

LA NOVA MEDICINA PREDICTIVA

FRANCESC PALAU

Unitat de Genètica i Diagnòstic Prenatal, Hospital Universitari La Fe. València.

RESUM

L'objectiu clàssic de la medicina ha sigut la curació de les malalties. Avui continua sent l'objectiu principal, però, a més a més, la prevenció de les malalties i la promoció de la salut s'han afegit com a nous plantejaments de la medicina moderna. Tanmateix, fins fa molt poc de temps hom no disposava de ferramentes per a la predicció de les malalties, sobretot d'aquelles que tenien un component hereditari. La medicina científica basada en els estudis cel·lulars i histològics, en les investigacions bioquímiques, no ens aportava suficient informació en la majoria dels casos. El canvi, però, que ens ha possibilitat la nova medicina predictiva ha vingut donat pel desenvolupament de la biologia molecular i de la tecnologia del DNA recombinant al llarg dels anys seixanta i setanta i, concretament, per la seua aplicació a l'estudi de la genètica humana i mèdica. Aquesta aplicació s'ha desenvolupat durant la darrera dècada dels anys vuitanta. Les investigacions al voltant de les malalties causades per un gen alterat –mutat en un sentit patològic–, la seua aplicació al consell genètic i al diagnòstic prenatal i, fins i tot, al desenvolupament d'una teràpia gènica, estan causant una veritable revolució dins la medicina. És evident que al costat de les mentalitats de pensament del segle XIX i del primer terç del segle XX –el teixit, la cèl·lula, la proteïna i els enzims– hem d'afegir la mentalitat genètica i molecular al treball quotidià dels metges i biòlegs interessats en la patologia humana. En una paraula, el DNA ha passat de ser la molècula fonamental de la vida i de la mort que ens interessa per ella mateixa, a ser una peça fonamental per al coneixement de les bases etiològiques de les malalties i per a llur diagnòstic i prevenció.

BASES PER A UNA MEDICINA PREDICTIVA: EL MARCADORS POLIMÒRFICS I ELS MAPES GENÒMICS

La gran majoria dels gens causants de malalties hereditàries són (o han sigut fins fa molt poc de temps) desconeguts. Ni tan sols se sap quin és el defecte bioquímic que hi rau. Davant eixa situació la primera qüestió a resoldre és la localització cromosòmica del gen a partir de la qual hom puga dissenyar experiments que conduïxquen cap a l'aïllament del gen i el descobriment de mutacions patològiques. L'estratègia que se segueix s'anomena *clonació posicional* (Collins, 1992), és a dir, la primera qüestió és trobar el lloc exacte on és el locus del gen. La tècnica que utilitzem és l'anàlisi de lligament amb marcadors polimòrfics moleculars que prèviament han sigut cartografiats pertot el mapa genòmic humà. Aquests marcadors es poden utilitzar en dos sentits: 1) Per a iniciar l'anàlisi de clonació del gen que estem buscant, amb el qual els mateixos marcadors estan relacionats amb una proximitat física (és a dir, estan lligats) i 2) per a utilitzar-los com a eines diagnòstiques indirectes

(Antonarakis, 1988). És aquesta darrera possibilitat la que anem a tractar amb més profunditat.

Els marcadors del DNA no es corresponen amb defectes moleculars dins el gen. El que fan realment és assenyalar quin és el cromosoma portador de la mutació patològica que es segrega en una família. Açò és factible explotant el polimorfisme natural del DNA genòmic. Entre dos individus qualssevol la seqüència nucleotídica difereix suficient perquè hi trobem diferències als llocs de reconeixement dels enzims de restricció del DNA. Aquestes diferències les podem fer visibles mitjançant la transferència de *Southern* després de tallar el DNA amb l'enzim que genera el polimorfisme, i hibridar amb una sonda molecular específica. Els diferents al·lels es poden reconèixer per la distinta migració dels fragments generats per l'enzim, depenent de si la diana de restricció és al cromosoma o no hi és. També es pot resoldre amb la reacció en cadena de la polimerasa (RCP): després de l'amplificació *in vitro* del segment del DNA que inclou la diana de restricció, procedim a tallar el producte de la reacció amb l'enzim. Els productes es corren en un gel d'agarosa i s'ava-

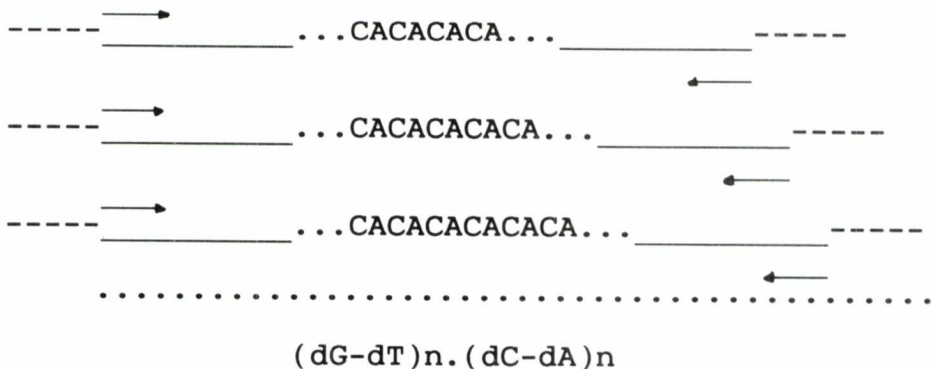


FIGURA 1. Esquema representatiu dels marcadors microsatèl·lits del tipus dinucleòtid CA. El nombre n de CA és variable a la població general. L'anàlisi d'aquests tipus de marcadors es fa amplificant la regió genòmica que els conté mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa. Després, els distints al·lels són separats segons la seua grandària en un gel de poliàcrilamida. C= citosina, A= adenina, G= citosina i T= timina. Les dues fletxes en direccions oposades indiquen la localització i el sentit 5' $\rightarrow$ 3' dels «oligoprimers» a partir dels quals comença la reacció.

lua la presència d'al·lels per la seua diferent grandària. A banda dels FRLPs hi ha d'altres polimorfismes que no depenen de la presència o no d'una diana de restricció. El coneixement d'aquests polimorfismes és més recent (Weber i May, 1989). Són polimorfismes segons el nombre de repeticions d'una unitat de dos, tres o quatre nucleòtids. Es tracta de polimorfismes molt informatius perquè el nombre d'al·lels que es poden trobar a la població general és molt gran (Figura 1).

L'anàlisi del DNA dels membres d'una família permet determinar si l'al·lel més gran o el més petit se segrega amb el cromosoma que conté la mutació. L'estudi depèn de la presència de membres afectats pel procés patològic. Un mena d'exemple és el referit a la figura 2 on s'analitza el DNA procedent d'una biòpsia corial en una família amb un fill afecte d'una malaltia amb herència autosòmica recessiva. En aquest cas el geno-

tip per als marcadors del malalt defineix quins són els cromosomes del pare i de la mare que porten la mutació. És a partir de l'obtenció d'aquesta informació que es podrà deduir si el fetus serà afecte, portador asintomàtic o un individu sa sense cap mutació als seus cromosomes. En la pràctica s'analitzen diversos FRLPs per assegurar-se que els cromosomes dels dos pares es diferencien perfectament. A l'exemple de la figura 3, el marcador hipotètic A/B no distingeix entre els dos cromosomes paterns pel fet que tot dos porten el mateix al·lel A. L'ús alhora, però, d'un altre marcador 1/2/3, sí que ens permet diferenciar-ne els dos cromosomes paterns, malgrat que en aquest cas els dos cromosomes materns no s'hi poden diferenciar. La utilització dels dos marcadors permet construir-ne un haplotip per a cadascun dels quatre cromosomes parentals.

La fidelitat amb la qual el marcador se-

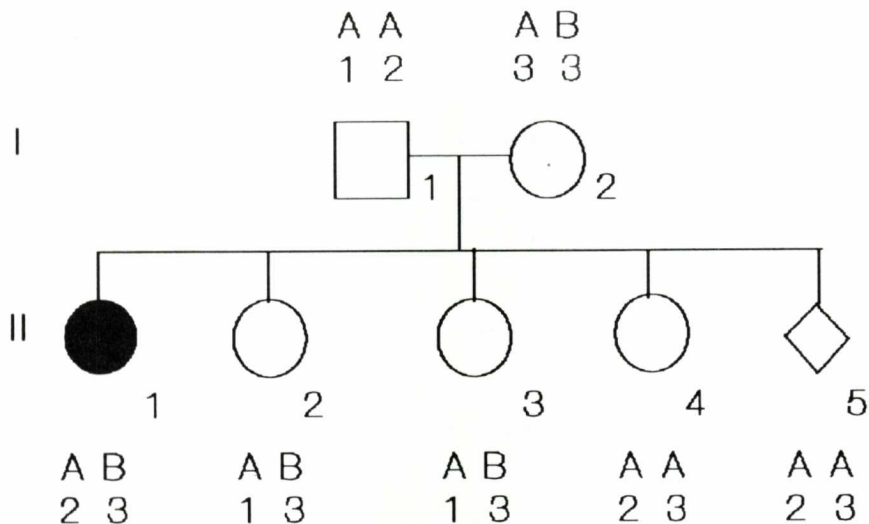


FIGURA 2. Esquema representatiu de la segregació de dos marcadors polimòrfics del DNA lligats a un gen amb una herència autosòmica recessiva. La malalta, II-1, té dues mutacions patològiques al gen, l'una al d'origen patern (haplotip A-2) i l'altra al d'origen matern (haplotip B-3). Les dues germanes, II-2 i II-3, són portadores sanes per haver heretat l'haplotip matern que segrega amb la mutació, mentre que la germana II-4 i el fetus sobre el qual s'ha fet un diagnòstic prenatal II-5, són portadors sans perquè tot dos han rebut l'haplotip que segrega amb la mutació en el pare.

gueix el gen mutant al llarg de les segregacions meiotiques ve determinada per la seua distància respecte al gen. Durant la meiosi es produeix la recombinació entre cromosomes homòlegs, de tal manera que un marcador i el gen al qual està lligat es poden dissociar per un entrecreuament. Tanmateix, a més proximitat entre el marcador i el gen, més improbable és que un entrecreuament els separe. La mida entre un marcador i el gen en qüestió es basa en l'anàlisi de les freqüències d'entrecreuaments entre tots dos, després d'estudiar un nombre suficient de meiosis. Un marcador amb una freqüència de recombinació de l'1 % (una distància genètica d'un centiMorgan –la unitat que fem servir els genètics–) ens indica una sòlida vinculació entre marcador i gen, al mateix temps és útil per al diagnòstic molecular.

L'ANÀLISI MUTACIONAL: EL DIAGNÒSTIC DIRECTE DE LES LESIONS MOLECULARS

Evidentment, des del punt de vista diagnòstic i etiopatogènic, l'objectiu final és trobar la mutació causant de la malaltia. Aquesta mutació és el millor «marcador» de què disposem per a fer diagnòstics de tot tipus en una família.

De mutacions n'hi ha de moltes classes: 1) Delecions del DNA que van des d'unes quantes bases nucleotídiques –cas de la mutació F508, que comporta la pèrdua del codó 508 que codifica per a la fenilalanina, en la fibrosi quística (Kerem *et al.*, 1989)–, fins a delecions d'exons sencers com ocorre en la distròfia muscular de Duchenne (Koenig *et al.*, 1987); 2) duplicacions com és el cas de la neuropatia de Charcot-Marie-Tooth tipus 1 (Raeymaekers *et al.*, 1991); 3) mutacions puntuals, que afecten la transcripció, el garbellatge de l'RNA, l'engra-

natge (*splicing*) de l'RNA o bé la traducció (Gelherter i Collins, 1990); 4) increments en el nombre d'unitats dels trinucleòtids inestables, com ocorre en la distròfia miotònica (Figura 3) (Pizzuti *et al.*, 1993) o la malaltia de Huntington (*The Huntington's disease collaborative research group*, 1993).

L'anàlisi directa de mutacions depèn del fet que el gen haja sigut aïllat i, en gran mesura, seqüenciat, i de la variabilitat o heterogeneïtat al·lèlica que rau en la patologia molecular de la malaltia. Encara que el gen haja sigut seqüenciat i clonat, si el nombre de mutacions és molt gran, és prou difícil que es puga estudiar la mutació en tots els casos. En aquests malalts, hem de confiar, una altra vegada, amb l'anàlisi indirecta amb marcadors polimòrfics.

QÜESTIONS ACTUALS I EL FUTUR IMMEDIAT

La biologia molecular i la tecnologia del DNA recombinant han obert un camp immens, nou, a la medicina genètica (Weatherall, 1993). El mapa genòmic humà és una realitat. En un futur no gaire llunyà es disposarà de la cartografia i la seqüenciació de la totalitat dels 3.000 milions de bases nucleotídiques del genoma humà. El nombre de malalties de les quals es coneix la patologia molecular és ja molt gran, però encara hi ha molt de camí per a córrer i no és prou tenir a mà el gen causant de la malaltia. També és fonamental saber de quina manera una mutació condiciona tota una alteració funcional d'un determinat sistema orgànic. D'altra banda, és evident que les malalties amb herència mendeliana estan tenint un gran suport de la investigació biomèdica, gràcies, sobretot, al fet que són malalties que s'hereten amb un patró conegut. D'un altre costat, però, hi ha les malalties amb una base genètica però que no tenen un patró

estrictament mendelià. Són malalties comuns, poligèniques, com la diabetis mellitus, la hipertensió arterial, l'arteriosclerosi o les malformacions congènites. Finalment, el càncer, que té, per definició, una base genètica. En determinats exemples, està clarament establert que alguns tumors, com és el cas del retinoblastoma (Lasko *et al.*, 1991), es tracta de malalties amb una herència mendeliana. Tanmateix, la majoria de vegades són processos no estrictament hereditaris sinó gairebé multifactorials. Això vol dir

que la seua anàlisi requereix models d'aproximació distints als normalment utilitzats per a les malalties monogèniques. Tot i això, per a un gran nombre de malalties mendelianes o tumorals, avui es disposa d'un diagnòstic molecular. Encara manquen, però, respostes a qüestions fonamentals. En eixe sentit no sempre, i això ocorre molt sovint, les bases biològiques i fisiopatològiques són conegudes malgrat la disponibilitat de gran informació genètica i molecular. D'una altra banda, i ja en el camp terapèutic, els esforços

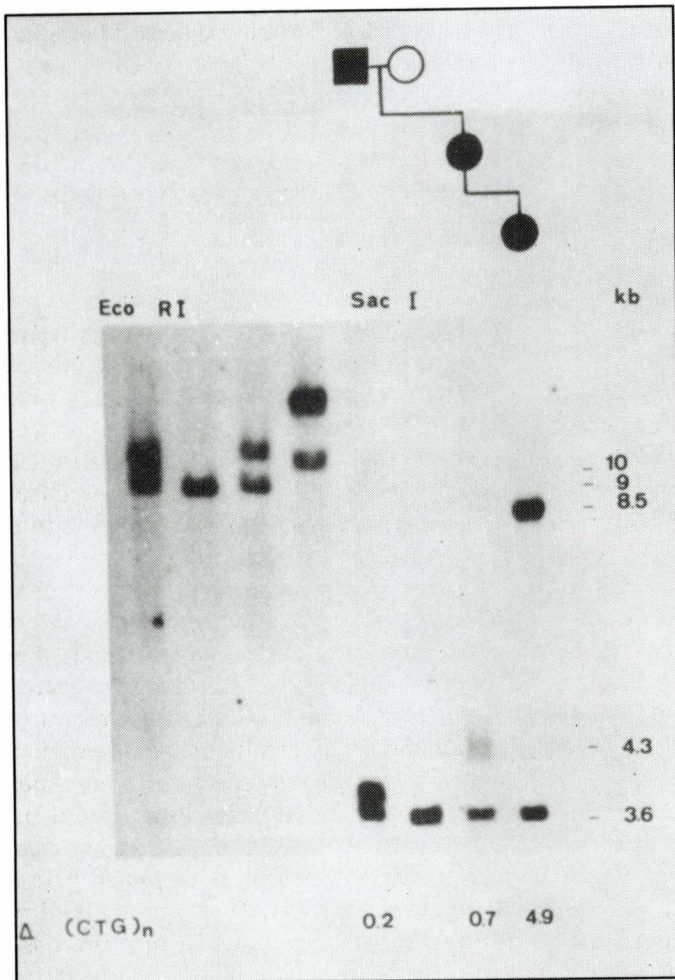


FIGURA 3. Anàlisi de *Southern* d'una família de tres generacions amb distròfia miotònica. El DNA de cada individu s'havia digerit amb dos enzims, *EcoRI* i *SacI*, i la hibridació es va fer amb la sonda p5B1.4. En el lateral dret s'indica la grandària dels fragments en kilobases (Kb). Sota s'indiquen els increments de la seqüència inestable CTG en cada portador de la mutació. S'aprecia com l'increment és major en descendir de generació, la qual cosa té una correlació amb l'expressió clínica de la malaltia.

encaminats cap la curació d'aquestes malalties encara no han produït gaires resultats. Els pacients i els familiars són molt sensibles a tots els descobriments que els mitjans de comunicació ofereixen avui en dia; però totes les esperances es veuen una mica trenca-des per la manca d'una terapèutica eficaç. Un dels futurs camps d'investigació, per tant, està orientat cap a la teràpia gènica. Aquesta és un camp en desenvolupament, però que encara està en els seus inicis i ha de dur-nos moltes sorpreses en un futur no gaire llunyà.

BIBLIOGRAFIA

- ANTONARAKIS, S. E. (1988). «Diagnosis of genetic disorders at the DNA level». *N. Engl. J. Med.*, núm. 320, pàg. 153-163.
- COLLINS, F. S. (1992). «Positional cloning: Let's not call it reverse anymore». *Nature Genet.*, núm. 1, pàg. 3-6.
- GELEHRTER, T. D.; F. S. COLLINS [ed.] (1990). *Principles of Medical Genetics*. Baltimore: Williams & Wilkins, pàg. 97-158.
- KEREM, B.; J. M. ROMMENS; J. A. BUCHANAN; D. MARKIEWICZ; T. K. COX; A. CHAKRAVATI; M. BUCHWALD; L.-C. TSUI (1989). «Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic analysis». *Science*, núm. 245, pàg. 1073-1080.
- KOENING, M.; E. P. HOFFMAN; C. J. BERTELSON; A. P. MONACO; C. FEENER; L. M. KUNKEL (1987). «Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals». *Cell*, núm. 50, pàg. 509-517.
- LASKO, D.; W. K. CAVENEE; M. NORDENSKJÖLD (1991). «Loss of constitutional heterozygosity in human cancer». *Annu. Rev. Genet.*, núm. 25, pàg. 281-314.
- PIZZUTI, A.; D. L. FRIEDMAN; C. T. CASKEY (1993). «The myotonic dystrophy gene». *Arch. Neurol.*, núm. 50, pàg. 1173-1179.
- RAEYMAEKERS, P.; V. TIMMERMAN; E. NELIS; *et al.* (1991). «Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT 1a)». *Neuromus. Disorders*, núm. 1, pàg. 93-97.
- THE HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP. (1993). «A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable of Huntington's disease chromosomes». *Cell*, núm. 72, pàg. 971-983.
- WEATHERALL, D. J. [ed.] (1991). *The New Genetics and Clinical Practice*. 3a ed. Oxford: Oxford University Press, pàg. 310-346.
- WEBER J. L.; P. E. MAY (1989). «Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction». *Am. J. Human. Genet.*, núm. 44, pàg. 388-396.