelman.

Estos síndromes son el mejor ejemplo de imprinting

en el ser humano: los genes involucrados son los mismos pero cuando la delección es paterna el cuadro presente es el de Prader-Willi, mientras que si la delección es materna el síndrome corresponde a Angelman.

Existen hasta el momento dos cuadros en los que la etiología es la microduplicación: Beckwith-Wiedeman y Charcot-Marie-Tooth tipo 1a, por duplicación en el brazo corto del cromosoma 11 (11p15.5) en el primer caso, y en el brazo corto del cromosoma

17 (17p12) en el segundo.

Como queda expuesto, hay nuevas alternativas para el estudio de defectos congénitos y la confirmación de ciertos síndromes **siempre con el mismo objetivo: realizar el asesoramiento genético correspondiente**, es decir la transmisión a la familia de un pronóstico preciso ante un afectado y los riesgos de ocurrencia o recurrencia de un trastorno o enfermedad.

Dra. Eva Serafin - Lic. Andrea Figueroa

CUADRO I			
Síndrome	Localización	Visible (1)	Submicroscópicas (2)
Wolf-Hirschhorn	4p16	mayoría	pocas
Cri du chat	5p15	mayoría	pocas
Williams	7q1123	pocas	90 %
Langer-Gideon	8q241	75 %	—
WAGR	11p13	mayoría	pocas
Retinoblastoma	13q14	mayoría	—
Prader-Willi	15q12	70 %	70 %
Angelman	15q12	85 %	85 %
Thalassemia/mr	16q133	50 %	50 %
Rubinstein-Taybi	16p133	—	25 %
Smith-Magenis	17p112	mayoría	—
Miller-Dieker	17p133	50 %	90 %
ILS	17p133	—	38 %
Alagille	20p1123	pocas	90 %
Di George/ VCF	22p112	30 %	90 %

(1) al microscopio óptico.
(2) por técnicas de FISH u otro método molecular.

CUADRO II		
Síndrome	Localización	Características clínicas relevantes
Wolff Hirschhorn	4p 16	Anomalías faciales en "Casco guerrero griego", RM y atraso del crecimiento.
Cri du chat	5p 15	Microcefalia, RM dismorfias y llanto agudo, monorde, tipo maullido de gato.
Williams	7q 11.23	Estenosis aórtica supra valvular, hipocalcemia intermitente dismorfias faciales, voz ronca, personalidad gregaria y RM.
Langer-Giedion	8q 23.	Exostosis múltiple, nariz bulbosa,
Tricorinofalángico Tipo II	3q 24.2	talla corta y RM.
WAGR	11p 13	Tumor de Wilms, aniridia, displasia genitourinaria, RM.
Retinoblastoma	13q 14	Tumor embrionario del ojo asociado con RM.
Prader Willi	15q 12	Hipotonía, hiperfagia, obesidad, hipogonadismo pies y manos pequeños, RM.
Angelman	15q 12	RM severo, convulsiones, mutismo.
Talasemia/RM	16p 13.3	Anomalías de la hemoglobina, RM.
Rubinstein Taybi	16p 13.3	RM, pulgares y dedos gordos de pies.
Smith-Magenis	17p 11	Braquicefalia, hipoplasia mediofacial, manos anchas y cortas, RM y conducta autoagresiva
Miller-Dieker	17p 13.3	Lisencefalia, RM, fascies peculiar
Alagille	20p 11	Colestasis crónica por estasis intrahepática por hipoplasia biliar, anomalías faciales, cardiopatía congénita y defectos vertebrales.
Di George/Velo	22p 11	Aplasia o hipoplasia del timo, anomalías cardíacas
Cardio Facial	1q 12	conotruncuales, hipocalcemia.

Marcadores genéticos en cáncer de mama y de ovario: BRCA1 y BRCA2

Un marcador genético es una alteración en un gen vinculado a la susceptibilidad para el cáncer que le confiere al portador un riesgo aumentado de desarrollar la enfermedad a lo largo de la vida.

Estas alteraciones del genoma, que afectan a las líneas germinales, son por definición congénitas y heredables. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la **presencia del marcador genético no indica que exista un cáncer al momento de la identificación.**

Las alteraciones referidas, están presentes en todas las células del organismo, no solamente en las células tumorales. Por esta razón los estudios se realizan generalmente sobre el DNA -o el RNA mensajero- de linfocitos de sangre periférica, por ser de fácil obtención.

Dado que los marcadores genéticos son heredables, pueden ser compartidos por varios miembros de la familia del enfermo, hombres o mujeres, que tienen o no cáncer.

Si se tiene en cuenta que las alteraciones que afectan a los genes vinculados a la susceptibilidad de desarrollar cáncer son múltiples y variadas, es necesario hacer algunas consideraciones:

1. Sólo se podrán evaluar las alteraciones de aquellos genes a los que se ha identificado como vinculados con la susceptibilidad de desarrollar cáncer y cuya secuencia de base normal se halle totalmente definida.
2. El conocimiento y definición de la alteración presente en los afectados permitirá su búsqueda en los no afectados, para poder así hacer una evaluación del riesgo de éste.
3. La ausencia de alteraciones en los genes conocidos en un afectado de cáncer de una familia con varios casos informados podría significar que se trata de varios casos esporádicos ocurridos por azar en la misma familia o que el gen alterado no es el estudiado.

BRCA1 Y BRCA2

Las alteraciones en la secuencia nucleotídica de estos dos genes ha sido vinculada con un aumento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama y ovario (en varios trabajos por varios autores). **Han sido identificadas en la actualidad más de 100 variantes del BRCA1 y varias del BRCA2. Sin embargo, sólo algunas de ellas se vinculan con la susceptibilidad de desarrollar cáncer** (Collins FS - 1996).

Estas variaciones se han identificado en individuos pertenecientes a familias en las que existe una alta incidencia de uno o ambos cánceres o en mujeres en los que éstos se desarrollan a temprana edad. No obstante, debe tenerse en cuenta que **el 90% de las mujeres con Cáncer de**

Mama u Ovario no entran en esta categoría.

Entre las mujeres con Síndrome Familiar de Cáncer de Mama u Ovario, el 75% presenta mutaciones del BRCA1 en el cromosoma 17.

En el 25% restante la alteración podría estar en el BRCA2, en otro gen no determinado o representar la coincidencia de casos esporádicos en una misma familia (Hubbard, Lewontin - 1996).

Debe tenerse en cuenta que, como se señaló previamente, **la presencia de un marcador genético en una mujer perteneciente a una familia con un Síndrome Familiar de Cáncer de Ovario o Mama no significa que padezca la enfermedad.** Sin embargo, su riesgo de desarrollar la enfermedad durante su vida está en el orden del 85% para el cáncer de mama y del 45% para el de ovario (Hubbard, Lewontin - 1996).

El valor del resultado negativo depende absolutamente de la información que se tenga de los afectados. Si se conoce la mutación presente en los miembros de la familia que desarrollan enfermedad, su ausencia significará que el consultante presenta el mismo riesgo que la población general de padecer la enfermedad. Sin embargo, si no se conoce la situación de los afectados, poco puede valorarse la ausencia de mutaciones en el BRCA1 y BRCA2 ya que otros podrían ser los genes afectados o las variantes en los mencionados, así como podría ocurrir que el individuo no estuviera afectado.

De todo lo expresado anteriormente podemos concluir **que la determinación de la presencia de marcadores genéticos en el BRCA1 y BRCA2 solo está justificada en los casos en que se presume por la genealogía, que estamos ante un Síndrome Familiar de Cáncer** y que en esos casos, el estudio debe comenzar necesariamente por los afectados para poder valorizar los resultados de los no afectados.

IMPLICANCIAS CLÍNICAS DEL RESULTADO POSITIVO

En un estudio reciente, Marcus y col. (1996) demuestran una elevada frecuencia de neoplasias de aparición en edades tempranas así como una alta incidencia de desarrollo de un segundo tumor primario en las pacientes con Cáncer de Mama ligado a mutaciones del BRCA1. Esto se opone a otros informes, como el de Porter y col. (1993), que refieren un mejor pronóstico para estos cánceres, lo que podría explicarse por la alta incidencia de estadíos iniciales detectados en esa población debido a los estrictos planes de vigilancia a que son sometidos.

Desde el punto de vista del aporte que la determinación de la presencia de un BRCA1 o

un BRCA2 mutado representa en pacientes con Síndrome de Cáncer Familiar y donde hemos identificado la misma alteración en los otros afectados de la familia, plantea los siguientes interrogantes:

- ¿Cuál es el valor de determinar la presencia de mutaciones en los miembros de la familia no afectados de Cáncer de Mama u Ovario hasta ese momento?
- ¿Cuál es el valor de determinar la presencia de mutaciones en miembros de la familia que desarrollan un cáncer, especialmente de mama?

En el primer punto se discute tanto el valor de la ooforectomía como de la mastectomía profiláctica. Sin embargo, aunque ninguno de los dos procedimientos elimina totalmente el riesgo, en un informe de Schrag y col. (1997) se describe una clara extensión en la expectativa de vida en estas pacientes luego de la intervención. No obstante, muchas opiniones se oponen a esta afirmación y en muchos casos cuestionan que se utilice la expectativa de vida como único indicador de resultados, sin tener en cuenta otras variables, como por ejemplo la calidad de vida (Birkmeyer JD, Welch HG 1997 - Meijer WJ, Lindert ACM 1997).

En relación con el segundo interrogante, ante la alta frecuencia de un segundo tumor primario en los afectados con el gen mutado, cabría preguntarse si una tumorectomía con linfadenectomía e irradiación del tejido mamario residual sería suficiente o si correspondería ser más agresivo en el manejo de este subgrupo de carcinomas mamarios. De cualquier manera, en este caso valdrían las mismas consideraciones que se hicieron para el punto 1 en lo que hace a la cirugía profiláctica.

Finalmente es fundamental respetar la autonomía de la paciente, y el consentimiento informado.

CONCLUSIONES

Si bien la determinación de mutaciones en el BRCA1 y BRCA2 constituyen un avance trascendente, todavía hay grandes interrogantes a resolver. Existe, sin embargo, consenso casi unánime entre los autores de que hoy **resulta impensable su uso masivo o fuera de los pacientes con Síndrome de Cáncer Familiar y en este subgrupo solo podría considerarse de valor cuando se ha identificado y caracterizado la presencia de una mutación en los afectados.**

Dr. Gustavo M. Amestoy

Bibliografía

La bibliografía citada se halla a disposición de cualquier consulta.

REUNIONES

CONGRESO DE LA SOCIEDAD INTERNACIONAL DE DIAGNOSTICO PRENATAL

8 al 10 junio de 1998. Los Angeles. California.

Organizadores: Mark Y. Evans -Lawrence Platt -Joe Leigh Simpson

Sesiones plenarias y moderadores

Invasive Procedures: First trimester. Froster. Jackson.

Invasive Procedures: Second trimester. Rodeck. Holzgreve.

Molecular Cytogenetics. Ferguson. Smith.

Laboratory Analysis. Crandall. Phillips.

Mendelian Disorders. Kaback. Ferguson-Smith.

Ethical and Legal Issues. Zakut. Capron.

Preimplantation Diagnosis. Verlinsky. Handside.

Experience and safety in selected disorders. Liaebers. Simpons.

Fetal cells in maternal blood. Elias. Bianchi.

Fetal therapy. Evans Zakut.

Informes:

Fax 310-967-0140

Departments of Obstetrics and Gynecology.

8635 West Third Street, Suite 160 West. Los Angeles, CA 90048.

CONGRESO DE LA SOCIEDAD DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGIA DE BUENOS AIRES

5 al 8 de julio de 1998

Informes: 345-5051 E mail: sogiba @ rilay.startel.com

CONGRESO ARGENTINO DE PERINATOLOGIA

10 al 12 de setiembre de 1998

Informes: 821-8612 (int.102) E mail: congresos @ sap. org. arg

NOVEDADES

Hipoacusia congénita

Aproximadamente 75% de las hipoacusias congénitas no-sindrómicas son de etiología génica autosómica recesiva, de las cuales del 50 al 80% estarían producidas por la mutación del gen "Conexin 26". El hallazgo tiene una consecuencia clínica trascendental para el asesoramiento genético de estas familias. *Lancet*, 351:383, 394 y 415; 1998.

Riesgos de la amniocentesis precoz

Un estudio clínico aleatorio que comparó los resultados de amniocentesis precoz (11 a 12,6 semanas) versus amniocentesis del segundo trimestre (15 a 16,6 semanas) reveló que la amniocentesis precoz se asocia a una mayor incidencia de pérdidas fetales, pérdida de líquido amniótico y pie equino varo en el recién nacido. *Lancet*, 351:242, 226; 1998.

EDITORIAL

Sección Genética - Departamento de Ginecología y Obstetricia, CEMIC. Hospital Asociado. División Genética, Hospital de Clínicas "José de San Martín". Facultad de Medicina, UBA.

- GENETICA CLINICA Y REPRODUCCION.
- CITOGENETICA Y GENETICA MOLECULAR.
- DISMORFOLOGIA.
- GENETICA POBLACIONAL.

Secretaría de Redacción:
Julia Raggi

Dirección Postal: "Newsletter"
Sección Genética, Galván 4102 (1431)
Buenos Aires - Argentina
Tel.: 546-8248
Fax: 541-3790

Todos los derechos reservados.

Registro de la Propiedad Intelectual: en trámite.

GENETICA

NEWSLETTER

CONCEPTOS Y NOVEDADES EN GINECOLOGIA, OBSTETRICIA Y NEONATOLOGIA

CORREO ARGENTINO CENTRAL (B)

FRANQUEO PAGADO CONCESION N° 7084