



Anomalías cromosómicas en el hiperparatiroidismo: utilidad de la hibridación genómica comparada en el estudio de las hiperplasias paratiroides

S. Afonso¹, J. C. Cigudosa⁴, I. Santamaría², A. Otero¹, J. Menárguez³ y J. L. García Miranda¹

¹Sección de Citogenética. Hospital Universitario de Canarias. Tenerife. ²Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral. Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo. ³Servicio de Patología. Hospital Gregorio Marañón. Madrid. ⁴Unidad de Citogenética. Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas. Madrid.

RESUMEN

Las anomalías genéticas responsables de la patogenia del hiperparatiroidismo primario y secundario se desconocen casi por completo, sobre todo las que subyacen al comportamiento autónomo y refractario a tratamiento de las glándulas paratiroides de pacientes urémicos con hiperplasia glandular y crecimiento nodular.

La hibridación genómica comparada, una técnica de citogenética molecular basada en técnicas de hibridación in situ fluorescente de doble color, permite realizar un análisis global de las ganancias y pérdidas de material genómico, siendo así una potente herramienta de estudio al permitir identificar zonas inestables genéticamente y cuya alteración podría modificar la expresión de uno o varios genes responsables de la patogenia en estudio.

Los resultados sobre glándulas con hiperparatiroidismo primario han permitido establecer una serie de cambios cromosómicos, que se corresponden en gran medida a zonas en las que se localizan genes cuya implicación en el hiperparatiroidismo primario ya había sido demostrada. Se han podido detectar también una gran acumulación de aberraciones cromosómicas en glándulas provenientes de enfermos con hiperparatiroidismo secundario severo, y si bien en algunos casos estas aberraciones son comunes a las descritas en el hiperparatiroidismo primario, una gran parte de ellas aparecen en regiones específicas para esta patogenia y en distinta proporción.

Palabras clave: CGH. Hiperparatiroidismo. Anomalías genéticas. Insuficiencia renal crónica.

GENETIC ABNORMALITIES ON HYPERPARATHYROIDISM: COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION IN THE STUDY OF PARATHYROID HYPERPLASIAS

SUMMARY

Genetic abnormalities responsible for primary (pHPT) and secondary hyperparathyroidism (sHPT) are not well described, especially those underlying the auto-

Correspondencia: Sandra Afonso Hernández
Sección de Citogenética
Hospital Universitario de Canarias
Ofra, s/n. La Cuesta
38320 La Laguna. Santa Cruz de Tenerife. Islas Canarias
E-mail: msafonso@ull.es

nomous and refractory behaviour of glands from uremic patients with glandular hyperplasia and nodular growth.

Comparative Genomic Hybridization (CGH) is a molecular cytogenetic technique based on a double-color in situ fluorescent analysis, allowing a global description of gains and losses of genomic material. It is a useful tool that localizes instable genetic areas whose alteration could modify the expression of one or several genes related to the pathology in study.

Results on primary hyperparathyroidism adenomas have shown a series of genetic changes correlating with areas where genes related to pHPT are located, such as MEN1 and cyclin D1. A large number of chromosomal aberrations in glands from patients with secondary hyperparathyroidism have also been found, and although some of them are common with those described for primary hyperparathyroidism, most of them are located in different areas or in a different proportion. These results confirm that although severe sHPT hyperplasias can evolve into neoplasias similar to pHPT adenomas, both parathyroid alterations must be considered, from a genetic point of view, as unrelated.

Key words: CGH. Hyperparathyroidism. Genetic alterations. Chronic renal failure.

ASPECTOS GENÉTICOS DE LA HIPERPLASIA PARATIROIDEA PRIMARIA Y SECUNDARIA

Las anomalías genéticas en pacientes con hiperparatiroidismo primario (HPT1) y secundario (HPT2) no están todavía del todo establecidas, sobre todo los cambios que subyacen al crecimiento monoclonal en glándulas paratiroides de pacientes urémicos con hiperplasia glandular¹.

Los pacientes con hiperparatiroidismo primario (HPT1) presentan adenomas paratiroides que son tumores monoclonales benignos². También se ha demostrado que la hiperplasia paratiroidea de tipo secundario (HPT2) que presentan los enfermos con insuficiencia renal crónica puede derivar en un crecimiento tumoral de tipo monoclonal benigno, al menos en los casos más severos de HPT2^{3,4}.

La tumorigénesis paratiroidea no está todavía bien caracterizada y estudiada. Se ha demostrado la implicación de gran variedad de anomalías genéticas en la patogénesis de los adenomas paratiroides primarios, incluyendo la reordenación clonal y la sobreexpresión del oncogén de la ciclina D1/PRAD1⁵, pérdidas alélicas en las regiones 1p y 11q, así como deleciones en 6q y 15q⁶. Por otro lado, la pérdida de heterocigosidad de la región 11q13 es característica de pacientes con neoplasia endocrina múltiple de tipo I (MEN1)⁷. Además, la inactivación del gen supresor de tumores que codifica la proteína del retinoblastoma (RB) en 13q14 se encuentra asociada a carcinomas, pero no a adenomas paratiroides⁸.

Las anomalías genéticas implicadas en la patogénesis de tumores monoclonales benignos en pacientes con insuficiencia renal crónica e HPT2 severo todavía se desconocen casi por completo, aunque las alteraciones sobre oncogenes o genes supresores de tumores se barajan como candidatas en la evolución de la hiperplasia policlonal reversible a hiperplasia monoclonal autónoma⁹.

LA HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA COMO HERRAMIENTA DE ESTUDIO

La hibridación genómica comparada (CGH) se describió en 1992¹⁰⁻¹². Se trata de una técnica de citogenética molecular basada en técnicas de hibridación *in situ* fluorescente de doble color que permite realizar un análisis global de las ganancias y pérdidas de material genómico en una única hibridación. Consiste en la hibridación competitiva entre el ADN tumoral y el ADN normal sobre metafases normales en presencia de un exceso de ADN de secuencias repetitivas. El ADN tumoral de las regiones cromosómicas que tienen un número incrementado de copias (ganancias) se une a las metafases proporcionalmente más que el ADN normal, mientras que el ADN de las regiones que estén presentes en un número bajo de copias (pérdidas o deleciones) se une proporcionalmente menos a los cromosomas normales. Previamente, el ADN tumoral y el ADN normal han sido marcados con dos fluorocromos diferentes (generalmente rojo para el ADN normal y

verde para el tumoral) lo que permite su posterior identificación mediante microscopía de fluorescencia. El análisis digital de las metafases capturadas cuantifica la proporción de verde y rojo en todos los cromosomas, de manera que si existe una ganancia de material genómico en una determinada región cromosómica se produce un aumento de la fluorescencia verde a ese nivel y si lo que hay es una pérdida de material genómico se produce una disminución de la fluorescencia verde y por tanto un aumento relativo de la fluorescencia roja. El cariotipaje posterior se realiza sobre la base de técnicas convencionales de bandeado de los cromosomas.

Sus ventajas incluyen la pequeña cantidad de ADN tumoral de partida que es necesario, permitiendo el análisis de neoplasias de bajo índice proliferativo. En cuanto a sus limitaciones, esta técnica únicamente detecta cambios que impliquen la pérdida o ganancia de secuencias de ADN, pero no las traslocaciones recíprocas. Además la resolución máxima se sitúa en 2 Mb para las amplificaciones y en 10-20 Mb para las pérdidas.

ABERRACIONES CROMOSÓMICAS EN EL HIPERPARATIROIDISMO PRIMARIO

El hiperparatiroidismo primario es un desorden endocrino frecuente, caracterizado por un exceso en la producción de hormona paratiroidea (PTH)¹³. Los adenomas esporádicos son la causa de HPT1 en la mayoría de los casos y surgen por una proliferación clonal benigna de células principales paratiroideas¹⁴. Dos genes específicos han sido identificados como participantes en esta patogenia: el oncogén que codifica la ciclina D1/PRAD1¹⁵ y el gen supresor de tumores MEN1¹⁶, sobreexpresados o inactivados en homocigosis, respectivamente, en el 20% de los adenomas esporádicos. Además, estudios alélicos han demostrado frecuentes pérdidas recurrentes en los cromosomas 1, 3, 6, 9 y 15 en adenomas paratiroides^{17,18}, remarcando la posibilidad de que algunos genes supresores de tumores, todavía sin identificar y que contribuyen a la neoplasia paratiroidea, se localicen en esas regiones. Las pérdidas alélicas observadas en la región 13q, que incluye el gen que codifica la proteína del retinoblastoma se han observado más frecuentemente en carcinomas que en adenomas paratiroides¹⁹.

La hibridación genómica comparada sobre glándulas con hiperparatiroidismo primario²⁰⁻²² ha permitido establecer una serie de cambios cromosómicos que se resumen en la figura 1, donde se muestran las alteraciones mínimas recurrentes, definidas éstas como aquellas regiones de menor tama-

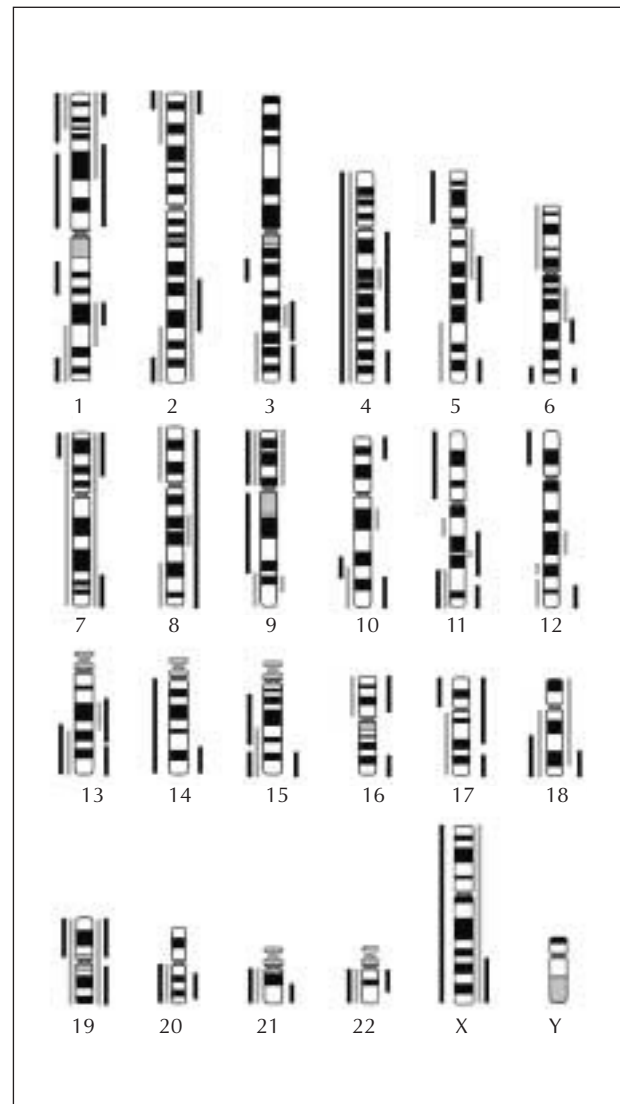


Fig. 1.—Ideograma de un cariotipo humano donde se expresan las alteraciones recurrentes mínimas observadas mediante CGH representadas por líneas verticales. A la izquierda de cada cromosoma se representan las pérdidas de material genético y a la derecha las ganancias. Las líneas negras representan los cambios en adenomas primarios y las grises en neoplasias secundarias de origen renal. (Realizada a partir de los datos publicados en [20-22, 29, 30].)

ño que aparecen implicadas en más de una de las muestras analizadas, estando sus límites definidos por la alteración de menor extensión. Estas alteraciones mínimas recurrentes son una potente herramienta de estudio dado que permiten identificar pequeñas zonas inestables genéticamente en la patología estudiada y cuya alteración podría modificar la expresión de uno o varios genes responsables de la patogenia.

Todos los cromosomas, excepto el cromosoma Y, presentan alguna alteración mínima recurrente (ganancia o pérdida) a lo largo de su extensión. Las anomalías más frecuentes son las pérdidas completas de los cromosomas 11, 13, 15, 22 y X, la pérdida de los brazos cortos del cromosoma 1 y 12 y el largo del 6, así como las ganancias de los cromosomas 16 y 19. Considerando que tanto el gen *MEN1* como *PRAD1* se localizan en la región q13 del cromosoma 11, los datos de CGH parecen confirmar la inestabilidad genética de esta región cromosómica en el hiperparatiroidismo primario y la implicación de estos dos genes en la patogenia.

ABERRACIONES CROMOSÓMICAS EN EL HIPERPARATIROIDISMO SECUNDARIO SEVERO

La hipocalcemia, independientemente de su origen, estimula la secreción de hormona paratiroidea y su efecto crónico es la estimulación del crecimiento de las glándulas paratiroides²³. Este hiperparatiroidismo secundario normalmente se soluciona con el tratamiento de la causa subyacente de la hipocalcemia. Pero en pacientes con insuficiencia renal crónica, el HPT2 es más prolongado y severo que en pacientes con otros desórdenes hipocalcémicos, como la deficiente o nula absorción de vitamina D. Incluso, en algunas ocasiones, tras la restauración de la función renal normal por medio de un trasplante funcionante, el hiperparatiroidismo secundario puede evolucionar hacia hiperparatiroidismo secundario severo o terciario, presentando elevados niveles de secreción de hormona junto con hipercalcemia²⁴. Esta hipercalcemia en pacientes urémicos con HPT2 severo refleja una disfunción secretora de células paratiroides funcionando de forma autónoma y refractaria a tratamiento, que se corresponde con un crecimiento tisular oligoclonal o monoclonal.

A diferencia de lo que ocurre en el HPT1, no se han encontrado genes implicados directamente en la patogenia del HPT2²⁵; de esta forma, no se ha encontrado pérdida de heterocigosidad representativa en la región donde mapea el gen *MEN1* ni sobreexpresión de ciclina D1^{26,27}. Y aunque se ha observado que la expresión del sensor-receptor de calcio y del receptor de la vitamina D está disminuida en glándulas hiperplásicas con crecimiento monoclonal, no se han podido establecer alteraciones representativas en estos genes²⁸.

Mediante CGH podemos observar una gran acumulación de aberraciones cromosómicas en glándulas provenientes de enfermos con hiperparatiroidis-

mo secundario severo^{29,30} (fig. 1). Si bien en algunos puntos las aberraciones cromosómicas mínimas recurrentes son comunes a las descritas en el HPT1, una gran parte de ellas aparecen en regiones específicas para esta patogenia y en distinta proporción. De esta forma, si bien son frecuentes la pérdida del brazo corto del cromosoma 1 y el cromosoma 22 en su totalidad, tal y como ocurre en HPT1, aparecen frecuentemente ganancias del cromosoma 5, 6 y 12 y pérdidas de los cromosomas 16, 17, 18, 19 y 20 en un gran porcentaje de los casos. Curiosamente, aunque algunos autores han descrito pérdida de heterocigosidad en la región donde se localizan los genes que codifican el sensor-receptor de calcio (3q13.3-24) y el receptor de la vitamina D (12q12-14), no se observan alteraciones detectables mediante CGH en dichas zonas.

CONSIDERACIONES FINALES

Las glándulas paratiroides en los estadios tempranos de la insuficiencia renal crónica sufren un proceso de hiperplasia generalizada multiglandular de tipo policlonal en respuesta a estímulos del tipo de hipocalcemia crónica, bajos niveles en suero de vitamina D e hiperfosfatemia. Sin embargo, los pacientes que desarrollan hiperparatiroidismo secundario severo muestran un desorden neoplásico caracterizado por un crecimiento monoclonal. Esta neoplasia paratiroidea refractaria a tratamiento parece no estar condicionada por los mismos factores genéticos que intervienen en la neoplasia paratiroidea del HPT1 de origen adenomatoso, como ya han indicado los estudios sobre los genes *MEN1* y ciclina D1, máximos condicionantes de la hiperplasia primaria.

Se podría hipotetizar que la patogénesis de las neoplasias paratiroides secundarias es equivalente a la de los adenomas paratiroides primarios, ya que en ambos casos se trata de tumores monoclonales benignos sobre el mismo tejido con una respuesta hormonal alterada al calcio extracelular. Aunque algunos aspectos clave pueden ser compartidos en ambos procesos, las diferencias observadas en los patrones de ganancias y pérdidas cromosómicas de origen clonal sugieren que estos tumores aparecen y se desarrollan por mecanismos oncogénicos diferentes. Un hecho diferencial que puede ser de gran importancia es que si bien la activación de la proliferación es previa a la monoclonalidad en las hiperplasias secundarias, no ocurre lo mismo en las alteraciones primarias, donde los cambios dirigidos al aumento de la proliferación son necesarios para el comienzo del crecimiento clonal.

La combinación del proyecto genoma humano con las técnicas de CGH es capaz de localizar una serie de genes importantes en la progresión del hiperparatiroidismo primario y secundario en zonas recurrentes de alteración clonal. Futuros estudios que completen los disponibles hasta la fecha podrían servir para el clonaje posicional de genes localizados en las zonas de alteración recurrente y cuya función debiera ser estudiada en detalle, al poder servir como dianas terapéuticas en el tratamiento de estas alteraciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Marx SJ: Hyperparathyroid and hypoparathyroid disorders. *N Engl J Med* 343: 1863-1875, 2000.
2. Arnold A, Staunton CE, Kim HG, Gaz RD, Kronenberg HM: Monoclonality and abnormal parathyroid hormone genes in parathyroid adenomas. *N Engl J Med* 318: 658-662, 1988.
3. Tominaga Y: Mechanism of parathyroid tumorigenesis in uraemia. *Nephrol Dial Transplant* 14 (Supl. 1): 63-65, 1999.
4. Tominaga Y, Kohara S, Namii Y, Nagasaka T, Haba T, Uchida K, Numano M, Tanaka Y, Takagi H: Clonal analysis of nodular parathyroid hyperplasia in renal hyperparathyroidism. *World J Surg* 20: 744-750; discussion 750-742, 1996.
5. Mallya SM, Arnold A: Cyclin D1 in parathyroid disease. *Front Biosci* 5: D367-371, 2000.
6. Arnold A, Shattuck TM, Mallya SM, Krebs LJ, Costa J, Gallagher J, Wild Y, Saucier K: Molecular pathogenesis of primary hyperparathyroidism. *J Bone Miner Res* 17 (Supl. 2): N30-36, 2002.
7. Falchetti A, Bale AE, Amorosi A, Bordi C, Cicchi P, Bandini S, Marx SJ, Brandi ML: Progression of uremic hyperparathyroidism involves allelic loss on chromosome 11. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 139-144, 1993.
8. Dotzenrath C, Teh BT, Farnebo F, Cupisti K, Svensson A, Toell A, Goretzki P, Larsson C: Allelic loss of the retinoblastoma tumor suppressor gene: a marker for aggressive parathyroid tumors? *J Clin Endocrinol Metab* 81: 3194-3196, 1996.
9. Silver J, Kilav R, Naveh-Many T: Mechanisms of secondary hyperparathyroidism. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F367-376, 2002.
10. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D: Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258: 818-821, 1992.
11. Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D: Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 10: 231-243, 1994.
12. Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D: Comparative genomic hybridization: a rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors. *Semin Cancer Biol* 4: 41-46, 1993.
13. Brown EM: The pathophysiology of primary hyperparathyroidism. *J Bone Miner Res* 17 (Supl. 2): N24-29, 2002.
14. Carling T: Molecular pathology of parathyroid tumors. *Trends Endocrinol Metab* 12: 53-58, 2001.
15. Imanishi Y, Hosokawa Y, Yoshimoto K, Schipani E, Mallya S, Papanikolaou A, Kifor O, Tokura T, Sablosky M, Ledgard F, Gronowicz G, Wang TC, Schmidt EV, Hall C, Brown EM, Bronson R, Arnold A: Primary hyperparathyroidism caused by parathyroid-targeted overexpression of cyclin D1 in transgenic mice. *J Clin Invest* 107: 1093-1102, 2001.
16. Miedlich S, Krohn K, Lamesch P, Muller A, Paschke R: Frequency of somatic MEN1 gene mutations in monoclonal parathyroid tumours of patients with primary hyperparathyroidism. *Eur J Endocrinol* 143: 47-54, 2000.
17. Dwight T, Twigg S, Delbridge L, Wong FK, Farnebo F, Richardson AL, Nelson A, Zedenius J, Philips J, Larsson C, Teh BT, Robinson B: Loss of heterozygosity in sporadic parathyroid tumours: involvement of chromosome 1 and the MEN1 gene locus in 11q13. *Clin Endocrinol (Oxf)* 53: 85-92, 2000.
18. Thompson DB, Samowitz WS, Odelberg S, Davis RK, Szabo J, Heath H, 3rd: Genetic abnormalities in sporadic parathyroid adenomas: loss of heterozygosity for chromosome 3q markers flanking the calcium receptor locus. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 3377-3380, 1995.
19. Cryns VL, Thor A, Xu HJ, Hu SX, Wierman ME, Vickery AL, Jr., Benedict WF, Arnold A: Loss of the retinoblastoma tumor-suppressor gene in parathyroid carcinoma. *N Engl J Med* 330: 757-761, 1994.
20. García JL, Tardío JC, Gutiérrez NC, González MB, Polo JR, Hernández JM, Menárguez J: Chromosomal imbalances identified by comparative genomic hybridization in sporadic parathyroid adenomas. *Eur J Endocrinol* 146: 209-213, 2002.
21. Hemmer S, Wasenius VM, Haglund C, Zhu Y, Knuutila S, Franssila K, Joensuu H: Deletion of 11q23 and cyclin D1 overexpression are frequent aberrations in parathyroid adenomas. *Am J Pathol* 158: 1355-1362, 2001.
22. Dwight T, Nelson AE, Theodosopoulos G, Richardson AL, Leary DL, Philips J, Delbridge L, Zedenius J, Teh BT, Larsson C, Marsh DJ, Robinson BG: Independent genetic events associated with the development of multiple parathyroid tumors in patients with primary hyperparathyroidism. *Am J Pathol* 161: 1299-1306, 2002.
23. Slatopolsky E, Brown A, Dusso A: Pathogenesis of secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int* (Supl. 73): S14-19, 1999.
24. Rodríguez M, Canalejo A, Garfia B, Aguilera E, Almadén Y: Pathogenesis of refractory secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int* 61 (Supl. 80): 155-160, 2002.
25. Chudek J, Ritz E, Kovacs G: Genetic abnormalities in parathyroid nodules of uremic patients. *Clin Cancer Res* 4: 211-214, 1998.
26. Shan L, Nakamura Y, Murakami M, Nakamura M, Naito A, Kawahara K, Utsunomiya H, Mori I, Kakudo K: Clonal emergence in uremic parathyroid hyperplasia is not related to MEN1 gene abnormality. *Jpn J Cancer Res* 90: 965-969, 1999.
27. Nagy A, Chudek J, Kovacs G: Accumulation of allelic changes at chromosomes 7p, 18q, and 2 in parathyroid lesions of uremic patients. *Lab Invest* 81: 527-533, 2001.
28. Brown SB, Brierley TT, Palanisamy N, Salusky IB, Goodman W, Brandi ML, Druke TB, Sarfati E, Urena P, Chaganti RS, Pike JW, Arnold A: Vitamin D receptor as a candidate tumor-suppressor gene in severe hyperparathyroidism of uremia. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 868-872, 2000.
29. Imanishi Y, Tahara H, Palanisamy N, Spitalny S, Salusky IB, Goodman W, Brandi ML, Druke TB, Sarfati E, Urena P, Chaganti RS, Arnold A: Clonal chromosomal defects in the molecular pathogenesis of refractory hyperparathyroidism of uremia. *J Am Soc Nephrol* 13: 1490-1498, 2002.
30. Afonso S, Santamaría I, García-Miranda JL, Guinsburg ME, Jofré R, Otero-Gómez A, Menárguez J, Cannata-Andía JB, Cigudosa JC: Chromosomal aberrations, the consequences of refractory hyperparathyroidism: its relationship with biochemical parameters. *Kidney Int* (in press).