

## Conferencia Inaugural

---

### Avances en la genética molecular de las enfermedades de la infancia

E. COTO GARCÍA, V. ÁLVAREZ MARTÍNEZ

*Laboratorio de Genética Molecular, Hospital Central de Asturias, Oviedo.*

#### INTRODUCCIÓN

Un porcentaje significativo de los pacientes pediátricos tienen enfermedades de origen genético. Éstas se deben a mutaciones en alguno de los aproximadamente 30 mil genes humanos, y pueden ser reconocidas por su segregación familiar de forma dominante, recesiva, o ligada al sexo. La mayoría de las enfermedades hereditarias de manifestación precoz siguen una herencia recesiva (de padres portadores sanos pueden nacer hijos afectados con una probabilidad del 25%) o ligada al sexo (la mutación se localiza en un gen del cromosoma X, del que los varones sólo tienen una copia). Entre estas enfermedades las hay que afectan a órganos específicos, mientras que otras tienen carácter multisistémico. En cuanto a la severidad, las hay muy graves, incluso con muerte perinatal, mientras que en otros casos los pacientes pueden alcanzar la edad adulta y mantener una calidad de vida aceptable.

Una característica general de la mayoría de las enfermedades hereditarias, incluidas las infantiles, es su heterogeneidad clínica. Contrariamente a lo que cabría esperar tratándose de alteraciones en un gen concreto, los pacientes con la misma enfermedad pueden presentar manifestaciones clínicas muy diferentes. Esta heterogeneidad puede deberse, en parte, a la existencia de más de un gen implicado en la misma enfermedad, estando condicionados los síntomas por el gen mutado. En esta situación se hallan enfermedades, como el síndrome de Bartter, para el que se han reconocido al menos tres genes, o las nefronoptosis, para las que hay varios genes. Cuando dos pacientes presentan

alteraciones en el mismo gen, el tipo de mutación puede condicionar las diferencias fenotípicas, y podremos entonces hablar de mutaciones benignas y malignas. Pero no es infrecuente que dos pacientes con la misma mutación, incluso dentro de la misma familia, tengan manifestaciones clínicas diferentes.

En los tres últimos años hemos asistido a descubrimientos espectaculares en el campo de la genómica. Además del conocimiento de la secuencia completa de nuestro genoma, con sus aproximadamente 30 mil genes, se han producido dos hechos trascendentales para la identificación de la base genética de las enfermedades y la posterior investigación farmacológica: la secuenciación de los genomas del ratón y de la rata. Con estas herramientas podremos llegar a determinar las bases moleculares de cualquier enfermedad hereditaria o con un componente de susceptibilidad genética, identificando el gen o genes implicados y las mutaciones en las secuencias, responsables de la enfermedad en cada paciente de cada familia. Esto nos debe permitir un diagnóstico certero de la enfermedad, y en un futuro más o menos próximo podríamos disponer de algunas terapias dirigidas a tratar estas enfermedades, que se beneficiarían de la investigación genómica. Debemos tener en cuenta que un gen mutado implica una proteína anormal, que podría ser una diana farmacológica para el tratamiento de la enfermedad. Una vez conocido el genoma humano (la secuencia de todos los genes) queda por identificar el proteoma (la secuencia y estructura de todas las proteínas), que sería en último término el objetivo de la intervención farmacológica.

En esta revisión trataremos los aspectos más recientes de la genética molecular de algunas enfermedades pediátricas, y finalmente trataremos de dar una visión del presente y el previsible futuro de la medicina molecular aplicada al campo de la pediatría.

#### POLYQUISTOSIS RENAL AUTONÓMICA Y RECESIVA

Esta enfermedad se caracteriza por un engrosamiento de los túbulos colectores y una disgénesis biliar, lo que causa un fallo renal y hepático. El gen implicado (PKHD1) fue localizado en el brazo corto del cromosoma 6 hace varios años, pero no pudo ser identificado hasta el año 2002. Para ello fue fundamental el análisis de una línea de ratas, con una forma recesiva de poliquistosis renal similar a la humana. El gen responsable (mutado) era conocido en la rata, por lo que se suponía que el homólogo humano podría ser el gen PKHD1. Una vez secuenciado el genoma humano se pudo identificar cual de los 30 mil genes humanos era ese homólogo. Este gen se hallaba en el cromosoma 6, y su análisis en varios pacientes poliquísticos mostró la presencia de mutaciones.

El PKHD1 es un gen muy grande (tiene unos 67 exones) y codifica un ARN mensajero de unas 16 kilobases, que se expresa en tejidos renales, hepáticos y pancreáticos, tanto fetales, como adultos. El gen codifica una proteína designada como fibrocistina, que podría actuar como un receptor necesario para la diferenciación del tejido de los túbulos colectores renales y biliares.

En un análisis reciente de 47 pacientes poliquísticos de otras tantas familias de Estados Unidos y España (fundamentalmente de Asturias, Madrid y Barcelona) se identificaron 57 mutaciones, y en 22 pacientes se hallaron las dos mutaciones. Entre éstas hay deleciones de uno o unos pocos nucleótidos, cambios de una base por otra que cambian el aminoácido o introducen codones de parada; es decir, ejemplos de todo el espectro mutacional posible, sin que haya una mutación particularmente frecuente (como es por ejemplo el caso de la DF508 en la fibrosis quística, o la deleción en el gen de la nefrocistina). En general, podemos concluir que la probabilidad de hallar mutaciones en el gen PKHD1 es alta (85%) en pacientes con formas severas, moderada (42%) en pacientes con formas moderadas de la poliquistosis renal, y baja pero significativa (32%) en los pacientes con fibrosis hepática congénita como manifestación clínica pre-

dominante. Esto permite diagnosticar la enfermedad sin ambigüedad en muchos casos, aunque el enorme tamaño de este gen hace que el análisis genético esté al alcance de muy pocos laboratorios. Por otro lado, queda por resolver si los pocos pacientes en los que no se han hallado mutaciones, las tienen en alguna región de PKHD1 fuera de la secuencia codificadora o hay, al menos, otro gen que puede estar mutado en los pacientes poliquísticos.

#### NEFRONOPTISIS

La nefronoptisis (NP) es una enfermedad autonómica y recesiva. Actualmente se conocen cuatro regiones cromosómicas que deben albergar genes que estarían mutados en los pacientes NP. La mayoría de los casos con NP pura se deben a mutaciones en el gen NPHP1, situado en el brazo largo del cromosoma 2. Muchos pacientes con afectación retiniana además de renal (síndrome de Senior-Locken) no tienen mutaciones en este gen. El NPHP1 codifica la nefrocistina, una proteína que formaría parte de los complejos de adhesión que anclan las células a la matriz extracelular. Hay varias mutaciones en este gen en pacientes con NP pura, pero la más frecuente es una deleción de unas 250 kilobases para la que muchos pacientes son homocigotos. En estos casos se puede diagnosticar la enfermedad confirmando la ausencia de esa región genómica en los pacientes. Para ello basta con analizar, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un fragmento de la secuencia del gen NPHP1 a partir del ADN de unos pocos mililitros de sangre. La ausencia de un fragmento de amplificación indica la presencia de la mutación en homocigosis, evitando en su caso la biopsia. En los casos en los que la PCR da un fragmento, podría haber una copia con la deleción y la otra con una mutación puntual (un cambio de un solo nucleótido por otro, o una deleción de uno o unos pocos nucleótidos), o dos mutaciones puntuales en ambos cromosomas. Para determinar este extremo sería necesario secuenciar el gen NPHP1 en los enfermos. Algunos pacientes homocigotos para la deleción desarrollan retinosis pigmentaria tardía, aunque la mayoría sólo manifiestan afectación renal.

Además del gen NPHP1, deben existir, al menos, otros 3 genes para la NP, de los que sólo se conoce el de la región 1p36. Éste codifica la nefroretinina y se han descrito pacientes con NP y retinosis pigmentaria que tienen mutadas las

dos copias de este gen. Las mutaciones se describieron inicialmente en los pacientes de dos familias de Turquía y Alemania. En esta última se pudo comprobar que los padres estaban emparentados a través de dos hermanos que habían vivido en el siglo XVII, lo que ilustra la frecuente relación de estas enfermedades con la endogamia.

Las otras dos formas familiares de NP se deberían a mutaciones en genes de los cromosomas 9 y 3. El ligamiento al cromosoma 9 ha sido hallado en una familia beduina con 11 pacientes hijos de seis parejas endogámicas, mientras que el del cromosoma 3 se halló en una familia endogámica de los Andes venezolanos con 13 pacientes.

### SÍNDROME DE GITELMAN

El síndrome de Gitelman (SG) es una enfermedad renal autónoma y recesiva que se caracteriza por una hipomagnesemia asociada a una secreción elevada de magnesio en la orina, además de por una alcalosis hipocalémica metabólica e hipercalciuria. Hasta hace poco se consideraba que el SG era una variante del síndrome de Bartter, pero actualmente sabemos que las dos enfermedades tienen bases genético-moleculares diferentes. El gen del SG fue inicialmente localizado en el brazo corto del cromosoma 16, y posteriormente identificado como el gen que codifica el cotransportador de sodio-cloro sensible a la tiazida (NCCT; el gen se designa también como TSC y SLC12A3). Por su parte, hay tres genes que pueden estar mutados en los pacientes con el síndrome de Bartter: el del cotransportador Na-K-2Cl (NKCC2), el del canal renal de potasio (ROMK), o el del canal renal de cloruro (CLCNKB). Las mutaciones en estos genes diferentes explican la heterogeneidad fenotípica entre los dos síndromes, como las manifestaciones clínicas más leves y de manifestación más tardía en el SG.

El gen NCCT tiene 26 exones que codifican una proteína con 12 dominios transmembrana y con los dominios amino y carboxilo terminales intracelulares, una estructura típica de canales celulares para el trasiego iónico. Se han identificado varias mutaciones en este gen en pacientes con SG, que pueden ser heterocigotos u homocigotos para la misma mutación. Con frecuencia estos últimos son hijos de parejas endogámicas. Hasta ahora no se había descrito ninguna mutación que fuese significativamente más frecuente que las otras.

Recientemente hemos identificado una mutación en el gen NCCT que sería característica de los pacientes gitanos con SG. Esta mutación fue hallada inicialmente en dos gitanos españoles, hijos de sendas parejas endogámicas. Posteriormente fue identificada en los hijos de otras 9 parejas gitanas, sumando un total de 17 pacientes homocigotos para la misma mutación. Estos pacientes eran españoles, portugueses, alemanes, y franceses, por lo que estaríamos ante una mutación característica de la etnia gitana. La mutación consiste en un cambio de G por A en el primer nucleótido del intrón 9, siendo la presencia de la guanina esencial para que tenga lugar un procesamiento correcto del ARN total: en este caso se eliminan los intrones para dar el ARN mensajero, en el que aparecen los exones como secuencia contigua que es leída en el ribosoma para sintetizar la proteína. El cambio de G por A daría lugar a un ARNm y una proteína anómalas, y debemos asumir que surgió hace varias generaciones en algún antepasado común a todos los portadores. El hecho de que la mutación esté presente en pacientes de zonas geográficas muy diversas, sugiere también que debe ser bastante antigua, probablemente anterior a la diversificación de las diferentes poblaciones gitanas europeas (aunque queda por determinar su presencia en los pacientes de las poblaciones del este de Europa, que serían las de implantación más antigua de la etnia en este continente).

Del análisis de las características clínicas en los 17 casos pudimos valorar la heterogeneidad clínica entre pacientes con la misma mutación. Entre estos pacientes los había con síntomas característicos de una forma leve de SG, mientras que otros casos no tenían síntomas aparentes, de forma que la hipomagnesemia y la hipocalcemia habían pasado desapercibidas. Estos últimos casos fueron identificados por ser homocigotos para la mutación. Cuatro de los 17 pacientes tenían un retraso significativo del crecimiento. A partir de nuestros resultados podemos concluir que, ante una sospecha clínica de SG en un paciente de etnia gitana, debería estudiarse la presencia de esta mutación en el gen NCCT, ya que es muy probable que, de tratarse de un caso de Gitelman, sea homocigoto para la mutación en el intrón 9.

### SÍNDROME DEL CROMOSOMA X FRÁGIL

El síndrome X-frágil constituye la causa más común de retraso mental hereditario con una prevalencia aproxima-

da de 1:4.000 en varones y 1:8.000 en mujeres. Es una patología ligada al cromosoma X, dominante, pero con penetrancia incompleta y forma parte de un grupo de patologías neurológicas cuya base genética es una inestabilidad del ADN, debida a la expansión de secuencias repetitivas del ADN. El síndrome del X frágil consiste (en el 99% de los casos) en una expansión anormal (mutación dinámica) de un triplete de nucleótidos CGG localizado en la zona 5' no traducida (UTR) de un gen denominado FMR1. En la población normal el número de repeticiones del triplete CGG es variable (polimórfico) y oscila entre 6 y 50 repeticiones. Cuando se produce una expansión hasta 200 repeticiones se habla de alelos premutados que son aquellos que portan los progenitores sanos de los pacientes con síndrome del X frágil. Un número de repeticiones del triplete CGG superior a 200 (mutación completa) induce una hipermetilación del promotor del gen FMR1 y la ausencia total de expresión de la proteína, dando lugar a la aparición de la patología.

Como todas las patologías debidas a una inestabilidad del ADN, el síndrome del X frágil se caracteriza por la existencia anticipación genética, que se refleja en que el número de individuos afectados y el grado de retraso mental aumentan de generación en generación. Esta anticipación es consecuencia de la existencia de una inestabilidad intergeneracional del tamaño del triplete que tiende a aumentar de tamaño durante la gametogénesis. Sin embargo, sólo durante la oogénesis se produce la expansión de alelo premutado a alelo con mutación completa. Así, un varón portador de un alelo premutado nunca transmitirá la enfermedad a sus descendientes directos. Además, se sabe que pacientes con mutación completa producen espermatozoides con alelos premutados, y esto es un ejemplo de la inestabilidad somática que acompaña a las enfermedades causadas por una inestabilidad genética. Además, ciertos aspectos del fenotipo clínico (físicos, cognitivos, neuroanatómicos o del comportamiento) se han tratado de correlacionar con el número de repeticiones CGG.

Para el diagnóstico genético del síndrome, antes de la clonación del gen FMR1, se utilizaba el test citogenético (cariotipo) que hoy ha sido prácticamente abandonado en detrimento de las técnicas de análisis genético-molecular, que permiten realizar un diagnóstico rápido y con una fiabilidad del 100%. Esta tecnología molecular permite anali-

zar el número de repeticiones del triplete CGG y el estado de metilación del promotor del gen FMR1 en un individuo, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la digestión sobre ADN genómico con endonucleasas específicas.

Ningún individuo, ya sea varón o mujer con resultado normal en el estudio molecular, tiene riesgo de transmitir la patología a su descendencia. Un varón portador de una premutación transmitirá a todas sus hijas e hijos el alelo premutado. Estas hijas tienen un riesgo del 50% de transmitir el alelo premutado a sus hijos e hijas. Si éstos heredan el alelo premutado serán transmisores sanos, y si heredan un alelo con mutación completa estarán afectados.

Aproximadamente un 25% de los portadores de alelos premutados presentan problemas emocionales o alteraciones físicas muy sutiles. La frecuencia de premutación en la población general es 1:259 para las mujeres, y 1:813 para varones. Un 20% de las portadoras de alelos premutados desarrollan fallo ovárico precoz y, por lo tanto, es importante informar a las portadoras de este riesgo a fin de que puedan planificar en el tiempo su descendencia. Recientemente se ha descrito que los varones portadores de premutación pueden desarrollar, a edades avanzadas, una patología neurológica multisistémica y progresiva, conocida con síndrome de temblor/ataxia, de los alelos premutados del gen FMR1. Esta patología se caracteriza por temblor y ataxia como características prevalentes y también pueden asociarse otros síntomas, como neuropatía periférica, deterioro cognitivo, disfunción autonómica, pérdida de funciones ejecutivas y/o parkinsonismo.

#### SÍNDROME ASOCIADO A LA DELECCIÓN DEL CROMOSOMA 22 (CATCH22)

Bajo este epígrafe se agrupan un conjunto de síndromes con una expresividad clínica muy variada, y entre éstos se encuentran el síndrome de Digeorge (DGS), el síndrome velocardiofacial (VCFS) o el síndrome de Charge. Este cuadro sindrómico presenta, como manifestaciones clínicas más frecuentes, defectos conotruncales y anomalías del arco aórtico, facies anormal, afectación tímica, fisura palatina y retraso mental. Los síntomas de este síndrome son muchos y muy diversos, de tal modo que cada síntoma puede estar o no presente en un individuo afectado, y si esta presente

puede ocurrir con diferentes grados de severidad. Además, muchos pacientes desarrollan déficit del aprendizaje y trastornos del comportamiento, y en la edad adulta se ha descrito una mayor incidencia de esquizofrenia y trastorno bipolar.

El síndrome CATCH-22 representa el "reordenamiento genómico" más común en el hombre, con una frecuencia estimada de 1/4.000 recién nacidos vivos, y es debido a una microdelección en la región 22q11. En muchos de los casos la microdelección es esporádica, pero aproximadamente un 10% de los pacientes ha heredado el defecto de uno de los progenitores, el cual presentaría un fenotipo clínico benigno no diagnosticado. La delección 22q11 típica (90% de los pacientes) abarca unas 3 megabases (3 millones de nucleótidos) e incluiría unos 30 genes, pero aún no se ha caracterizado el gen o genes responsables de la sintomatología clínica. En un 8% de los casos aparece una delección más pequeña de, aproximadamente 1,5 megabases.

La microdelección 22q11 forma parte de los denominados reordenamientos cromosómicos, que son alteraciones citogenéticas que afectan a un solo cromosoma. En el genoma humano hay un gran número de secuencias repetidas de bajo número de copias, que se han denominado duplicaciones segmentarias (Ds) las cuales están presentes en todos los cromosomas. Las Ds específicas de cada región del genoma y muy homólogas predisponen al deslizamiento de secuencias durante el apareamiento cromosómico en la división celular, y a la posibilidad de que exista recombinación homóloga desigual entre las diferentes copias de Ds mal alineadas. Así, se producen las delecciones que causan los síndromes de Prader-Willi y Angelman, la delección de la neuropatía tomaculosa hereditaria y su correspondiente duplicación recíproca asociada al CMT1A y la microdelección en 22q11.

La consecuencia final de las mutaciones genómicas (duplicaciones o delecciones) es una alteración en los niveles de expresión génica, de tal modo que los genes implicados deben ser sensibles a la dosis. Así, en la delección 22q11 el mecanismo patogénico es debido a una haploinsuficiencia como consecuencia de la pérdida de una de las dosis (materna o paterna) del gen implicado.

Mediante técnicas de análisis molecular (FISH y de ADN) es posible detectar la presencia de la microdelección, y proporcionar un consejo genético a los progenitores. En casos esporádicos, el riesgo de recurrencia es el de la población

general, mientras que en casos familiares el riesgo de tener otro hijo afectado es del 50%.

## SÍNDROMES DE ANGELMAN Y PRADER-WILLI

Los síndromes Prader-Willi y Angelman forman parte de un grupo de patologías debidas a mutaciones que afectan a genes involucrados en fenómenos de impronta génica. Este término hace referencia a la diferencia funcional existente entre determinados genes tras sufrir un marcaje diferencial durante los procesos de gametogénesis. Este "marcaje" se realiza mediante un proceso de metilación que implica que el gen metilado no se expresa y permanece inactivo. Así, el individuo posee dos copias génicas pero sólo una de ellas (la paterna o la materna) es capaz de expresarse y producir una proteína. La impronta génica está implicada en la patología de síndromes, tumores e interviene también en la expresión fenotípica de varias enfermedades.

Las alteraciones genómicas que se observan en este tipo de patologías pueden ser microdelecciones cromosómicas (que implican la pérdida del alelo activo, bien sea el paterno o el materno), disomías uniparentales (el individuo posee dos dotaciones cromosómicas, pero las ha heredado del mismo progenitor y están inactivas) o bien mutaciones en los genes que controlan el proceso de metilación.

Existen al menos tres regiones cromosómicas implicadas en mecanismos de impronta génica. La región 15q11-q13 está relacionada con la aparición de los síndromes Prader-Willi y Angelman, mientras que la disomía uniparental de las regiones 7q31-q34 y 11p15.5 se ha asociado a los síndromes Silver-Russel y Beckwith-Wiedeman, respectivamente.

El síndrome de Prader-Willi se debe a un defecto en la expresión génica del cromosoma 15 paterno, En un 70% de los casos de los casos se observa una microdelección de la región 15q11-q13 paterna, por lo que el individuo sólo ha heredado la región materna que contiene el supuesto gen PW, pero inactivo. En un 28% de los casos se detecta una disomía uniparental materna, y un 1-2% de los pacientes aparecen mutaciones en los genes que controlan el proceso de metilación.

En el síndrome Angelman, la patología aparece como consecuencia de un defecto en la expresión de la región

15q11-13 materna. En un 70% de los pacientes se observa una microdelección de la región 15q11 materna, en un 7-9% aparecen mutaciones en genes que controlan el proceso de metilación, un 3-5% presenta una disomía uniparental paterna, y en un 10-20% de los casos no se conoce la base genética. Un 4% de los casos presentan mutaciones en un gen denominado UBE3A, y en éstos la enfermedad se trasmite, en generaciones sucesivas, de tal modo que el sexo del progenitor del individuo afectado es siempre contrario al del abuelo transmisor.

La confirmación del diagnóstico clínico, así como la caracterización de la tipo del alteración genómica subyacente se realiza mediante técnicas de análisis genético molecular (FISH, test de metilación del ADN y análisis mediante PCR con marcadores microsatélites de la región 15q11-q13). Esto ha permitido establecer una correlación entre genotipo-fenotipo y, en general, se admite que los pacientes con disomía uniparental o mutaciones en centro de "imprinting" tienen un fenotipo clínico más benigno que aquéllos con microdelecciones.

También, es conveniente la realización de un estudio citogenético constitucional (cariotipo), ya que algunos casos, la patología puede deberse a anomalías numéricas o estructurales que implican a esta región del cromosoma 15 (inversiones-duplicaciones, traslocaciones balanceadas, cromosomas supernumerarios).

La identificación de la base genética de los síndromes de Prader-Willi y de Angelman es clave para proporcionar un consejo genético. En el caso de las deleciones y la disomía el riesgo de recurrencia es menos del 1%, mientras que en el caso de las mutaciones en el centro de imprinting o mutaciones en el gen UBE3A el riesgo de recurrencia es del 50%.

## PRESENTE Y FUTURO DE LA MEDICINA MOLECULAR

La situación actual de los estudios genéticos moleculares en las enfermedades de la infancia puede resumirse en los siguientes puntos:

1. Actualmente se conoce el gen implicado (mutado) en la mayoría de estas enfermedades. En los casos en los que aún no se conoce el gen/genes, éstos se identificarán en los próximos meses.
2. Una misma manifestación fenotípica (clínica) puede deberse a mutaciones en genes diferentes (como los tres posibles para el síndrome de Bartter). De la misma forma, enfermos con manifestaciones clínicas muy parecidas pueden tener mutaciones en genes diferentes (como algunos casos de pacientes con síndrome de Gitelman y Bartter). Esto implica que la clasificación de las enfermedades debe incluir criterios genéticos, reconociendo al gen implicado en cada caso. Esta división genética de entidades clínicas previamente agrupadas sería fundamental si el tratamiento llegase a ser diferencial para cada tipo.
3. Cuando se conoce el gen implicado se pueden buscar las mutaciones en un paciente (con sospecha clínica de padecer la enfermedad atribuida a mutaciones en ese gen). Esto puede contribuir decisivamente al diagnóstico, pero en la mayoría de los casos aún no tiene aplicaciones directas sobre el tratamiento. Sin embargo, debemos asumir que el tratamiento efectivo de estas patologías surgirá de la investigación de los mecanismos genéticos moleculares que las producen. En muchos casos habrá que esperar al desarrollo de la terapia génica, o al desarrollo de los llamados "fármacos a la carta" que se deriven de la investigación farmacogenómica.