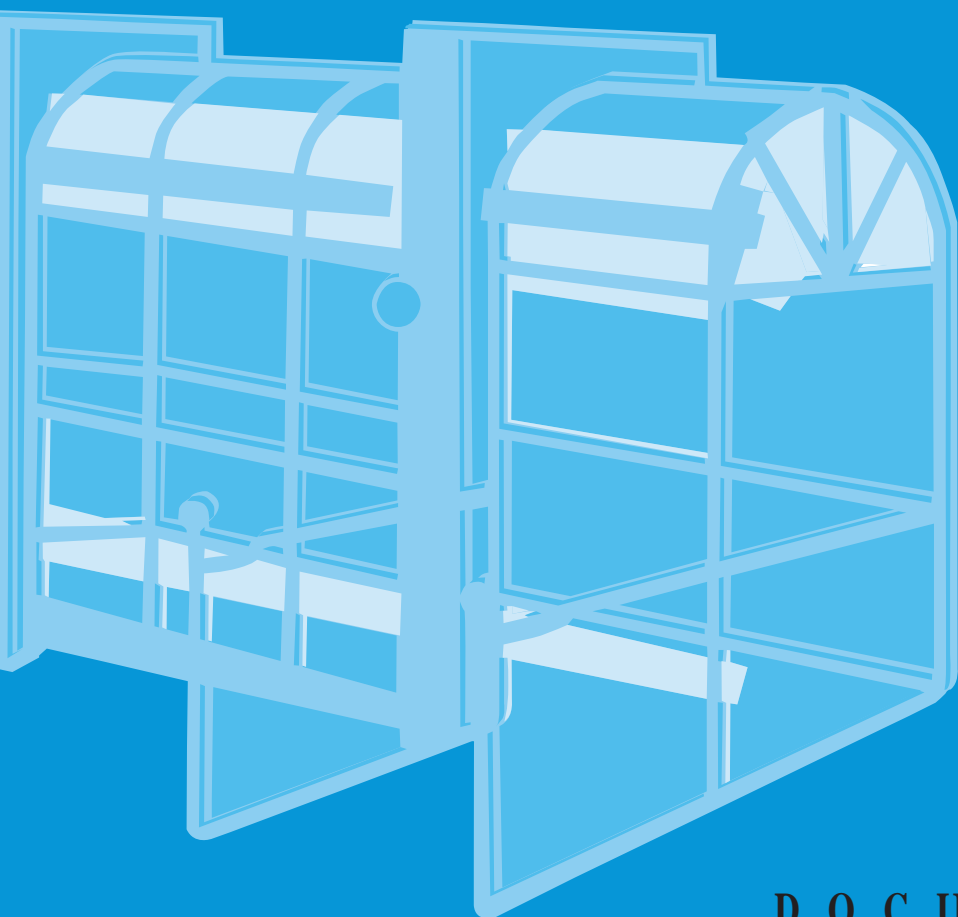


# CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS AL CONOCIMIENTO DE LAS BASES MOLECULARES DE CUATRO ENFERMEDADES GENÉTICAS



PREMIO REINA SOFÍA 2002,  
DE PREVENCIÓN DE DEFICIENCIAS

DOCUMENTOS • 64/2003



MINISTERIO  
DE TRABAJO  
Y ASUNTOS SOCIALES

REAL PATRONATO  
SOBRE DISCAPACIDAD

**PREMIO REINA SOFÍA 2002,  
DE PREVENCIÓN DE DEFICIENCIAS**

**CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS AL CONOCIMIENTO  
DE LAS BASES MOLECULARES DE CUATRO  
ENFERMEDADES GENÉTICAS:**

**POLQUISTOSIS RENAL DEL ADULTO  
ATROFIA MUSCULAR ESPINAL  
NEUROFIBROMATOSIS TIPO 1  
HIPOACUSIAS NEUROSENSORIALES NO SINDRÓMICAS**

**Autores:**

**Felipe Moreno Herrero**

**José Luis San Millán López**

**Concepción Hernández Chico**

**Ignacio del Castillo Fernández del Pino**

Unidad de Genética Molecular

Hospital Ramón y Cajal (MADRID)

**CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS AL CONOCIMIENTO DE LAS BASES MOLECULARES DE CUATRO ENFERMEDADES GENÉTICAS**

**AUTORES:** Felipe Moreno Herrero, José Luis San Millán López, Concepción Hernández-Chico e Ignacio del Castillo Fernández del Pino, de la Unidad de Genética Molecular del Hospital Ramón y Cajal de Madrid.

**DOCUMENTOS:** 64/2003

**Memoria de la labor de investigación galardonada con la dotación para España (ex aequo) de los Premios Reina Sofía 2002, de Prevención de Deficiencias.**

**EDITA:** Real Patronato Sobre Discapacidad.

**CUIDADO DE LA EDICIÓN Y DISTRIBUCIÓN:** Centro Español de Documentación sobre Discapacidad, del Real Patronato. Serrano, 140. 28006 Madrid.  
Tel. 91 7452449/46 – Fax. 91 4115502. - [rp@futurnet.es](mailto:rp@futurnet.es)

**IMPRIME:** Industrias Gráficas Caro, S. L.

Primera edición: Marzo de 2003, 500 ejemplares

NIPO: 214-03-005-4

Depósito legal: M-12236-2003

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	7
PREÁMBULO .....	9
<b><u>CAPÍTULO I: ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD POLIQUÍSTICA RENAL DE HERENCIA AUTOSÓMICA DOMINANTE (ADPKD)</u></b> .....	11
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	11
<b>2. APORTACIONES CIENTÍFICAS</b> .....	12
<b>2.1. Estudio de familias y evidencia de heterogeneidad genética no alélica</b> .	12
<b>2.2. ADPKD tipo1 (gen PKD1)</b> .....	12
2.2.1. <i>Aislamiento de nuevos marcadores próximos al gen y reducción de la región candidata</i> .....	12
2.2.2. <i>Caracterización del gen PKD1</i> .....	13
2.2.3. <i>Identificación de mutaciones en el gen PKD1</i> .....	13
<b>2.3. ADPKD tipo 2 (gen PKD2)</b> .....	14
2.3.1. <i>Aislamiento de nuevos marcadores próximos al gen PKD2 y reducción de la región candidata</i> .....	14
2.3.2. <i>Identificación de mutaciones en el gen PKD2</i> .....	15
2.3.3. <i>Evidencia de mutaciones somáticas en la enfermedad tipo 2</i> ...	15
<b>2.4. Correlación fenotipo-genotipo</b> .....	17
<b>2.5. Diferencias fenotípicas entre los tipos 1 y 2 de ADPKD</b> .....	18
<b>3. CONCLUSIONES</b> .....	19
<b>4. PUBLICACIONES DE NUESTRO LABORATORIO</b> .....	21
<b><u>CAPÍTULO II: ESTUDIO DE LA ATROFIA MUSCULAR ESPINAL</u></b> ...	24
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	24
<b>2. APORTACIÓN CIENTÍFICA</b> .....	24
<b>2.1. Caracterización de marcadores polimórficos ligados al locus AME y estudios de ligamiento</b> .....	24

2.2. Estudio molecular de los genes SMN <sub>y</sub> NAIP . . . . .	26
2.3. Investigación de los factores genéticos que controlan el fenotipo AME . . . . .	26
2.4. Caracterización de pacientes heterocigotos compuestos . . . . .	28
<b>3. PUBLICACIONES DE NUESTRO LABORATORIO . . . . .</b>	<b>29</b>
<b><u>CAPÍTULO III: ESTUDIO DE LA NEUROFIBROMATOSIS TIPO I . . . . .</u></b>	<b>31</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN . . . . .</b>	<b>31</b>
<b>2. APORTACIÓN CIENTÍFICA . . . . .</b>	<b>32</b>
<b>2.1. Diseñando marcadores útiles para el diagnóstico . . . . .</b>	<b>32</b>
<b>2.2. Búsqueda de mutaciones patogénicas en el gen NF1 . . . . .</b>	<b>33</b>
2.2.1. Identificación de mutaciones puntuales . . . . .	33
2.2.2. Identificación de deleciones en el gen NF1 . . . . .	33
<b>2.3. Estudios de correlación genotipo-fenotipo . . . . .</b>	<b>34</b>
<b>3. PUBLICACIONES DE NUESTRO LABORATORIO . . . . .</b>	<b>34</b>
<b><u>CAPÍTULO IV: ESTUDIO DE LAS HIPOACUSIAS HEREDITARIAS NO SINDRÓMICAS . . . . .</u></b>	<b>35</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN . . . . .</b>	<b>35</b>
<b>2. NUESTROS PRINCIPALES LOGROS EN EL CAMPO DE LAS HIPOACUSIAS HEREDITARIAS . . . . .</b>	<b>38</b>
<b>2.1. Constitución de una red española de estudio de las hipoacusias hereditarias . . . . .</b>	<b>38</b>
<b>2.2. Hipoacusias no sindrómicas de herencia autosómica recesiva . . . . .</b>	<b>38</b>
2.2.1. Hipoacusia de tipo DFNB1 . . . . .	38
2.2.2. Mutaciones en el gen GJB2 en el síndrome KID . . . . .	41
2.2.3. Hipoacusias de tipo DFNB9 y DFNB8/B10 . . . . .	42
2.2.3.1. Hipoacusias de tipo DFNB9 . . . . .	42
2.2.3.2. Hipoacusias de tipo DFNB8/B10 . . . . .	43
2.2.4. Hipoacusias de tipo DFNB16 . . . . .	44

<b>2.3. Hipoacusias no sindrómicas de herencia autosómica dominante . . . . .</b>	<b>45</b>
2.3.1. <i>Identificación de nuevos loci de hipoacusias de herencia dominante. . . . .</i>	45
2.3.2. <i>Nueva mutación en el gen de la <math>\alpha</math>-tectorina . . . . .</i>	45
<b>2.4. Hipoacusias no sindrómicas de herencia ligada al sexo. . . . .</b>	<b>46</b>
2.4.1. <i>Identificación del nuevo locus DFN6 . . . . .</i>	46
2.4.2. <i>Caracterización de familias con hipoacusia de tipo DFN3 . . . . .</i>	47
<b>2.5. Hipoacusias no sindrómicas de herencia materna (mitocondrial). . . . .</b>	<b>48</b>
2.5.1. <i>Mutación A1555G en el gen del RNA ribosómico mitocondrial 12S . . . . .</i>	49
2.5.2. <i>Mutación T7510C en el gen del tRNA-Ser(UCN) . . . . .</i>	52
<b>3. PUBLICACIONES DE NUESTRO LABORATORIO. . . . .</b>	<b>53</b>
<b><u>CAPÍTULO V: DIAGNÓSTICO DE OTRAS ENFERMEDADES. . . . .</u></b>	<b>55</b>
<b>1. SÍNDROME DEL CROMOSOMA X-FRÁGIL . . . . .</b>	<b>55</b>
<b>1.1. Introducción . . . . .</b>	<b>55</b>
<b>1.2. Aportaciones . . . . .</b>	<b>56</b>
<b>2. FIBROSIS QUÍSTICA (MUCOVISCIDOSIS). . . . .</b>	<b>56</b>
<b>2.1. Introducción . . . . .</b>	<b>56</b>
<b>2.2. Aportaciones . . . . .</b>	<b>57</b>
<b><u>APÉNDICE I: RESUMEN DE PACIENTES ESTUDIADOS . . . . .</u></b>	<b>59</b>
<b><u>APÉNDICE II: TESIS DOCTORALES . . . . .</u></b>	<b>61</b>



## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos:

- ✓ la colaboración voluntaria de familias y pacientes, así como de asociaciones de afectados, en particular FIAPAS (Federación de Asociaciones de Padres y Amigos de Sordos);
  
- ✓ la colaboración de los especialistas que han efectuado los estudios clínicos de los pacientes. Son muchos, pertenecientes a diferentes hospitales, y no podemos enumerarlos a todos;
  
- ✓ el apoyo económico de Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), la Comisión interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT), la Dirección General de Investigación de la Unión Europea (DGXII), y la Fundación ONCE;

Reconocemos la participación en los estudios de los siguientes jóvenes investigadores y becarios: Araceli Álvarez, Francisco Javier del Castillo, José Antonio García-Marcos, Blanca Gomendio, Susana Gómez, Yolanda Martín, Ángeles Mencía, Vanessa Migliosi, Silvia Modamio, Miguel Ángel Moreno-Pelayo, Alejandra Pera, Belén Peral, Erasmo Perera, Montserrat Rodríguez, Maritza Sarduy, Dolores Tellería, Carmen Valero, Noelia Valle, Eladio Velasco, Manuela Villamar y Miguel Viribay, así como la de nuestros colaboradores cubanos: Dora Méndez del Castillo, Ibis Menéndez Alejo, Raúl Ferreira y Jorge Mato.

El soporte técnico ha sido asegurado por Carmen Martín, Natividad Rodríguez, Lourdes Romero y Ana Valero. Y también queremos recordar a nuestras maravillosas secretarías Rosario Martínez e Isabel Posadas.

Sin la colaboración de estos profesionales y compañeros, esta Memoria no habría podido ser escrita.





## PREÁMBULO

La Unidad de Genética Molecular del Hospital Ramón y Cajal de Madrid, surgida del Servicio de Microbiología por "generación espontánea" en 1983, ha realizado relevantes investigaciones en bacterias, particularmente en el campo de las microcinas. Las microcinas son péptidos sintetizados en el ribosoma de enterobacterias, con actividad antibiótica sobre bacterias de la misma familia. Estas investigaciones abarcan desde la estructura y modo de acción de estos antibióticos, a la identificación de los genes implicados en la biosíntesis y en la regulación de la expresión de éstos.

Habiéndose hecho evidente en el segundo quinquenio de los 80 que la Genética Molecular, con su amplia panoplia de métodos y técnicas, podía aportar información fundamental al conocimiento de patologías humanas, específicamente, al estudio de las bases moleculares del rosario de más de 5000 enfermedades mendelianas y, teniendo en cuenta la ubicación de la Unidad, dentro de un gran hospital, con centenares de profesionales competentes, decidimos extender progresivamente nuestras investigaciones al estudio de enfermedades hereditarias humanas. Desde el primer momento teníamos claro que nuestra actividad, dado el retraso palpable en Genética Humana en este país, tendría que abarcar investigación básica (identificación y caracterización de los genes responsables), docencia (instrucción de jóvenes doctorandos) y asistencia (diagnóstico genético molecular a los afectados y asesoramiento genético a las familias que participan voluntariamente en los estudios), todo ello autorizado por el Comité Ético de Investigación Clínica de nuestro hospital. En 1989 comenzamos los estudios de Genética Humana identificando cromosomas portadores de mutaciones causantes de fibrosis quística. Luego introdujimos los estudios de poliquistosis renal del adulto y del síndrome del cromosoma X frágil. Después vinieron los estudios de neurofibromatosis y atrofia muscular espinal, y, finalmente, los de sorderas neurosensoriales, a los cuales dedicamos actualmente el mayor esfuerzo. Más recientemente hemos iniciado una línea de investigación en una enfermedad genéticamente compleja, el síndrome de resistencia a insulina, una alteración plurimetabólica relacionada con obesidad, diabetes mellitus tipo 2, alteraciones cardiovasculares y síndrome de ovario poliquístico. También participamos, en los años 1992 a 1995, en la construcción del Mapa Genético Humano. A continuación presentamos una Memoria de los estudios realizados y logros alcanzados en el estudio de las patologías genéticas mencionadas. A notar que una veintena de jóvenes becarios

han contribuido a estos estudios. Sin ellos nuestros logros no habrían sido los mismos. Baste señalar que la plantilla de la Unidad se reduce a tres doctores (José Luis San Millán, Concepción Hernández Chico y Felipe Moreno), habiéndose incorporado recientemente, con contrato de investigador FIS, el Dr. Ignacio del Castillo.

La Memoria está estructurada como sigue: En primer lugar se describen nuestras aportaciones científicas a la genética de las cuatro enfermedades que rezan en el título de la memoria. En segundo lugar describimos nuestros resultados de diagnóstico molecular en familias afectadas por síndrome del cromosoma X frágil y por fibrosis quística. Cuando ha sido solicitado por las familias y estaba justificado científicamente, se han efectuado diagnósticos prenatales de atrofia muscular espinal, síndrome del cromosoma X frágil y fibrosis quística.

# CAPÍTULO I

## ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD POLIQUÍSTICA RENAL DE HERENCIA AUTOSÓMICA DOMINANTE (ADPKD)

### **1. INTRODUCCIÓN**

La poliquistosis renal autosómica dominante (ADPKD; Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease) es una de las enfermedades hereditarias monogénicas más frecuentes, afectando a 1 de cada 1.000 individuos. Es una enfermedad multisistémica caracterizada por la formación y progresivo crecimiento de múltiples quistes en ambos riñones, lo que conduce en último extremo a una insuficiencia renal crónica terminal. Otras manifestaciones de la enfermedad son quistes hepáticos, hipertensión, dolor lumbar, aneurismas cerebrales y anomalías en válvulas cardíacas.

El diagnóstico clásico de ADPKD se realiza mediante ecografía, siendo el criterio clínico la presencia, a cualquier edad, de al menos 2 quistes en un riñón y un quiste en el otro. Se trata de una enfermedad cuya manifestación es típicamente en la edad adulta, por lo que una ecografía negativa por debajo de los 30 años de edad no se considera definitiva. Su expresividad es variable y, así, mientras algunos individuos sufren insuficiencia renal crónica terminal antes de los 50 años de edad, otros mueren a edad avanzada, por otras causas, presentando sólo quistes renales. Es llamativo también la variable expresión intrafamiliar. Con todo, se considera que su penetrancia es completa: todos los individuos que heredan el gen mutado manifestarán la enfermedad, aunque lo hagan en diferente grado.

Desde el punto de vista genético, el tipo de herencia corresponde con un carácter autosómico dominante, con penetrancia completa y expresión variable y dependiente de la edad. Esto significa que se hereda de forma vertical, de padres a hijos, que el 50% de los descendientes serán afectados independientemente del sexo, y que expresarán la enfermedad en distinto grado en la edad adulta (primeros signos o síntomas a partir de la segunda o tercera década de vida).

## **2. APORTACIONES CIENTÍFICAS**

### **2.1. Estudio de familias y evidencia de heterogeneidad genética no alélica.**

En 1988, Reeders y cols demostraron mediante estudio de familias que la enfermedad presentaba asociación con marcadores polimórficos del brazo corto del cromosoma 16, cerca de la región del grupo de genes de la alfa-globina. Estudios posteriores de otros grupos confirmaron dicha asociación en la mayoría de las familias estudiadas, pero en una minoría de ellas no se observó ligamiento entre esa región del cromosoma 16 y la enfermedad. Este resultado planteó la posible existencia de otro locus independiente responsable de la enfermedad.

En 1990, nosotros iniciamos la recogida de muestras de DNA de familias españolas afectas, y su posterior estudio con marcadores del brazo corto del cromosoma 16. Este estudio de ligamiento confirmó la asociación de la enfermedad a esa región cromosómica en la mayoría de las familias estudiadas. Asimismo demostramos que, en algunas familias, no se observaba ligamiento. La frecuencia de casos asociados a la región del brazo corto del cromosoma 16 se estableció como del 0.85, cifra similar a la obtenida por otros grupos en poblaciones de nuestro entorno (San Millán y cols, 1992; Peral y cols, 1993). A partir de entonces se consideró la existencia de al menos dos loci relacionados con la enfermedad. El locus responsable de la mayoría de los casos, el localizado en el brazo corto del cromosoma 16, se denominó PKD1, y el otro, todavía no localizado, PKD2.

Estudios posteriores realizados en familias procedentes de Cuba (Viribay y cols, 1994) y de Argentina (Iglesias y cols, 1997) demostraron también que en esas poblaciones a) la mayoría de los casos presentaban ligamiento al locus PKD1, y b) la existencia de heterogeneidad genética (una minoría de familias no presentaba ligamiento al locus PKD1).

### **2.2 . ADPKD tipo I.**

#### *2.2.1. Aislamiento de nuevos marcadores próximos al gen y reducción de la región candidata.*

En colaboración con otros grupos de investigación, encuadrados dentro de una Acción Concertada Europea, emprendimos la tarea de identificar y mapear otros marcadores polimórficos de la región PKD1 que nos permitieran reducir la región candidata mediante el análisis de fenómenos de recombinación en familias de ADPKD tipo 1.

Esta estrategia permitió reducir consecutivamente la región candidata para PKD1 a un fragmento de 1 cM (Somlo y cols, 1992), entre los marcadores D16S125 y D16S259, y luego a un fragmento menor entre Blu24 y D16S259 (Peral y cols, 1994; Viribay y cols, 1994).

Los nuevos marcadores polimórficos identificados y mapeados en estos trabajos han sido luego de gran utilidad en los diagnósticos genéticos familiares realizados.

### *2.2.2. Caracterización del gen PKD1.*

El gen PKD1 fue finalmente identificado, en la región indicada, por el grupo del Dr. Peter Harris en 1994. En este trabajo, en el que participó una de nuestras colaboradoras, la Dra. B. Peral, sólo se identificó el extremo 3' final del gen.

A lo largo de los meses siguientes colaboramos con el grupo del Dr. Harris en la caracterización completa del gen PKD1 (Hughes y cols, 1995). El trabajo resultó complicado ya que las 3/4 partes iniciales del mismo se encuentran repetidas varias veces en otro lugar del cromosoma 16. Finalmente, resultó ser un gen muy grande, de 46 exones repartidos en 52 kb de DNA genómico, y que codifica para un RNA mensajero de 14 kb. La secuencia aminoacídica predicha a partir de la de DNA nos permitió vislumbrar por primera vez la estructura de la proteína codificada por el gen PKD1, la poliquistina 1. Se trataría de una gran glicoproteína transmembrana de 4302 aminoácidos. Contiene 11 dominios hidrofóbicos de anclaje a la membrana reunidos en el último tercio, un largo fragmento amino extracelular y un corto extremo carboxilo intracelular. En el segmento amino extracelular se identificaron diferentes dominios, algunos ya descritos en otras proteínas y uno nuevo, que se repetía hasta 13 veces, y que se denominó dominio tipo PKD1. Toda la estructura sugería que el segmento extracelular podría interactuar con diferentes dominios de otras proteínas o con la matriz extracelular. Posteriormente otros autores demostraron que en el corto extremo intracelular había un dominio "coiled-coil" de posible interacción con otras proteínas.

### *2.2.3. Identificación de mutaciones en el gen PKD1.*

A partir de la caracterización del gen PKD1, se abrió la posibilidad de identificar las mutaciones causantes de la enfermedad. En nuestro caso, el cribaje de mutaciones se redujo al tercio final del gen, por ser la región mejor caracterizada al principio y porque los genes repetidos no interferían con su estudio.

Estos trabajos, en colaboración con otros grupos, dieron lugar a diferentes publicaciones (Peral y cols, 1995; Peral y cols, 1996a; Peral y cols, 1996b; Badenas y cols, 1999; Torra y cols, 2000). Las conclusiones más importantes fueron:

- a) La frecuencia de mutaciones obtenidas (aproximadamente en un 30% de los casos estudiados) coincide con la fracción del gen estudiada.
- b) No existen "puntos calientes" claros para mutación en ese segmento.

- c) Apenas existen mutaciones repetidas en diferentes familias.
- d) En la mayoría de los casos las mutaciones provocan una proteína truncada (mutaciones "sin sentido" o "stop") o son pequeñas deleciones que cambian el patrón de lectura hasta la aparición de un codón de fin de lectura.

En conclusión, las mutaciones germinales observadas parecen ser de tipo inactivante y encontrarse repartidas al azar por toda la extensión del gen.

Una mutación identificada que merece una mención aparte es la Q4224P. Se trata de una mutación de cambio de sentido que provoca la inactivación del dominio coiled-coil encontrado en el extremo carboxilo de la proteína (Badenas y cols, 1999).

### **2.3. ADPKD tipo 2.**

#### *2.3.1. Aislamiento de nuevos marcadores próximos al gen PKD2 y reducción de la región candidata.*

En 1994, dos grupos, uno holandés y otro norteamericano, de forma independiente, localizaron el locus PKD2 en el brazo largo del cromosoma 4 (4q13-q23) mediante análisis de ligamiento en familias afectas en las que la enfermedad no presentaba ligamiento al locus PKD1.

El estudio de esa región en nuestras familias no PKD1 demostró que, en todos los casos, presentaban ligamiento con este nuevo locus, denominado PKD2 (San Millán y cols, 1995). En este mismo trabajo mapeamos en dicha región nuevos marcadores polimórficos aislados por el grupo del Dr. J. Weissenbach (Genethon, Paris) o en nuestro laboratorio (Viribay y cols, 1995). El conocimiento del mapa genético de la región nos permitió analizar con precisión los fenómenos de recombinación identificados en pacientes de nuestras familias y reducir la región candidata a 1 cM, entre los marcadores D4S1542 y D4S1563. Es en esa región donde en 1996 el grupo del Dr. S. Somlo identificó y clonó el gen PKD2, en base a la similitud de secuencia de uno de los genes candidatos con un fragmento de PKD1 y a la presencia de mutaciones en ese mismo gen en pacientes de familias no-PKD1. El gen PKD2 consiste en 15 exones con una pauta abierta de lectura de 2.9 kb y una región 3'UTR de 2 kb. La proteína que codifica, la poliquistina 2, está constituida por 968 aminoácidos, tiene 6 dominios transmembrana, y los extremos amino y carboxi terminal son citoplásmicos. Existe una identidad del 25-30% y una similitud del 45-50% entre poliquistina 1 y poliquistina 2. La poliquistina 2 muestra homología con la familia de los canales de calcio activados por voltaje, lo cual sugiere que podría estar implicada en la regulación de los flujos transmembrana de calcio.

### *2.3.2. Identificación de mutaciones en el gen PKD2.*

El rendimiento de búsqueda de mutaciones en el gen PKD2 es mucho mayor que en el gen PKD1, debido a su menor tamaño (15 exones frente a 43) y a que ninguna parte de él está repetida en otro lugar del genoma. De hecho, hemos identificado la mutación patogénica en todas las familias tipo PKD2 de nuestra muestra.

Para la detección de mutaciones en este segundo gen se analizaron todos los exones y las regiones intrónicas flanqueantes mediante las técnicas de heteroduplex y/o SSCP, seguido de secuenciación directa de los amplificadores con patrón electroforético aberrante (Viribay y cols, 1997; Torra y cols, 1999<sup>a</sup>; Iglesias y cols, 2000; Torra y cols, 2000).

Mediante este método se identificó la mutación patogénica en todas las familias menos una. La mayor parte de las mutaciones causan la terminación anticipada de la proteína, bien por la aparición de un codón stop (mutación sin sentido), o bien por tratarse de deleciones o inserciones de pequeño tamaño que comportan cambios en el patrón de lectura hasta la aparición de un codón stop. Sólo encontramos una mutación de cambio de sentido o sentido erróneo (masayense), la G1066C (Ala356Pro), en el exón 4. En este mismo trabajo identificamos un polimorfismo en el exón 1 del gen (83 G/C, Arg28Pro) muy frecuente en nuestra población.

En la restante familia PKD2 no se detectó ninguna mutación mediante búsqueda en los exones. Sin embargo, al analizar la segregación del polimorfismo Arg28Pro en esa familia se observó una anomalía que parecía corresponder con la deleción de una de las copias del gen (hemizigosis) en los individuos afectados (Torra y cols, 1999b). Para demostrar que realmente existía dicha deleción se procedió a un estudio de dosis de DNA (con el objeto de determinar si existía una menor cantidad de DNA para la región PKD2 que para otra región control). El análisis densitométrico del "southern blot" realizado con sondas de los genes PKD2 (cromosoma 4) y CFTR (cromosoma 7) demostró que la intensidad de la hibridación obtenida con la sonda PKD2 en un afecto era aproximadamente la mitad que para la sonda CFTR. Esa diferencia no se observó en los individuos no afectados. Este estudio nos permitió demostrar que en esta familia existe una deleción del gen PKD2 que abarca desde el exón 1 hasta el 13 como mínimo. No se observó ninguna anomalía en la segregación de marcadores polimórficos que flanquean al gen lo que sugiere que la deleción afecta prácticamente al gen PKD2 pero no a regiones colindantes.

### *2.3.3. Evidencia de mutaciones somáticas en la enfermedad tipo 2.*

Aunque se trata de una enfermedad sistémica, la ADPKD muestra una expresión focal dado que los quistes renales derivan de menos del 1% de todas las nefronas. Se ha pro-



puesto una explicación a este hecho basada en el modelo "two-hit", la cual sugiere que la cigotogénesis en PKD1 se inicia con la inactivación del alelo normal del gen (el otro está inactivado por la mutación germinal que se hereda) por una segunda mutación producida ya a nivel somático y diferente en cada nefrona que va a dar lugar a un quiste. Cuando esta segunda mutación a nivel somático es una delección amplia que elimina la zona donde se encuentra el microsatélite utilizado como marcador, al amplificar el DNA mediante PCR sólo se observa el alelo que contiene la mutación germinal; esto se conoce como pérdida de heterocigosidad (LOH, Loss Of Heterozygosity).

Este modelo de cigotogénesis, con LOH somática, fue demostrado por otros autores en el caso de ADPKD tipo 1, pero no había sido comprobado en el tipo 2. Nosotros, en colaboración con el grupo de los Dres. Torra y Darnell, del Hospital Clínico de Barcelona, realizamos un estudio de células epiteliales de quistes renales de un paciente con ADPKD tipo 2 en busca de segundas mutaciones a nivel somático que apoyen el modelo "two-hit". Para ello estudiamos tanto la presencia de LOH en las células quísticas como la existencia de otro tipo de mutaciones en los exones del gen (Torra y cols, 1999b; Pérez-Oller y cols., 2000).

La mutación germinal del paciente en cuestión había sido previamente identificada (ver apartado 2.3.2). Se trataba de una delección que abarcaba la mayor parte, sino todo, el gen PKD2. Cuando el paciente sufrió nefrectomía, se obtuvieron 30 quistes renales intactos que fueron usados en este estudio.

El análisis de LOH mostró que un 10% (3/30) de los quistes habían sufrido una delección somática de la región que contenía el gen normal pero que no afectaba a zonas adyacentes. Con el fin de establecer que esas delecciones eran específicas del gen PKD2, analizamos otros marcadores que se pierden con relativa frecuencia en tumores humanos pero no encontramos LOH para éstos.

En los restantes quistes, aquellos en los que no objetivamos LOH, buscamos mutaciones puntuales en 6 de los 15 exones del gen. Nuestros estudios previos habían mostrado que en esos 6 exones se concentran el 70% de las mutaciones germinales y parecían los mejores candidatos para buscar mutaciones somáticas. En ellos encontramos 8 mutaciones puntuales, todas ellas con la característica de producir una proteína anómala: seis eran pequeñas delecciones o inserciones que provocaban un cambio en la pauta de lectura, una creaba un codón "stop" de parada prematura, y la última afectaba a un lugar de "splicing" en el intrón 4.

Por tanto, habíamos demostrado que, también en la ADPKD tipo 2 humana, la citogénesis era debida a la inactivación somática de la copia normal del gen y que cada quiste era un fenómeno clonal (la mutación somática era distinta y única en cada quiste).

#### **2.4. Correlación fenotipo-genotipo.**

Como se ha comentado antes, la presentación de ADPKD es muy variable, incluso cuando nos referimos al fenómeno más habitual y grave asociado a la misma: la insuficiencia renal crónica terminal. Existe una variación fenotípica intrafamiliar significativa, especialmente evidente en familias con casos de aparición temprana de la enfermedad, lo que sugiere que otros factores modificadores (bien ambientales o bien genéticos) pueden influir en el curso de la enfermedad. De hecho, se ha postulado que diferencias en la frecuencia de aparición de mutaciones somáticas ("second-hits") pueden, al menos en parte, dar cuenta de esa variabilidad. Con todo, existen también evidencias de que la mutación germinal puede influir en el fenotipo, tanto en el tipo 1 como en el tipo 2. Se han descrito diferencias fenotípicas significativas entre familias, y no es infrecuente, por ejemplo, encontrar familias con una manifestación clínica leve de la enfermedad en todos sus miembros afectados.

Con el fin de aclarar si el tipo de mutación germinal o la posición de la misma en el gen influye en el curso de la enfermedad, participamos en dos estudios de colaboración con otros grupos centrados en evaluar el efecto del genotipo sobre la aparición de la insuficiencia renal en grandes series de familias ADPKD.

En el caso de ADPKD tipo 1 (Rossetti y cols, 2002) evaluamos 324 pacientes portadores de mutaciones en el gen PKD1, pertenecientes a 80 familias. La edad media de aparición de la insuficiencia renal crónica terminal fue de 54 años, sin hallar diferencias entre hombres y mujeres. Aunque existía una considerable variabilidad intrafamiliar para ese fenotipo, encontramos diferencias significativas entre familias, destacando algunos casos inusuales de familias con aparición muy tardía de la insuficiencia renal. Con el fin de evaluar una posible correlación fenotipo-genotipo para la mutación germinal consideramos tanto el tipo de mutación como su posición en el gen. Si bien el tipo de mutación no influía, los pacientes con mutaciones en la primera mitad del gen presentaban una enfermedad más severa que los que tenían la mutación en la segunda mitad del gen. La edad media de aparición de la insuficiencia renal era 53 y 56 años respectivamente ( $P=0.025$ ), pero esa diferencia se acentuaba si considerábamos la posibilidad de mantener una función renal aceptable a los 60 años de edad (18.9% y 39.7%, respectivamen-

te). Este estudio demostraba que la posición de la mutación germinal PKD1 estaba asociada con la edad de aparición de la insuficiencia renal y plantea la cuestión de si esas mutaciones siempre inactivan simplemente todos los productos génicos.

En el caso de ADPKD tipo 2 (Hateboer y cols, 2000) también demostramos que la posición de la mutación germinal en el gen PKD2 también influye en el desarrollo de la enfermedad.

Del análisis de numerosos pacientes de 22 familias PKD2 en las que se había identificado la mutación patogénica, se pudieron identificar grupos de mutaciones en los que, a pesar de la variabilidad intrafamiliar, la presentación clínica de la enfermedad difería significativamente. En este caso, sin embargo, la variabilidad fenotípica no seguía un patrón espacial tan claro como en PKD1, si no que los grupos con presentación más grave o más leve aparecían mezclados. Con todo, el estudio sugiere que las mutaciones en los extremos citoplásmicos amino y carboxilo daban, en general, un fenotipo más grave. De nuevo, estos resultados sugieren que las mutaciones germinales PKD2 podrían no resultar simplemente en una pérdida total de la función de la proteína.

## **2.5. Diferencias fenotípicas entre los tipos 1 y 2 de ADPKD.**

Desde que se estableció la existencia de dos genes independientes implicados en la enfermedad, diferentes grupos habíamos observado una tendencia a que la enfermedad tipo 2 presentase una evolución más leve que la tipo 1. Esta observación preliminar estaba limitada por el escaso número de familias tipo 2, bien documentadas, presentes en cada serie particular. Con el fin de esclarecer este fenómeno, participamos en un estudio europeo dirigido a comparar el fenotipo y evolución de 31 familias tipo PKD1 y 31 familias PKD2 (333 y 291 individuos, respectivamente), frente a 398 individuos control sanos del mismo entorno geográfico.

Los hallazgos de este estudio (Hateboer y cols, 1999) permitieron demostrar, con suficiente significación estadística, que la forma tipo 2 de la enfermedad es clínicamente más leve que la forma tipo 1. Así, la edad media de muerte o de inicio de la insuficiencia renal crónica terminal era de 53 años (IC 95% 51.2-54.8) en pacientes tipo PKD1, frente a 69.1 años (66.9-71.3) en los tipo PKD2, o 78 años (73.8-82.2) en los controles. Asimismo, los pacientes tipo PKD2 tenían menor probabilidad de presentar otros signos o síntomas de la enfermedad como hipertensión, infecciones urinarias o hematuria. Con todo, aún siendo más leve, la enfermedad tipo 2 tiene un impacto deletéreo sobre la salud y la esperanza de vida.

Esta hipótesis sobre la expresión más leve del tipo 2 fue sustentada en un estudio posterior (Torra y cols, 2000). Pensamos que si la manifestación del tipo 2 era más tardía, entonces la frecuencia de mutaciones en el gen PKD2 debería ser más alta entre pacientes que iniciasen la insuficiencia renal a edades avanzadas (63 años o más). Efectivamente, de 46 pacientes ancianos que estudiamos, 18 presentaban mutaciones en el gen PKD2, resultando que la prevalencia del tipo 2 en este grupo era casi del 40% (alrededor de 3 veces superior a la prevalencia del tipo 2 en la población ADPKD general).

### **3. CONCLUSIONES**

El análisis de ligamiento en familias ADPKD ha demostrado heterogeneidad genética no alélica con dos genes implicados, PKD1 (en la región cromosómica 16p13.3) y PKD2 (localizado en 4q21-q23). Ambos genes han sido identificados y caracterizados. Mutaciones en el gen PKD1 causan el 85% de los casos de ADPKD, mientras que el 15% restante se debe a PKD2.

Las proteínas codificadas por PKD1 y PKD2, policistina 1 y policistina 2, respectivamente, comparten cierta homología de secuencia y podrían formar parte de un complejo receptor-canal. De hecho, se ha demostrado que el extremo carboxilo terminal de la policistina 1 contiene un dominio del tipo "coiled-coil" que interacciona con la policistina 2. La predicción de estructura de la policistina 1 sugiere una estructura tipo receptor, que puede estar implicado en interacciones célula-célula o con la matriz extracelular, así como tener un papel regulador del complejo. La policistina 2 es similar a, y podría funcionar como, un canal iónico con permeabilidad no selectiva a cationes. Además, la presencia de un dominio regulador que liga calcio sugiere que el papel del complejo podría ser regular los niveles intracelulares de ese catión.

La búsqueda de mutaciones patogénicas en ambos genes ha demostrado que no existen mutaciones recurrentes, ni siquiera "zonas calientes" claras, lo que indica que la enfermedad se debe a mutaciones "de novo" en genes con una apreciable tasa de mutación. La mayoría de las mutaciones germinales identificadas ocasionan proteínas truncadas o aberrantes, lo que ha planteado un interesante debate sobre si son totalmente inactivantes (fenotipo nulo) o no. Asimismo, ha quedado claro que el fenómeno que desencadena el proceso quístico es la acumulación, sobre la mutación germinal, de una mutación somática que inutiliza la copia normal del gen.

En la actualidad se puede efectuar el diagnóstico molecular de ADPKD pero éste se realiza tan sólo de forma indirecta, es decir, a través de análisis de ligamiento familiar con

marcadores polimórficos intragénicos o cercanos a los genes. Para la realización del análisis de ligamiento se precisa estudiar al menos 2 miembros afectados (3 si son de distinta generación) y 2 no afectados adultos de una misma familia. Por tanto, el análisis molecular en ADPKD no es útil para el diagnóstico de casos aislados en los que se sospecha una poliquistosis pero no hay familiares afectados o que se presten al estudio. Para realizar el diagnóstico molecular en estos casos aislados se debería utilizar el análisis molecular directo, es decir, el análisis de mutaciones pero dicho procedimiento resulta complejo. Esto es debido a que el gen PKD1, por otra parte mayoritario, es de muy difícil análisis por estar todo él menos 3.5 kb repetido varias veces proximalmente en el mismo cromosoma 16. El gen PKD2, por otro lado, es de más fácil análisis, pero dado que se trata de una forma poco prevalente de la enfermedad es de una ayuda relativa. Por tanto, el análisis de ligamiento seguirá siendo durante bastante tiempo la única herramienta molecular efectiva para el diagnóstico de ADPKD. Es de esperar que en el futuro el análisis mutacional directo de estos genes se estandarice y nos permita realizar el diagnóstico de casos aislados.

En nuestro estudio, la tasa de detección de mutaciones para PKD1 ha sido del 25% mientras que para PKD2 ha sido del 100%. Sin embargo, como se comentó antes, en ninguno de los dos genes existen mutaciones preferentes o zonas especialmente ricas en mutaciones que simplifiquen el proceso de búsqueda.

La presentación clínica de ADPKD es muy variable, y va desde casos raros diagnosticados prenatalmente con grandes riñones llenos de quistes, hasta un 25% de casos que presentan una función renal aceptable a los 70 años de edad. Parte de esta variabilidad es debida a la heterogeneidad genética, estando el tipo más frecuente (PKD1, 85% de los casos) asociado a una enfermedad de curso más severo (la insuficiencia renal ocurre a los 53 años como media, frente a los 69 en el caso de PKD2). Otro factor que parece influir en esa variabilidad es la posición de la mutación germinal en el gen, pero no su tipo. En el caso de PKD1, podríamos decir que las mutaciones que ocurren en la primera mitad del gen tienen un efecto más nocivo que las que ocurren en la segunda mitad. Sin embargo, a pesar de estas explicaciones, aún persiste una variabilidad intrafamiliar acentuada que sugiere que otros factores modificadores (ambientales y/o genéticos) pueden influir en el curso de la enfermedad.

El estudio genético de ADPKD en la pasada década ha aumentado enormemente nuestro conocimiento sobre la patología a nivel molecular, y es de esperar que permita diseñar nuevas terapias que contribuyan a aliviar esta frecuente enfermedad.

#### **4. PUBLICACIONES DE NUESTRO LABORATORIO RELACIONADAS CON LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN SOBRE ADPKD**

(Por orden cronológico)

- 1.- S. Somlo, B. Wirth, G. Germino, D. Weinstat-Saslow, G. Gillespie, H. Himmelbauer, L. Steevens, P. Coucke, P. Willems, L. Bachner, E. Coto, C. López-Larrea, B. Peral, J.L. San Millán, J. Lavinha, J. Saris, M. Breuning, A. Frischauf, y S. Reeders. Fine genetic localization of the gene for autosomal dominant polycystic kidney disease (PKD1) with respect to physically mapped markers. *Genomics* 13:152-158 (1992).
- 2.- J. L. San Millán, B. Peral, A. Valero, C. Hernández, y F. Moreno. Estudio genético de la enfermedad del riñón poliquístico autosómica dominante (ERPAD) en la población española. *Nefrología* 12:231-238 (1992).
- 3.- B. Peral, J.L. San Millán, C. Hernández, A. Valero, G.M. Lathrop, J.S. Beckmann, F. Moreno. Linkage studies on autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) in Spanish population: evidence of genetic heterogeneity. *J. Med. Genet.* 30:910-913 (1993).
- 4.- B. Peral, C.J. Ward, J.L. San Millán, S. Thomas, R.L. Stallings, F. Moreno, y P.C. Harris. Evidence of linkage disequilibrium in the Spanish polycystic kidney disease 1 (PKD1) population. *Am. J. Hum. Genet.* 54:899-908 (1994).
- 5.- M. Viribay, R. Ferreira, B. Peral, C.J. Ward, J. Dávalos, C. Valle, P.C. Harris, D. Méndez, F. Moreno, y J.L. San Millán. Genetic analysis of Cuban autosomal dominant polycystic kidney disease kindreds using RFLPs and microsatellite polymorphisms linked to the PKD1 locus. *Hum. Genet.* 94:432-436 (1994).
- 6.- J.L. San Millán, M. Viribay, B. Peral, I. Martínez, J. Weissenbach, F. Moreno. Refining the localization of the PKD2 locus on chromosome 4q by linkage analysis in Spanish ADPKD-type 2 families. *Am. J. Hum. Genet.* 56:248-253 (1995)
- 7.- B. Peral, V. Gamble, J.L. San Millán, C. Strong, J. Sloane-Stanley, F. Moreno, P.C. Harris. Splicing mutations of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene induced by intronic deletion. *Hum. Molec. Genet.* 4:569-574 (1995)
- 8.- M. Viribay, D. Tellería, E. Velasco, F. Moreno, J.L. San Millán. Dinucleotide repeat polymorphism at the D4S2458 locus close to the PKD2 locus on human chromosome 4q. *Hum. Genet.* 95:601-602 (1995)
- 9.- J. Hughes, C.J. Ward, B. Peral, R. Aspinwall, K. Clark, J.L. San Millán, V. Gamble, P.C. Harris. The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nature Genetics* 10:151-160 (1995)

- 10.- B. Peral, J.L. San Millán, A.C.M. Ong, V. Gamble, C.J. Ward, C. Strong, P. C. Harris. Screening the 3' region of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene reveals six novel mutations. *Am. J. Hum. Genet.* 58:86-96 (1996a).
- 11.- B. Peral, A.C.M. Ong, J.L. San Millán, V. Gamble, L. Rees, P.C. Harris. A stable, nonsense mutation associated with a case of infantile onset polycystic kidney disease 1 (PKD1). *Hum. Molec. Genet.* 5:539-542 (1996b).
- 12.- A.Gonzalo, A. Gallego, J.L. San Millán, J. Ortuño. Anticipation of end-stage renal disease in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 11:21-23 (1996).
- 13.- D. M. Iglesias, R.S. Martín, A. Fraga, M. Virginillo, A.R. Kornblihtt, E. Arrizurieta, M. Viribay, J.L. San Millán, M. Herrera, V. Bernath. Genetic Heterogeneity of autosomal dominant polycystic kidney disease in Argentina. *J. Med. Genet.* 34:827-830 (1997).
- 14.- M. Viribay, T. Hayashi, D. Tellería, T. Mochizuki, D.M. Reynolds, R. Alonso, X.M. Lens, F. Moreno, P.C. Harris, S. Somlo, J.L. San Millán. Novel stop and frameshifting mutations in the autosomal dominant polycystic kidney disease (PKD2) gene. *Hum. Genet.* 101:229-234 (1997).
- 15.- N. Hateboer, M.A.v. Dijk, N. Bogdanova, E. Coto, A.K. Saggarr-Malik, J.L. San Millán, R. Torra, M. Breuning, D. Ravine. Comparison of phenotypes of polycystic kidney disease types 1 and 2. *The Lancet* 353:103-107 (1999).
- 16.- C. Bàdenas, R.Torra, J.L.San Millán, L. Lucero, M.Milà, X. Estivill, A. Darnell. Mutational analysis within the 3' region of the PKD1 gene. *Kidney International* 55:1225-1233 (1999).
- 17.- R.Torra, M. Viribay, D.Telleria, C.Badenas, M.Watson, P.Harris, A.Darnell, J.L.San Millan. Seven novel mutations of the PKD2 gene in families with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int.* 56(1):28-33 (1999a).
- 18.- R.Torra, C.Badenas, J.L.San Millan, L.Perez-Oller, X.Estivill, A.Darnell. A loss-of-function model for cystogenesis in human autosomal dominant polycystic kidney disease type 2. *Am. J. Hum. Genet.* 65(2):345-52 (1999b).
- 19.- R.Torra, C.Badenas, L.Perez-Oller, J.L.San Millan, D.Telleria, X.Estivill, A. Darnell. Estudio mutacional de los genes PKD1y PKD2 (poliquistosis renal autosómica dominante tipo 1 y 2). *Nefrologia.* 20(1):39-46 (2000).
- 20.- N.Hateboer, B.Veldhuisen, D.Peters, M.H.Breuning, J.L.San-Millan, N.Bogdanova, E.Coto, M.A.van Dijk, A.R.Afzal, S.Jeffery, A.K.Saggarr-Malik, R.Torra, D.Dimitrakov, I.Martinez, S.S.de Castro, M.Krawczak, D.Ravine. Location of mutations

- within the PKD2 gene influences clinical outcome. *Kidney Int.* 57(4):1444-51 (2000).
- 21.- D.M.Iglesias, D.Telleria, M.Viribay, M.Herrera, V.A.Bernath, A.R.Kornblihtt, R.S.Martin, J.L. San Millan. A novel frameshift mutation (2436insT) produces an immediate stop codon in the autosomal dominant polycystic kidney disease 2 (PKD2) gene. *Nephrol.Dial.Transplant.* 15(4):477-80 (2000).
- 22.- L.Pérez-Oller, R.Torra, C.Badenas, J.L.San Millán, A.Darnell. Estudio de pérdidas de heterocigosidad y mutaciones somáticas en la poliquistosis renal autosómica dominante tipos I y II: demostración de un mecanismo recesivo a nivel celular en la cigogénesis. *Nefrología* 20(2):130-138 (2000).
- 23.- R.Torra, C.Badenas, L.Pérez-Oller, J.L.San Millan, C.Nicolau, F.Oppenheimer, M.Mila, A.Darnell. Increased prevalence of polycystic kidney disease type 2 among elderly polycystic patients. *Am.J.Kidney Dis.* 36(4):728-34 (2000).
- 24.- S.Rossetti, S.Burton, L.Strmecki, C.R. Pond, J.L.San Millán, K.Zerres, T.M.Barratt, S.Ozen, V.E.Torres, E.J.Berstralh, C.G.Winearls, P.C.Harris. The position of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene mutation correlates with the severity of renal disease. *J.Am.Soc.Nephrol.* 13:1230-1237 (2002).



## **CAPÍTULO II**

### **ESTUDIO DE LA ATROFIA MUSCULAR ESPINAL**

#### **1. INTRODUCCIÓN.**

Las Atrofias Musculares Espinales son un grupo de enfermedades causadas por la degeneración de las a motoneuronas de la médula espinal. Uno de los principales subgrupos clínicos lo constituyen las Atrofias Musculares Espinales proximales (AME).

Las AME son enfermedades hereditarias, autosómicas recesivas, que afectan aproximadamente a 1 de cada 10.000 nacidos. Se caracterizan por la aparición de atrofia muscular proximal y simétrica en las extremidades y en el tronco, y se distinguen tres formas clínicas, en base a la severidad de los síntomas y al momento de aparición de los mismos. Los tres tipos son:

- AME tipo I o enfermedad de Werdnig-Hoffmann. Los síntomas aparecen en los primeros meses de vida. Los pacientes carecen de reflejos medulares y muestran hipotonía generalizada, con los músculos de las extremidades y el tronco prácticamente paralizados, y suelen fallecer antes de alcanzar el primer año de vida

- AME tipo II o forma intermedia. Los síntomas aparecen entre los tres y los 15 meses. Los pacientes consiguen la sedestación pero nunca llegan a caminar. El pronóstico de la enfermedad depende del déficit respiratorio causado por la afectación de los centros nerviosos del control respiratorio, la supervivencia supera los cuatro años frecuentemente.

- AME tipo III o enfermedad de Kugelberg-Wellander. La edad de aparición de los síntomas es variable, entre los seis meses y los 15 años. Los pacientes presentan debilidad en la cintura pélvica pero consiguen caminar con ayuda. No hay déficit respiratorio y la esperanza de vida es casi normal.

En 1990, varios grupos demostraron la existencia de ligamiento genético entre las tres formas clínica de la AME (tipo I, II y III) y marcadores polimórficos de la región pericentromérica del brazo largo del cromosoma 5 (5q11.2-13.3). Esto indicaba que, muy probablemente, existía un único locus responsable de las tres formas clínicas.

#### **2. APORTACIÓN CIENTÍFICA**

##### **2.1. Caracterización de marcadores polimórficos ligados al locus AME y estudios de ligamiento.**

En este momento iniciamos nuestras investigaciones sobre esta enfermedad. Como en otros laboratorios, nuestro esfuerzo se dirigió a precisar la localización del locus AME. Para ello aislamos y caracterizamos nuevos marcadores polimórficos de la región, e identificamos individuos recombinantes entre el locus AME y los nuevos marcadores. Cinco marcadores altamente polimórficos se aislaron de YACs (cromosomas artificiales de levadura) que portaran la región AME, mediante dos métodos basados en la técnica de PCR, el método Alu-PCR y el del vectorette (GT11) PCR, y determinamos la posición física de cada uno de ellos en el contiguo de YACs de la región AME (Velasco y col. 1994). Los cinco marcadores que presentaban altos índices de heterocigosidad, incrementaron la información de los estudios de segregación de las familias AME. Mediante el análisis de ligamiento de nuestra serie de familias españolas AME (40 familias con al menos un individuo afectado y uno sano), con 11 marcadores polimórficos, incluidos los caracterizados en el laboratorio, determinamos la posición del locus AME en un intervalo genético de 7cM (Velasco y col 1995). El mapeo por homocigosidad en dos pedigrís consanguíneos confirmó dicha localización.

En este intervalo genético otros investigadores identificaron dos copias, en orientación invertida, de una región de 500 Kb. A su vez, cada copia contiene varios pseudogenes y secuencias repetidas de diferente naturaleza. A pesar de la complejidad estructural de la región, consiguieron identificar dos genes SMN1 y SMN2, el primero en la copia telomérica y el segundo en la copia centromérica. SMN1 y SMN2 son casi idénticos distinguiéndose por dos cambios polimórficos nucleotídicos, uno en el exón 7 y otro en el exón 8. Ambos genes se transcriben, produciendo un mRNA de 1,7 Kb, aunque el producto mayoritario de la transcripción de SMN2 es un RNA que carece del exón 7. Finalmente el exón 8 de ambos genes no codifica producto polipeptídico (Lefebvre et al. Cell 80:155-165, 1995). Estos investigadores encontraron que el 98% de pacientes AME que analizaron presentaban delección del gen SMN1 en homocigosis. En tres casos los pacientes eran heterocigotos para la delección y presentaban una mutación puntual en la copia SMN1 no deletada. Los autores concluyeron que SMN1 era el gen responsable de las tres formas de AME. Otro equipo de investigadores (Roy y col., Cell 80: 167-178, 1995), identificó un gen, en la región candidata AME, que se denominó NAIP (Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein), cuya secuencia presenta similitud con la de genes que codifican varias proteínas de baculovirus que inhiben la apoptosis celular. Los autores encontraron que los pacientes AME, de los tres tipos, portaban delección en homocigosis del gen NAIP, siendo más frecuente la delección en los pacientes tipo I que en los tipos II y III, concluyendo que NAIP también es un gen causante de AME.

## **2.2. Estudio molecular de los genes SMN y NAIP.**

Para evaluar la contribución de los genes SMN1 y NAIP a la enfermedad examinamos los 65 pacientes afectados que habíamos reunido hasta entonces. El 92,5 % presentaban delección en homocigosis de SMN1 y en cambio ningún individuo sano (padre o hermano de los pacientes) presentaba la delección en homocigosis. Tampoco encontramos ningún caso, sano o afectado, que presentara delección en homocigosis de los genes SMN1 y SMN2. La incidencia de la delección en homocigosis del gen NAIP fue 61% en afectados de tipo I, 16,7% en los del tipo II y 12,5% en los del tipo III. También identificamos cuatro individuos sanos, 2,6% de los casos, con delección en homocigosis de NAIP. Además caracterizamos varias reestructuraciones de los genes SMN1 y SMN2, genes híbridos y cambios en el número de copias, y postulamos la existencia de otros mecanismos de mutación en la región, en particular, la conversión génica. (Velasco y col. 1996, Cusco y col. 2001). Realizamos también un estudio semicuantitativo del gen SMN2 y encontramos un aumento significativo del número de copias de este gen en los padres de los pacientes tipo II y III en relación con los padres de los pacientes tipo I. Planteamos la existencia de una relación inversa entre la gravedad del fenotipo AME y el número de copias de SMN2 (Velasco y col.1996).

Del conjunto de los resultados de diferentes grupos de investigadores dedicados a la caracterización genética de los pacientes AME, se concluyó que el gen SMN1 es el gen causante de AME. Para explicar el diferente fenotipo de los tres tipos clínicos es necesario asumir la participación de otros factores genéticos (SMN2, NAIP) y posiblemente otros, que modulan profundamente la expresión de la enfermedad.

## **2.3. Investigación de los factores genéticos que controlan el fenotipo AME.**

La variabilidad fenotípica de la enfermedad es tan notable que da lugar a la diferenciación de tres formas clínicas que, inicialmente, se consideraban entidades clínicas diferentes. Más aún, se han identificado varios casos de individuos que presentando delección en homocigosis del gen SMN1 no muestran signos clínicos de la enfermedad. Aunque estos casos son poco frecuentes, menos del 0,5% de los individuos caracterizados, su existencia ilustra la importante influencia de los factores modificadores, que pueden llegar a anular el fenotipo mutante.

También, se identificaron algunas familias que presentaban variabilidad fenotípica intrafamiliar. Nosotros estudiamos dos de estos casos. En el primero, dos hermanos haplo idénticos para los marcadores de la región AME, con delección en homocigosis del gen

SMN1, presentaban diferente tipo clínico. El hermano menor era un tipo II, mientras que su hermana mayor estaba afectada de AME tipo III. En la segunda familia, la variabilidad intrafamiliar era más notable. El hijo afectado fue diagnosticado de AME tipo II a la edad de 4 años, mientras que su hermana, también portadora de delección en homocigosis del gen SMN1, no mostraba ningún signo clínico de la enfermedad y presentaba un electromiograma normal a la edad de 24 años. Además constatamos que en la mayoría de las familias que presentaban variabilidad fenotípica intrafamiliar, los pacientes del sexo femenino eran los menos afectados. Este hecho sugería la existencia de un factor modulador ligado al sexo.

Tres genes homólogos de NAIP, habían sido identificados. Uno de los tres genes, XIAP, está en el cromosoma X. Nos propusimos investigar la posibilidad de que este gen pudiera estar implicado en el control del fenotipo AME. En los cuatros individuos con delección de SMN1, de las familias con variabilidad fenotípica, amplificamos por RT-PCR la secuencia codificante del gen XIAP y secuenciamos los productos resultantes. Identificamos un cambio A1349C que produce una sustitución de glutamina por prolina. Diseñamos un ensayo de restricción con la enzima Msp1 para caracterizar el genotipo A/C de los individuos. Este análisis mostró que en las familias con variabilidad fenotípica, la gravedad de la enfermedad no parecía asociada al polimorfismo A1349C. Los dos varones que mostraban un fenotipo más severo habían heredado un alelo diferente (A/C), y las dos hermanas con diferente fenotipo (AME tipo III y "no afectada") mostraban el mismo genotipo (A,C). La falta de asociación entre el polimorfismo de XIAP y la gravedad de la enfermedad fue confirmada mediante el análisis del conjunto de individuos AME, mujeres y varones, afectos de los tres tipos clínicos. Este estudio genético nos permitió descartar la implicación del gen XIAP en el fenotipo AME (Martín y col, 2000).

Para poder analizar la implicación del gen SMN2 en el fenotipo AME, desarrollamos un método fluorescente de PCR que permite cuantificar el número de copias de los genes SMN1 y SMN2.

La cuantificación del gen SMN2 de los pacientes tipo I, II y III confirmó la correlación inversa entre el número de copias de SMN2 y el fenotipo.(Martín y col 2002). Los pacientes tipo I presentan 1 o 2 copias del gen SMN2, mientras que los de tipo II y III portan tres o más copias del gen. En nuestro grupo de pacientes (150 casos no relacionados) esta regla se cumple en todos los casos, tanto en los pacientes que portan delección homocigosis del gen SMN1 como en los casos que son heterocigotos compuestos, con delección en una copia de SMN1 y mutación puntual en la segunda copia SMN1.

Otros autores encontraron resultados similares, si bien es cierto que existen algunos casos de pacientes AME que no cumplen esta regla. Por ejemplo pacientes tipo I con más de dos copias y de tipo II y III con dos copias de SMN2. En una de nuestras familias con variabilidad fenotípica los afectados portan en mismo número de copias de SMN2 (tres) aunque uno estaba afectado por el tipo II y el otro por el tipo III. En la otra familia, el hermano afectado de tipo III y la hermana asintomática portaban ambos 4 copias de SMN2. En conclusión otros factores, además de SMN2, modulan el fenotipo AME. Estos factores aún no han sido identificados.

#### **2.4. Caracterización de pacientes heterocigotos compuestos.**

La mayoría de los pacientes AME de cualquiera de los tres tipos clínicos presentan delección en homocigosis del gen SMN1. Teniendo en cuenta el equilibrio Hardy-Weinberg, la mayoría, sino todos, de los casos restantes han de ser heterocigotos compuestos portadores de un cromosoma con delección de SMN1 y de una mutación intragénica SMN1 en el cromosoma homólogo. La caracterización de individuos heterocigotos compuestos es relevante porque permite determinar la proporción real de pacientes en los que la AME es causada por inactivación de SMN1. Por otra parte, la identificación de mutaciones puntuales en el gen SMN1 permite abordar aspectos relevantes de la patogénesis de la enfermedad tales como la regulación de la expresión génica y la función de la proteína.

Para identificar los pacientes heterocigotos compuestos comenzamos por determinar la dosis génica de SMN1 en cada paciente que no presentan delección en homocigosis. Utilizando el método fluorescente de PCR cuantitativa comprobamos que de los 150 pacientes AME que cumplían los criterios diagnósticos de la enfermedad, 14 (9,3 %) portan dos copias SMN1, 131 (87,3 %) portan delección en homocigosis y 5 casos (3,3 %) portan una sola copia de SMN1 (Martín y col. 2002). En los últimos cinco casos identificamos una mutación puntual en la secuencia codificante de SMN1 o en la región promotora que inactivan SMN1. Por tanto, la ausencia de SMN1 funcional es responsable de la AME en el 90,6 % de pacientes españoles que hemos estudiado, 95 % de los pacientes tipo I y 71 % del tipo III carecen de SMN funcional. En otro de grupo de pacientes (44 casos) que mostraban signos clínicos no concluyentes, todos los individuos conservan las dos copias del gen.

Las mutaciones encontradas en los cinco individuos heterocigotos compuestos fueron dos nuevas mutaciones, una en el exón 6 (773insC) y otra en el intrón 6 (c.867+2T->C), una mutación en el exón 3 (430del4)), identificada previamente en varios pacientes espa-

ñoles, y la mutación en el exón 6 (813ins/dup11) que aparece con relativa frecuencia en otras poblaciones (Martín y col. 2002). El número de mutaciones intragénicas identificadas en el gen SMN1 hasta ahora es relativamente pequeño (27), los tres encontrados exclusivamente en la población española deben tenerse en cuenta al plantearse el diagnóstico de pacientes españoles heterocigotos.

La secuencia codificante SMN1 del quinto paciente era normal. Sin embargo no producía ningún mensajero SMN1. La secuencia promotora mostró varios cambios puntuales, en particular un cambio en la longitud de un bloque de Adeninas (poli A) que elimina un posible sitio de unión del factor de transcripción YY1 que podría controlar la expresión de los promotores SMN (Martín y col. 2002).

En otro de grupo de pacientes (44 casos) que mostraban signos clínicos no concluyentes, todos los individuos conservan las dos copias del gen. El análisis de la delección del gen SMN1 y el estudio cuantitativo de la dosis génica son herramientas fundamentales para el diagnóstico genético de la enfermedad.

### **3. PUBLICACIONES DE NUESTRO LABORATORIO RELACIONADAS CON LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN SOBRE ATROFIA MUSCULAR ESPINAL.**

(Por orden cronológico)

- 1.- Velasco, E., De la Puente, A., Cruces, J., Valero, M.C., García-Patiño, E., Del Castillo, I., Coloma, A., Moreno, F., and Hernández-Chico, C. 1994. Dinucleotide repeat polymorphisms at the D5S1356, D5S1357 and D7S1480 loci. *Hum. Mol. Genet.* 3, 1441.
- 2.- Velasco, E., Valero, C., García, E., de la Puente, A., Cruces, J., San Millán, J.L., del Castillo, I., Coloma, A., Moreno, F., and Hernández-Chico, C. 1995. Isolation of novel microsatellites from the spinal muscular atrophy (SMA) candidate region on chromosome 5q and linkage analysis in Spanish SMA families. *Eur. J. Hum. Genet.* 3. 96-101.
- 3.- Hernández-Chico, C., Velasco Sampedro, E., Valero-Quirós, C., García-Patiño, E., Moreno Herrero, F. (1995). Diagnóstico prenatal de atrofia muscular espinal. *Ann. Esp. Pediatr.* 42: 429-435.
- 4.- Velasco, E., Valero, C., Valero, A., Moreno, F., and Hernández-Chico, C. Molecular analysis of the SMN and NAIP genes in Spanish Spinal Muscular Atrophy (SMA) families and correlation between number of copies of cBCD541 and SMA phenotype. 1996. *Hum. Mol. Genet.* 5: 257-264.
- 5.- Martín, Y., Valero, A., López-Terradas, J.M., Marsal, C., and Hernández-Chico, C.

The X-linked IAP gene does not contribute to the clinical phenotype of spinal muscular atrophy. 2000 *Clinical Genetics*. 57: 154-156.

6.- Cusco I, Barcelo MJ, del Rio E, Martín Y, Hernández Chico, C, Bussaglia E, Baiget M, Tizzano E. Characterization of SMN hybrid genes in Spanish SMA patients: de novo, homozygous and compound heterozygous cases. 2001 *Hum. Genet.* 108: 222-229.

7.- Martín Y, Valero A, del Castillo E, Pascual SI, Hernández-Chico C. Genetic study of SMA patients without homozygous SMN1 deletions: identification of compound heterozygotes and characterisation of novel intragenic SMN1 mutations. 2002. *Hum Genet.* 110: 257-263.

## **CAPÍTULO III**

### **ESTUDIO DE LA NEUROFIBROMATOSIS TIPO I**

#### **1. INTRODUCCIÓN.**

La neurofibromatosis tipo 1 (NF1) es una enfermedad monogénica, autosómica dominante, que afecta a los tejidos derivados de la cresta neural. Presenta una prevalencia de 1 en 3.000 individuos, siendo una de las enfermedades hereditarias más frecuentes. NF1 es una enfermedad pleiotrópica que afecta a una gran variedad de órganos y tejidos siendo los síntomas más característicos "manchas café con leche" en la piel, neurofibromas cutáneos y plexiformes, glioma óptico, nódulos de Lisch (hamartomas en el iris) y displasia de huesos largos. A la enfermedad pueden asociarse otras complicaciones tales como dificultades en el aprendizaje (30%), tumores en las vías ópticas (14 %), deformaciones óseas (pseudoartrosis) y escoliosis (7 %), tumores intracraneales (4%) y otros. Un porcentaje pequeño de pacientes desarrolla tumores malignos o leucemias. La NF1 muestra una expresividad variable, tanto intrafamiliar como interfamiliar. No es posible predecir la gravedad de la enfermedad y se postula la existencia de genes modificadores, no ligados al gen causante de la enfermedad (NF1), que modularían la expresión de las diferentes manifestaciones clínicas.

En 1987, mediante estudios de ligamiento genético, el gen NF1 se localizó en la región pericentromérica del brazo largo del cromosoma 17 (17q11.2). La identificación de una translocación balanceada entre los cromosomas 17 y 22 en un paciente, proporcionó los puntos físicos de referencia para la identificación del gen. En 1990, dos grupos americanos identificaron el gen NF1 y caracterizaron varios exones, y finalmente, en 1995, se consiguió la descripción de la totalidad de los exones del gen. El gen NF1 comprende aproximadamente 335 Kb de ADN genómico. El transcrito de 11Kb presenta una región codificante de 8.454 pb, comprendida en 60 exones.

La neurofibromina, la proteína del gen NF1, tiene 2.812 aminoácidos. La característica más notable de la secuencia de la proteína, es la presencia de un dominio GRD (GAP related domain), similar al dominio catalítico de la familia de proteínas activadoras de la actividad GTPasa (GAP) de las proteínas RAS. La presencia de este dominio de la proteína explica su implicación en el desarrollo de tumores.

La elevada incidencia de la enfermedad está relacionada con la alta tasa de mutación del gen NF1,  $1 \times 10^{-4}$  por gameto y generación. Esta elevada tasa de mutación explica el hecho



de que aproximadamente el 50% de los pacientes son casos esporádicos (sin antecedentes familiares) que padecen la enfermedad por la aparición de una mutación "de novo".

## **2. APORTACIÓN CIENTÍFICA**

### **2.1. Diseñando marcadores útiles para el diagnóstico.**

La extremada variabilidad fenotípica de NF1 y el hecho de que la manifestación de los síntomas sea dependiente de la edad, dificulta la consecución de un diagnóstico clínico certero, en particular en los niños. En los casos familiares con al menos dos personas afectadas, el estudio de segregación de los haplotipos permite identificar el genotipo que segrega con la enfermedad y por consiguiente determinar que individuos de la familia tienen el riesgo de padecer y transmitir la enfermedad, aspectos éstos importantes para el atento seguimiento de los pacientes por el neurólogo y para la prevención de la enfermedad a través del asesoramiento genético. El establecimiento del haplotipo que segrega con la enfermedad, caso a caso, depende de la informatividad de los marcadores utilizados, de su proximidad del gen y del desequilibrio de ligamiento entre ellos. Por lo tanto es conveniente disponer de un lote de marcadores informativos para el diagnóstico rápido, fiable y económico de los individuos portadores del gen afectado. Puesto que los marcadores disponibles en los primeros años de la década de los 90 eran poco informativos y mostraban un elevado desequilibrio de ligamiento entre ellos, nos propusimos aislar nuevos marcadores y valorar su utilidad para el diagnóstico. Revisando la parte de secuencia genómica NF1 que había sido publicada, detectamos seis repeticiones del dinucleótido (CA)-microsatélites, en los intrones 26, 27b (cuatro de ellos) y 38. De los cuatro supuestamente más informativos determinamos el número de alelos, las frecuencias alélicas y la heterocigosidad de cada uno de ellos, en nuestra población. Establecimos el genotipo de un total de 345 individuos, pacientes y familiares de las familias NF1, y con los datos obtenidos valoramos el desequilibrio de ligamiento entre parejas de marcadores, utilizando el método estadístico de la probabilidad "likelihood" (Valero y col. 1996). Este análisis mostró el desequilibrio de ligamiento esperado. Sin embargo pudimos determinar las triadas de marcadores más informativas para los estudios de segregación, estimando que con esas triadas se conseguía informatividad en el 92.5% de los casos. Las triadas son AAATAlu repeat / IVS27AC28 / IVS38GT53.0 y IVS27AC28.4 / ACI27.2 / IVS38GT53.0.

No se detectó desequilibrio de ligamiento entre los marcadores y la enfermedad, tal y como era presumible, teniendo en cuenta la elevada frecuencia de casos con mutaciones "de novo".

## **2.2. Búsqueda de mutaciones patogénicas en el gen NF1.**

### *2.2.1. Identificación de mutaciones puntuales.*

El gran tamaño del gen NF1, con 60 exones codificantes, y la existencia de once pseudogenes que muestran gran homología (superior al 90%) en la mitad 5' del gen, dificultan la identificación de las mutaciones patogénicas en los pacientes NF1.

Tras la clonación del gen en 1990, varios grupos nos propusimos la detección de mutaciones en los nueve exones (28 -37) que habían sido descritos. Aunque las técnicas de SSCP y HET eran las más empleadas, nosotros nos planteamos la utilización de la técnica del DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis), que a priori ofrece mayor sensibilidad en la detección de cambios puntuales.

Aplicamos esta técnica al análisis de los exones 29 y 31 (6% de la secuencia codificante) en 70 pacientes NF1 no relacionados. Identificamos cuatro mutaciones puntuales que causan codones de parada prematuros, en tres casos familiares y en uno esporádico (Valero y col. 1994). Se identificó también un polimorfismo en el intrón 29. Dos de los cambios puntuales - C5242T (exón 29) y C5839T (exón 31) son transiciones y ocurren en un dinucleótido CpG. La mutación del exón 31 había sido identificada previamente en otros tres pacientes NF1 no relacionados. Estos resultados y la observación de la existencia de regiones metiladas del gen NF1, el promotor y varios exones codificantes, entre ellos el 29, apoyan la hipótesis de que la metilación del gen NF1 favorece la ocurrencia de mutaciones por la desaminación de la 5 metil-citosina.

### *2.2.2. Identificación de deleciones en el gen NF1.*

El genotipado de 75 familias NF1 con los cuatro microsatélites intragénicos, nos permitió identificar seis pacientes (dos de ellos miembros de la misma familia) que mostraban pérdida de heterocigosidad (LOH) para al menos uno de los marcadores, probablemente por la existencia de una deleción. Cinco de los seis pacientes eran casos esporádicos. El sexto paciente era hijo de uno de los casos esporádicos que heredaba un alelo nulo de dicho progenitor. Confirmamos la existencia de deleciones, en cada caso, cuantificando la dosis del gen NF1, mediante hibridación con sondas de cDNA. En todos los casos confirmamos la existencia de la deleción y concluimos que las deleciones eliminaban prácticamente la totalidad del gen, al menos desde el exón 9 hasta el final del gen (Valero y col. 1997).

El resultado más notable fue que cuatro de las cinco deleciones "de novo" eran de origen materno. Este resultado contrasta con lo que ocurre en el caso de las mutaciones puntuales que, mayoritariamente, son de origen paterno. La caracterización de nuevas deleciones, en estudios posteriores, confirmó nuestro hallazgo.

### **2.3. Estudios de correlación genotipo-fenotipo.**

Una de las características más notable de la NF1 es la variabilidad de la expresión fenotípica. Aunque la mayoría de los pacientes postpuberales presentan los tres signos más característicos de la enfermedad: manchas "café con leche, neurofibromas cutaneos y nódulos de Lisch, el numero y naturaleza de las lesiones varía ampliamente. La diferente expresión es todavía más notable en lo que se refiere a la aparición de otras complicaciones que incrementan la gravedad de la enfermedad.

Con el fin de establecer una posible correlación genotipo-fenotipo, analizamos las características clínicas de los seis pacientes que portaban una delección de prácticamente la totalidad del gen. La asociación entre delección y el fenotipo caracterizado por dismorfismo facial, retraso mental y aparición de numerosos neurofibromas cutáneos había sido propuesta por otros autores. Sólo uno de nuestros pacientes presentaba dicho fenotipo. En cambio, los otros cinco casos presentaban una mayor incidencia de tumoraciones, particularmente neurofibromas plexiformes y tumores intracraneales. Postulamos que la haploinsuficiencia germinal de NF1 causa un fenotipo más severo con respecto a la tumoración (Valero et al 1997).

### **3. PUBLICACIONES DE NUESTRO LABORATORIO RELACIONADAS CON LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN SOBRE NEUROFIBROMATOSIS TIPO I**

(Por orden cronológico):

- 1.-Valero, M.C., Velasco, E., Moreno, F., and Hernández-Chico, C. 1994. Characterization of four mutations in the neurofibromatosis gene NF1 by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Hum. Mol. Genet. 3, 639-641.
- 2.-Valero, C., Velasco, E., Valero, A., Moreno, F., and Hernández-Chico, C. Linkage disequilibrium between four intragenic polymorphic microsatellites of the NF1 gene: implications for genetic counselling. 1996. J. Med. Genet. 33 : 590-593.
- 3.-Valero, M.C., Pascual-Castroviejo, I., Velasco, E., Moreno, F., and Hernandez-Chico,C. Identification of the novo deletions at the NF1 gene: no preferential paternal origin and phenotypic analysis of patients. 1997. Hum Genet. 99: 720-726.
- 4.- Hernández-Chico C, Valero MC. El diagnóstico genético de las Neurofibromatosis. 2001. En Neurofibromatosis 323-332 Editor I. Pascual-Castroviejo. Ed. Escuela Libre Editorial. Fundación ONCE. Madrid.

## **CAPÍTULO IV: ESTUDIO DE LAS HIPOACUSIAS HEREDITARIAS NO SINDRÓMICAS**

### **1. INTRODUCCIÓN**

Las pérdidas de audición (hipoacusias) son un grupo muy heterogéneo de trastornos, con una gran trascendencia social. En los países desarrollados, aproximadamente el 6-8 % de la población padece pérdidas de audición en mayor o menor cuantía. Por lo que se refiere a la población infantil, se estima que uno de cada mil niños resulta afectado por una sordera severa o profunda durante el llamado periodo prelocutivo, que abarca desde el nacimiento hasta que el niño adquiere el lenguaje hablado. Este tipo de sordera representa un serio obstáculo para la comunicación, lo cual dificulta la educación y la integración social del niño afectado. Las causas de la sordera pueden ser ambientales (trauma acústico, infecciones, ototoxicidad de fármacos) o genéticas, y a veces son combinación de ambos tipos. En los países desarrollados, más del 60% de los casos de sorderas prelocutivas se atribuyen actualmente a causas genéticas, un porcentaje que previsiblemente aumentará en los próximos años, dado que la contribución relativa de las causas ambientales va disminuyendo gracias al control sanitario de los factores responsables.

Por otra parte, en torno al 2 % de la población entre los 60 y los 70 años de edad manifiesta una pérdida auditiva mayor de 65 decibelios (dB). Por encima de los 70 años, se llega a un 30% de afectados. Estas hipoacusias, generalmente moderadas o severas, a veces profundas, de manifestación tardía, provocan un progresivo aislamiento social del individuo afectado, con el correspondiente empeoramiento de su calidad de vida. Los agentes ambientales desempeñan un importante papel en el desarrollo de estas hipoacusias, pero la contribución de los factores genéticos no debería ser subestimada, puesto que pueden intervenir, bien como el principal factor patogénico, bien incrementando la susceptibilidad (predisposición) a los factores ambientales (por ejemplo, en la pérdida auditiva debida a la exposición continuada al ruido o al tratamiento con fármacos ototóxicos).

Las hipoacusias hereditarias se clasifican en dos grandes grupos: sindrómicas, en las que la hipoacusia está asociada a otros síntomas o signos clínicos, y no sindrómicas, en las que la hipoacusia aparece aislada. Las hipoacusias sindrómicas representan el 30 % de los casos. Se han descrito más de 250 síndromes que incluyen la pérdida auditiva entre

sus manifestaciones. Podemos ilustrar la variedad de síntomas y signos asociados a la hipoacusia con unos pocos ejemplos. El síndrome de Usher asocia un trastorno visual, la retinosis pigmentaria, que conduce a la ceguera; por su parte, el síndrome de Alport asocia un trastorno del riñón, la glomerulonefritis, que suele desembocar en el fallo renal; el síndrome de Pendred asocia un trastorno endocrino, el bocio tiroideo; y el síndrome de Waardenburg asocia anomalías pigmentarias en ojos y piel, y a veces malformaciones de las extremidades. Aunque la mayoría de estos síndromes son genéticamente heterogéneos, los genes implicados en cada uno de ellos no son muchos, y bastantes han sido ya identificados. El hecho de que los signos clínicos observados en estos trastornos sean característicos, permite distinguir unas hipoacusias sindrómicas de otras, lo cual facilita su investigación y su diagnóstico molecular, al reducir el campo de búsqueda a unos pocos genes. Por su parte, las hipoacusias no sindrómicas han sido hasta hace poco las más desconocidas, aun siendo las más frecuentes, con un 70 % de los casos. Constituyen también un grupo muy heterogéneo por sus diferentes etiologías, pero difícil de clasificar si se utiliza como criterio único las manifestaciones clínicas, en general muy poco distintivas. Presentan modos de herencia muy variados: autosómicas recesivas, autosómicas dominantes, ligadas al sexo, y de herencia materna (mitocondrial). Las investigaciones sobre sorderas no sindrómicas han experimentado un desarrollo espectacular desde el año 1992, que se refleja en el elevado número de genes localizados sobre el mapa genético, y en el creciente número de genes clonados.

Actualmente, se conocen 31 loci genéticos de sorderas autosómicas recesivas (DFNB1-DFNB31), 39 loci de sorderas autosómicas dominantes (DFNA1-DFNA30, DFNA32-DFNA38, DFNA40 y DFNA41), y 4 loci de sorderas ligadas al cromosoma X (DFN2-DFN4 y DFN6). Estos datos son actualizados periódicamente en la página internacional sobre sorderas hereditarias en Internet (Van Camp G, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss Homepage, URL: <http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/hhh>).

Los genes hasta ahora identificados codifican productos implicados en funciones muy variadas:

Proteínas de membrana o asociadas a membrana: el canal de potasio KCNQ4; la pendrina, un transportador de yoduro y cloruro; las conexinas 26, 30, 31 y 43, proteínas de las uniones intercelulares de tipo comunicante o *gap junctions*; la claudina-14, proteína de las uniones intercelulares estrechas o *tight junctions*; la proteína CDH23, de la familia de las cadherinas, implicadas en adhesión celular; la proteasa de membrana TMPRSS3; la otoferlina, presuntamente implicada en el tráfico de las vesículas sinápticas generadas en

las células ciliadas internas; la wolframina, proteína localizada en la membrana del retículo endoplásmico; y TMC1, proteína de membrana de función desconocida.

Componentes del citoesqueleto de las células sensoriales del oído interno: las miosinas IIA, VI, VIIA y XV; la proteína *diaphanous-1*, reguladora de la polimerización de la actina; y la estereocilina, proteína de los estereocilios de las células ciliadas.

Componentes de la matriz extracelular: la alfa-tectorina y un colágeno de tipo XI, proteínas estructurales de la membrana tectoria del oído interno; y la coclina, presente en las estructuras de soporte y en los canales neurales del laberinto.

Reguladores transcripcionales: POU3F4, POU4F3 y EYA4.

Componentes de la maquinaria de biosíntesis de proteínas en la mitocondria: el RNA ribosómico 12S y el tRNA-Ser(UCN).

El elevado número de genes implicados y la diversidad funcional de las proteínas codificadas son consecuencias lógicas de la natural complejidad anatómica y fisiológica del oído interno humano. El catálogo presentado pudiera parecer actualmente bastante completo. Sin embargo, hay que considerar que se estima que más de cien genes pudieran estar directamente implicados en las sorderas hereditarias no sindrómicas, y que hasta el momento sólo se han identificado 24 genes nucleares de los más de 70 localizados en el mapa genético. Además, se ha postulado la existencia de genes modificadores que modularían el fenotipo asociado a las mutaciones de los genes de hipoacusia. Uno de ellos ha sido localizado (locus DFNM1).

La investigación de las sorderas no sindrómicas se concentra actualmente en las siguientes líneas. En primer lugar, siguen siendo prioritarias la localización genética y la identificación de nuevos genes de hipoacusia. Por otra parte, es necesario investigar cuál es la contribución individual de cada uno de los genes identificados y de las mutaciones en los mismos a la totalidad de los casos de hipoacusia en una población dada (epidemiología genética). Finalmente, es también importante estudiar la correlación genotipo-fenotipo en cada tipo de sordera. El conocimiento de cuáles son las mutaciones más frecuentes y de qué fenotipo cabe esperar como consecuencia de una mutación dada en un gen determinado deberá contribuir a orientar el diagnóstico molecular y el consejo genético, y será de utilidad en el momento de diseñar futuras terapias. Hay que resaltar que la mayoría de los genes de sordera que se identifican codifican componentes hasta entonces desconocidos del complejo mecanismo molecular del oído interno, y que los estudios bioquímicos, citológicos e histológicos de estas proteínas deben conducir a desentrañar las bases moleculares de la audición y la sordera.

Nuestro laboratorio comenzó a investigar las hipoacusias hereditarias en 1994. Estas investigaciones han sido financiadas por la Comunidad Europea (programa BIOMED 2, proyecto PL 951324, años 1996-1998; y proyecto QLRT-1999-00988, años 2000-2002), por la CICYT (proyecto SAF99-0025, años 1999-2002), por el FIS (proyecto 96/1556, años 1996-1998; y proyecto 00/0244, años 2000-2002) y por la ONCE. En los siguientes apartados, detallamos nuestra contribución a esta línea de investigación. Sobre el tema de las sorderas hereditarias, hemos publicado dos revisiones, una de carácter general (1), y otra centrada en hipoacusias no sindrómicas (2).

## **2. NUESTROS PRINCIPALES LOGROS EN EL CAMPO DE LAS HIPOACUSIAS HEREDITARIAS**

### **2.1. Constitución de una red española de estudio de las hipoacusias hereditarias.**

En el curso de los últimos ocho años, hemos consolidado una red nacional de estudio de las hipoacusias hereditarias, que coordina los esfuerzos de otorrinolaringólogos, pediatras, logopedas y genetistas. Actualmente está constituida por más de un centenar de colaboradores pertenecientes a unos 70 centros hospitalarios, con todas las Comunidades Autónomas representadas. Así mismo, hemos establecido colaboraciones con dos hospitales cubanos, el Hospital Pediátrico William Soler y el Hospital Hermanos Ameijeiras, ambos en La Habana. Contamos además con el apoyo de FIAPAS (Federación de Asociaciones de Padres y Amigos de los Sordos) y de los responsables de varios colegios de educación especial para niños con deficiencia auditiva.

Gracias a la colaboración de todos, hemos podido reunir una colección de más de 900 casos independientes de sorderas no sindrómicas. La colección sigue en crecimiento, con el objetivo final de obtener un censo nacional de las familias afectadas por las hipoacusias hereditarias, así como un banco de DNAs de los pacientes. El diagnóstico molecular de los casos de la colección permite la clasificación de las familias en función de la etiología de su sordera, lo cual debe posibilitar el acceso de los individuos afectados a las terapias, específicas para cada tipo de sordera, que previsiblemente irán desarrollándose en el futuro.

### **2.2. Hipoacusias no sindrómicas de herencia autosómica recesiva.**

#### *2.2.1. Hipoacusia de tipo DFNB1.*

La hipoacusia de tipo DFNB1 es neurosensorial, prelocutiva y, en la mayoría de los casos, severa o profunda. De los numerosos loci genéticos de sordera autosómica recesiva, DFNB1 fue el primero en ser identificado. Se localiza en el brazo largo del cromosoma

soma 13, próximo al centrómero (región 13q12). Dentro de este locus se encuentra el gen *GJB2*, responsable de hasta el 50% de los casos de sordera prelocutiva en la mayoría de las poblaciones estudiadas. El gen *GJB2* codifica la conexina-26, proteína de las uniones intercelulares de tipo comunicante (*gap junctions*). Seis monómeros de conexina se unen entre sí para formar un hexámero, denominado conexón, que se localiza en la membrana plasmática. Allí, cada conexón se une a otro conexón de la célula adyacente, para constituir un canal intercelular. Se piensa que los canales intercelulares de conexina-26 desempeñan un importante papel en el reciclaje del potasio que entra en las células ciliadas como parte del mecanismo de transducción de la señal auditiva.

En nuestro laboratorio hemos estudiado un total de 422 casos independientes de sordera prelocutiva no sindrómica, recogidos por nuestra red de colaboradores en España y en Cuba. De estos, 193 se clasificaron como casos familiares (aquellos con más de un afectado en la familia; 167 casos españoles y 26 cubanos). Los restantes 229 fueron clasificados como casos esporádicos, sin antecedentes familiares (197 españoles y 32 cubanos). La búsqueda de mutaciones en el gen *GJB2* produjo los siguientes resultados:

1) En un total de 129 casos encontramos mutaciones en los dos alelos del gen *GJB2*. En los casos españoles, el alelo mutante mayoritario fue el 35delG (67,8 %). Otros alelos frecuentes fueron: W24X (6 %), E47X (3,7 %), W77R (2,6 %) y N206S (1,8 %). Se encontraron además otros 16 alelos mutantes minoritarios (frecuencia de cada uno, igual o menor al 1 %) (manuscrito en preparación). En los casos cubanos, el alelo mayoritario fue también el 35delG (61,5 %). Se encontraron, además, otros alelos frecuentes, como R143W (7,7%) y W77R (5,1 %), y un total de 8 alelos minoritarios (3). Estos datos de epidemiología genética orientan el diagnóstico molecular, puesto que permiten diseñar protocolos de detección de mutaciones adaptados a cada población. En la actualidad disponemos de tests genéticos específicos, diseñados y/o puestos a punto en nuestro laboratorio, para la detección de las mutaciones más frecuentes en el gen *GJB2* en las poblaciones española y cubana.

2) En 44 casos, encontramos una mutación en un alelo del gen *GJB2*, pero la búsqueda exhaustiva de mutaciones en el otro alelo (región promotora, sitios de corte y empalme (*splicing*) del RNA, y región codificante) no reveló ninguna mutación. Resultados similares a éste han sido obtenidos por otros autores en sus respectivas colecciones de pacientes, representando los heterocigotos no elucidados porcentajes del 10-42 % de los casos con mutaciones en *GJB2*. Nuestros 44 casos fueron genotipados para los marcadores genéticos de tipo microsatélite D13S141, D13S175, D13S1275 y D13S292, los



cuales se localizan en la región 13q12, muy próximos al gen *GJB2*. El análisis de haplotipos para estos cuatro marcadores permitió excluir ligamiento al locus DFNB1 en 11 casos, que deben su sordera a otra causa genética, pero además son portadores de una mutación en *GJB2*. Su hallazgo casual durante nuestra búsqueda se explica por la alta frecuencia de portadores de las mutaciones *GJB2* en la población española (2,5 % considerando sólo la mutación 35delG). En 24 casos, el análisis de haplotipos no resultó informativo. Finalmente, en 9 casos se obtuvieron resultados compatibles con ligamiento a DFNB1. Esto sugería que, al menos en estos casos, alguna otra mutación en la región 13q12 debería acompañar a la ya identificada en *GJB2*.

El análisis de haplotipos nos permitió obtener además dos interesantes datos. En primer lugar, observamos en nueve familias una falta de consistencia en la segregación del marcador D13S175, que sugería la presencia de un alelo no amplificable o deleciónado. En segundo lugar, en dos miembros afectados de la familia S008, este marcador no podía ser amplificado ni siquiera utilizando diferentes parejas de cebadores. Estos resultados eran consistentes con la existencia de una deleción en la región 13q12, que involucraba al marcador D13S175. La deleción fue confirmada mediante estudios de hibridación con sondas de DNA radiactivas (*Southern blots*). Mediante técnicas de paseo cromosómico, pudimos identificar los límites de la deleción y amplificar y secuenciar la región crítica que contiene el empalme de los dos puntos de rotura. La deleción abarca unas 342 kb de DNA genómico y rompe el gen *GJB6*, que codifica la conexina-30. Esta conexina se expresa en los mismos tipos celulares del oído interno que la conexina-26 y es capaz de formar canales heterotípicos (mixtos) con ésta, lo cual podría explicar el hallazgo de esta mutación en pacientes con sordera. La comparación de secuencias de las zonas que contienen los puntos de rotura revela una escasa similitud, lo que sugiere que el mecanismo molecular de esta deleción se basa en la recombinación ilegítima. El conocimiento preciso del empalme de los puntos de rotura nos permitió diseñar un test específico, simple y rápido, basado en la PCR, para la detección de esta deleción en nuestra colección de pacientes. En total, encontramos la deleción, denominada del(GJB6-D13S1830), como segundo alelo DFNB1 en 22 de nuestros heterocigotos *GJB2* no elucidados. Además, detectamos la deleción en homocigosis en otro caso de la colección que tenía ambos alelos *GJB2* intactos. Estos resultados han sido publicados en el prestigioso *New England Journal of Medicine* (4).

Nuestros datos sugieren que el locus DFNB1 es un locus de hipoacusia complejo, que contiene dos genes, *GJB2* y *GJB6*, que codifican productos estructural y funcionalmente relacionados, las conexinas 26 y 30; y que la segregación de las mutaciones en estos

genes puede generar patrones de herencia monogénicos o digénicos de la sordera prelocutiva. En nuestra muestra, la mutación del(GJB6-D13S1830) representa aproximadamente el 7.7 % de los alelos DFNB1 mutantes en las familias españolas, lo que la convierte en la segunda mutación más frecuente, responsable de sordera prelocutiva, en la población española. Nuestros datos más recientes indican que la delección está presente en todas las poblaciones hasta ahora investigadas (Francia, Gran Bretaña, Israel, Estados Unidos, Australia), lo cual está permitiendo aclarar numerosos casos de heterocigotos *GJB2* pendientes de diagnóstico. Una veintena de laboratorios por todo el mundo se han interesado por nuestro test de detección, y a todos ellos les hemos proporcionado información y ayuda para su puesta a punto.

En conjunto, nuestros datos indican que la sordera de tipo DFNB1 representa el 36 % de todos los casos de sordera prelocutiva no sindrómica de causa genética. En nuestro laboratorio han recibido diagnóstico molecular unos 250 pacientes con este tipo de sordera. Se ha realizado diagnóstico prenatal en dos casos, que llevaron su embarazo a término, siendo ambos niños normoyentes, de acuerdo con la predicción derivada de los tests genéticos. Actualmente estamos estudiando detalladamente las características clínicas de los pacientes con este tipo de sordera, a fin de investigar las posibles correlaciones entre genotipo y fenotipo.

### *2.2.2. Mutaciones en el gen GJB2 en el síndrome KID.*

El síndrome KID (por *Keratitis-Ichthyosis-Deafness*, MIM 148210) es una displasia ectodérmica congénita caracterizada por la asociación de lesiones hiperqueratósicas de la piel con queratitis vascularizante e hipoacusia neurosensorial profunda. Otras características observadas son: alopecia, uñas distróficas, anomalías dentales, riesgo incrementado de desarrollar carcinoma de células escamosas, y susceptibilidad incrementada a las infecciones bacterianas o micóticas de la piel. La mayoría de los casos de este síndrome son esporádicos, pero la existencia de casos familiares sugería una etiología genética.

Nuestro equipo tuvo la oportunidad de estudiar el caso de una joven de 17 años afectada por el síndrome desde su nacimiento. Los hallazgos dermatológicos, oftalmológicos y audiológicos confirmaron el diagnóstico de síndrome KID. En los últimos años, diferentes trabajos han mostrado la implicación de varios miembros de la familia de las conexinas (en concreto, la 26, la 30 y la 31) en síndromes que asocian trastornos dermatológicos a la hipoacusia. Por consiguiente, decidimos investigar en nuestra paciente los genes que codifican dichas conexinas (*GJB2*, *GJB6*, y *GJB3*, respectivamente). Las regiones codificantes completas de estos tres genes fueron secuenciadas. No se observó

ninguna alteración significativa en los genes *GJB3* y *GJB6*, pero en el gen *GJB2* encontramos una nueva mutación, la sustitución del residuo de aspartato en la posición 50 del polipéptido por un residuo de asparagina (D50N). La mutación no estaba presente en ninguno de los padres de la paciente. El estudio de la segregación de varios marcadores genéticos próximos al gen *GJB2* no reveló ninguna inconsistencia en la transmisión de alelos de padre y madre a la hija afectada, por lo cual concluimos que la mutación encontrada debió surgir *de novo*, resultado consistente con el hecho de que la mayoría de los casos de síndrome KID son esporádicos.

El aspartato-50 es un residuo conservado en la mayoría de las conexinas, que se localiza en el primero de los dos lazos extracelulares de la proteína y parece intervenir en la interacción entre conexones y en el control por voltaje de la apertura del canal. En este mismo dominio se localizan los residuos alterados por otras mutaciones del gen *GJB2* en trastornos que asocian signos dermatológicos a hipoacusia, lo que resalta el importante papel que debe desempeñar este dominio en las interacciones entre monómeros de conexinas en la piel. Este trabajo se encuentra sometido a evaluación para publicación en *American Journal of Medical Genetics* (5).

### 2.2.3. Hipoacusias de tipo *DFNB9* y *DFNB8/B10*.

Dado que el diagnóstico molecular de las mutaciones en el gen de la conexina 26 elucida solamente un 36 % de los casos de hipoacusias prelocutivas, es necesario investigar qué otras mutaciones en otros genes de sorderas pueden ser frecuentes en la población española, para incluirlas en los protocolos de diagnóstico y elevar el porcentaje de casos resueltos. Con este fin, seleccionamos 28 familias de nuestra colección de sorderas prelocutivas no sindrómicas, en las que se había descartado la presencia de mutaciones en el locus *DFNB1*. Todas estas familias, si bien no eran susceptibles de análisis de ligamiento genético, sí que eran estudiables mediante análisis de haplotipos destinado a detectar compatibilidad con ligamiento a un locus dado. En seis de estas familias, los padres eran consanguíneos. Decidimos investigar los loci *DFNB9* y *DFNB8/B10*.

#### 2.2.3.1. Hipoacusias de tipo *DFNB9*.

La hipoacusia de tipo *DFNB9* es neurosensorial, prelocutiva y de severa a profunda. El locus *DFNB9*, en la región cromosómica 2p22-p23, contiene el gen *OTOF*, que codifica la otoferlina, una proteína citosólica anclada a la membrana, que pertenece a una familia de proteínas con seis dominios C2 de unión a calcio. Se ha postulado su implicación en el tráfico de las vesículas sinápticas generadas en las células ciliadas internas.

En primer lugar, genotipamos a todos los individuos disponibles de cada familia para los marcadores genéticos D2S158, D2S2223, D2S2350 y D2S174, muy próximos al gen *OTOF* en 2p22-p23. El análisis de haplotipos reveló que en 6 de las 28 familias estudiadas, incluyendo una de las consanguíneas, existía compatibilidad con ligamiento a DFNB9. En un paciente y en un progenitor de cada familia compatible, se realizó una búsqueda de mutaciones en el gen *OTOF*, exón por exón, mediante análisis de heterodúplex de DNA, seguido de secuenciación de los casos positivos. De esta manera, se identificó en la familia consanguínea una nueva mutación, que consiste en la sustitución de un codón de glutamina por un codón de terminación prematuro (Q829X). La mutación se encontraba en homocigosidad en los pacientes de la familia estudiada. Se diseñó un test para la detección fácil y rápida de esta mutación, basado en la amplificación por medio de la PCR de un fragmento de DNA, que luego se digiere con la enzima de restricción *BfaI* (la mutación crea un nuevo sitio de reconocimiento para *BfaI*, lo que permite distinguir el alelo silvestre del mutante). La aplicación de este test a nuestra colección de casos de sordera prelocutiva en los que ya se había descartado la presencia de mutaciones en el locus DFNB1, detectó 11 nuevos casos. En 10 de ellos, los pacientes eran homocigotos para la mutación, mientras que en el caso restante, la mutación se encontraba en heterocigosis. En ese caso, la búsqueda de la mutación acompañante reveló la presencia de un cambio en el exón 44 del gen, que produce la sustitución del codón de prolina 1825 por un codón de alanina (P1825A). Esta mutación afecta a un residuo de prolina bien conservado, dentro del sexto dominio C2 de la proteína, implicado en la unión a calcio. Esta mutación parece poco frecuente, ya que no se encontró en ningún caso adicional de nuestra colección. Las dos mutaciones descubiertas durante este estudio, Q829X y P1825A, son las primeras mutaciones descritas en el gen *OTOF* en poblaciones occidentales (6). La mutación Q829X es responsable de un 3% de los casos de sordera prelocutiva no sindrómica de nuestra muestra, lo que la convierte en la tercera mutación más frecuente en la población española. Por esta razón, ya ha sido incorporada a los tests de diagnóstico que se aplican a toda muestra que llega al laboratorio, de manera sistemática. Nuestro análisis de haplotipos para marcadores genéticos próximos al gen *OTOF*, indican que su elevada frecuencia parece deberse a un efecto fundador en la población española (6). Queda pendiente ver su relevancia en otras poblaciones.

#### 2.2.3.2. *Hipoacusias de tipo DFNB8/B10.*

El locus DFNB8/B10, en la región cromosómica 21q22, contiene el gen *TMPRSS3*, que codifica una serín-proteasa transmembranar cuya función en el oído interno se desconoce.

En nuestro laboratorio genotipamos a todos los individuos disponibles de cada una de las 28 familias seleccionadas (ver apartado 2.2.3) para los marcadores genéticos D21S1225 y 994G8.CA82, muy próximos al gen *TMPRSS3* en 21q22. El análisis de haplotipos reveló que en 9 de las 28 familias estudiadas, incluyendo una de las consanguíneas, existía compatibilidad con ligamiento a DFNB8/B10. En un paciente y en un progenitor de cada familia compatible, se realizó una búsqueda de mutaciones en el gen *TMPRSS3*, exón por exón, mediante análisis de heterodúplex de DNA, seguido de secuenciación de los casos positivos. De esta manera, se identificó en la familia consanguínea la mutación IVS4-6G>A, que crea un nuevo sitio de corte y empalme del RNA (*splicing*). Esto añade cuatro pares de bases a la secuencia del exón 4, generando un cambio de fase de lectura que es responsable de la pérdida de función. Esta mutación ya había sido descrita previamente en una familia paquistaní. Sin embargo, parece poco frecuente, ya que no se encontró en ningún caso adicional de nuestra colección.

En las 8 familias restantes, no se encontró ninguna mutación causante de patología, lo que sugiere que las mutaciones en el gen *TMPRSS3* no son frecuentes en la población española.

#### 2.2.4. Hipoacusias de tipo DFNB16.

La hipoacusia de tipo DFNB16 es neurosensorial, prelocutiva y severa. El locus DFNB16 fue inicialmente mapeado en la región cromosómica 15q13-q21, en un intervalo de unos 20 cM delimitado por los marcadores D15S994 y D15S155. El estudio de una familia de nuestra colección (familia S040), con varios individuos portadores de recombinaciones en la región crítica, nos permitió refinar la localización de DFNB16, situándolo en un intervalo genético de 5 cM, cuyos límites eran los marcadores D15S994 y D15S132 (7).

La reducción del tamaño del intervalo permitió abordar la identificación del gen responsable de la sordera de tipo DFNB16. Este trabajo fue realizado en colaboración con el equipo de la Dra. Christine Petit, del Instituto Pasteur de París. Varios genes candidatos fueron examinados, buscando mutaciones que los validaran como responsables de sordera. Finalmente, se encontraron mutaciones en un nuevo gen, *STRC*, que codifica la estereocilina, proteína componente de los estereocilios de las células ciliadas. Los individuos afectados de la familia S040 era heterocigotos compuestos para dos mutaciones en el gen *STRC*: una deleción de 4 pares de bases (2171-2174delTTTG), que genera un cambio en la fase de lectura y la aparición de un codón de terminación prematuro, y una deleción grande que elimina la mitad 3' del gen (8).

### **2.3. Hipoacusias no sindrómicas de herencia autosómica dominante.**

#### *2.3.1. Identificación de nuevos loci de hipoacusias de herencia dominante.*

El estudio de tres familias grandes, con numerosos individuos afectados en varias generaciones, nos ha permitido identificar tres nuevos loci de hipoacusias no sindrómicas autosómicas dominantes, y describir en detalle sus características clínicas más relevantes (manuscritos en preparación).

En una primera etapa, se genotiparon todos los individuos colaboradores de cada familia para una selección de marcadores genéticos de tipo microsatélite, que se encuentran localizados próximos a los loci de hipoacusia dominante ya conocidos. El análisis de ligamiento permitió excluir todos los loci conocidos hasta la fecha. En una segunda etapa, se realizó una búsqueda de ligamiento por todo el genoma. Para ello se utilizó una colección de 394 marcadores microsatélites, distribuidos uniformemente por todos los cromosomas, a intervalos de unos 10 cM de promedio. En los casos en que se sospechó ligamiento, éste se confirmó estudiando más marcadores microsatélites de la misma región.

El primer locus se identificó en una familia de Cádiz (familia S281). La hipoacusia en estos pacientes comienza a manifestarse entre los 8 y los 10 años. Inicialmente, sólo afecta a las frecuencias bajas y medias. Posteriormente va progresando, a un ritmo de aproximadamente 1,1 dB por año, y termina afectando también a las frecuencias altas. El nuevo locus se encuentra en la región 3q28-q29, en un intervalo de unos 3 cM delimitado por los marcadores D3S1314 y D3S2418.

El segundo locus se identificó en una familia de las Islas Canarias (familia S277). La pérdida auditiva en estos pacientes comienza en la primera década de vida. Inicialmente, sólo afecta a las frecuencias bajas y medias. Luego progresa, especialmente en frecuencias medias, de forma que el perfil audiométrico adquiere forma de cubeta. El nuevo locus se encuentra en la región 1q21-q23, en un intervalo de unos 4 cM delimitado por los nuevos marcadores microsatélites, definidos en nuestro laboratorio, STS292 y STS1169.

El tercer locus se identificó en una familia de Valladolid (familia S403). La hipoacusia en estos pacientes comienza a manifestarse en la segunda década de vida. Inicialmente, sólo afecta a las frecuencias medias y altas. Luego, va progresando hasta afectar a todas las frecuencias. El nuevo locus se encuentra en la región 7q31, en un intervalo de unos 4 cM delimitado por los marcadores D7S1875 y D7S2519.

#### *2.3.2. Nueva mutación en el gen de la $\alpha$ -tectorina.*

Se estudió una familia grande, con 9 individuos afectados en tres generaciones, que presentaba una hipoacusia postlocutiva progresiva, con afectación principal de las frecuen-

cias medias. Se genotiparon todos los individuos colaboradores de la familia para una selección de marcadores genéticos de tipo microsatélite, que se encuentran localizados próximos a los loci de hipoacusia dominante ya conocidos. El análisis informático permitió excluir la mayoría de los loci conocidos, pero detectó ligamiento a marcadores del locus DFNA8/A12, con un valor máximo de lod-score de 3,67 a una fracción de recombinación (r) igual a cero, para el marcador D11S4089.

El locus DFNA8/A12 contiene el gen de la  $\alpha$ -tectorina (*TECTA*), uno de los principales componentes no colagenosos de la membrana tectoria del oído interno. Esta membrana es una matriz extracelular que recubre la superficie apical del epitelio sensorial de la cóclea, y desempeña un importante papel en la transmisión de la energía del sonido a los penachos de estereocilios de las células ciliadas, que son sensibles a la tracción mecánica. El precursor de la  $\alpha$ -tectorina consta de: una región similar al dominio G1 de la entactina; un módulo central que contiene elementos repetidos de tipo D del factor de von Willebrand y que es similar a la zonadhesina; y finalmente, de un dominio de tipo zona pelúcida. Este precursor sufre un procesamiento proteolítico que separa estos tres dominios, aunque los polipéptidos quedan unidos entre sí por medio de puentes disulfuro, e interaccionan con la  $\alpha$ -tectorina para formar la matriz no colagenosa de la membrana tectoria.

Se emprendió una búsqueda de mutaciones, exón por exón, en toda la región codificante del gen *TECTA*. Se detectó una nueva mutación en el exón 17, que produce la sustitución de un codón de cisteína por un codón de glicina (C1837G) (9). La cisteína 1837 está situada en el dominio de tipo zona pelúcida (ZP) de la proteína, y es un residuo bastante conservado entre los dominios ZP que se conocen en otras proteínas. Su sustitución por una glicina impediría la correcta formación de los puentes disulfuro que unen los dominios de la  $\alpha$ -tectorina después del procesamiento proteolítico del precursor. La hipoacusia en la familia en estudio es progresiva, lo cual podría ser consecuencia del continuado deterioro mecánico de una membrana tectoria mal estructurada. Por otra parte, en esta familia la pérdida auditiva afecta principalmente a las frecuencias medias, lo que provoca un típico perfil audiométrico en cubeta. Esto podría deberse al dominio afectado por la mutación C1837G, puesto que otras mutaciones previamente descritas en el dominio ZP también producen hipoacusias con perfil en cubeta (9).

## **2.4. Hipoacusias no sindrómicas de herencia ligada al sexo.**

### *2.4.1. Identificación del nuevo locus DFN6.*

El estudio de una familia española con 12 varones afectados en cuatro generaciones, nos permitió definir el nuevo locus de hipoacusia ligada al sexo DFN6 (10).

La hipoacusia en los varones es no sindrómica, neurosensorial y progresiva. La pérdida auditiva se manifiesta en la infancia, entre los 5 y los 7 años de edad, y afecta principalmente a las frecuencias altas. Después prosigue su evolución hasta volverse severa o profunda, con todas las frecuencias afectadas al alcanzar la edad adulta. La mayoría de las mujeres portadoras manifiestan una pérdida auditiva moderada en frecuencias altas, a partir de la cuarta década de vida. Por esta razón, la herencia de este tipo de sordera es ligada al sexo de tipo dominante.

Todos los individuos colaboradores de la familia fueron genotipados para una selección de marcadores microsatélites espaciados uniformemente por todo el cromosoma X, a intervalos de 10 cM de promedio. Encontramos evidencia de ligamiento a marcadores de la región Xp22. El estudio de numerosos marcadores de esta región mediante análisis de ligamiento y de haplotipos nos permitió precisar la localización del nuevo locus de sordera, al que denominamos DFN6. Se encontraba situado en un intervalo de unos 15 cM, delimitado por los marcadores DXS7108 y DXS7105 (10). En el curso del trabajo, identificamos una recombinación dentro del intervalo crítico, en un varón que aún no había alcanzado la edad de manifestación de la sordera, por lo que su estado clínico era desconocido. Recientemente, una reevaluación de este paciente encontró las características típicas de la pérdida auditiva de su familia. Por consiguiente, hemos podido refinar la localización de DFN6, definiendo un nuevo intervalo crítico, de 8 cM, delimitado por los marcadores DXS8022 y DXS7105. Esta reducción del intervalo crítico debe facilitar la identificación del gen responsable de la hipoacusia en esta familia.

#### 2.4.2. Caracterización de familias con hipoacusia de tipo DFN3.

La hipoacusia de tipo DFN3 (MIM 304400) es una hipoacusia progresiva mixta (neurosensorial y conductiva). Se caracteriza por tres anomalías fundamentales: la fijación del estribo, la dilatación de los conductos auditivos internos, y una comunicación anormalmente amplia entre la vuelta basal de la cóclea y el conducto auditivo interno. Esta última característica tiene como consecuencia un incremento de la presión perilinfática, que es responsable del escape de perilinfa (*gusher*) que se produce al liberar quirúrgicamente la fijación del estribo. El *gusher* es típico en esta forma de hipoacusia y representa una importante complicación operatoria que suele conducir a un empeoramiento radical de la sordera del paciente. Dado que la fijación del estribo suele producirse también en la otosclerosis, trastorno conductivo mucho más frecuente que la hipoacusia de tipo DFN3, es habitual que los pacientes con este tipo de sordera sean encaminados a operaciones de estapedectomía. Por consiguiente, es importante la detección de la sordera de tipo DFN3



por medios genéticos, a fin de desaconsejar la intervención quirúrgica, que no aporta ningún beneficio a estos pacientes.

El gen responsable de esta sordera fue identificado en 1995. Se trata del gen *POU3F4*, que codifica el factor transcripcional del mismo nombre. Este factor transcripcional está implicado en la regulación del desarrollo del oído interno. Desde su descubrimiento, se han identificado numerosas mutaciones puntuales en la región codificante del gen en pacientes con hipoacusia de tipo DFN3. Sin embargo, entre los casos analizados parecen predominar las deleciones, desde microdeleciones hasta deleciones extensas de varios cientos de kilobases. Se da incluso la paradoja de que algunos pacientes llevan deleciones extensas que no afectan al gen *POU3F4*, que permanece intacto y funcional. Para explicar estos casos, se ha postulado la existencia de un segundo gen responsable de sordera en la misma región o, alternativamente, un elemento regulador de la expresión del propio gen *POU3F4*.

Nosotros hemos estudiado dos familias cubanas (S011 y S055) y dos españolas (S019 y S036) con sordera de tipo DFN3 (11, 12). En la familia S036 hemos detectado una deleción grande, que elimina el gen *POU3F4* completo y grandes trechos de secuencia adyacentes, lo cual es causa de un síndrome de contigüidad que incluye hipoacusia y retraso mental. En la familia S011 hemos encontrado una deleción más pequeña, que solamente afecta al gen *POU3F4*, produciendo hipoacusia no sindrómica. Finalmente, en las familias S019 y S055, se ha detectado la existencia de sendas deleciones centrómeras al gen *POU3F4*, que permanece intacto. Estas deleciones afectarían al hipotético segundo gen del locus, o al elemento regulador de *POU3F4* postulado por varios autores. El estudio clínico detallado de la familia S019 reveló la existencia de una malformación de Mondini en la cóclea de los pacientes, signo clínico que se asocia por primera vez a la sordera de tipo DFN3 (11).

## **2.5. Hipoacusias no sindrómicas de herencia materna (mitocondrial).**

El genoma mitocondrial es una pequeña molécula de DNA circular (16.569 pb), cuya secuencia de nucleótidos se conoce en su totalidad. Codifica 13 polipéptidos (subunidades de la cadena de transporte de electrones de la fosforilación oxidativa), 2 RNAs ribosómicos (rRNAs) y 22 RNAs transferentes (tRNAs). Así pues, el genoma mitocondrial codifica solamente una pequeña parte de los componentes necesarios para la función de la mitocondria. El genoma nuclear codifica los componentes restantes, los cuales, una vez sintetizados, son transportados a la mitocondria. Entre estos componentes sintetizados a partir de genes nucleares se encuentran más de 80 subunidades de la cadena de transporte de

electrones, la DNA polimerasa  $\gamma$  (que replica el mtDNA), la maquinaria de transcripción de los genes mitocondriales y la totalidad de las proteínas ribosómicas mitocondriales.

Puesto que el mtDNA se encuentra confinado en la mitocondria, su replicación, transcripción y traducción tienen lugar en el interior de la misma. La traducción mitocondrial utiliza un código genético propio, es decir, el significado de algunos codones cambia con respecto al código genético universal, y el número de tRNAs utilizado es menor (solamente los 22 codificados por el mtDNA).

Una importante peculiaridad del mtDNA es que se transmite a los hijos exclusivamente por vía materna. Durante la fecundación, el espermatozoide transfiere al óvulo su genoma nuclear. Sin embargo, los genomas mitocondriales del espermatozoide no penetran en el óvulo y, si lo hacen, no llegan a perdurar. Por esta razón, los genomas mitocondriales de que va a disponer el cigoto proceden en su totalidad del óvulo materno. En consecuencia, el genoma mitocondrial y las mutaciones en el mismo se transmiten según un patrón de *herencia materna*, es decir, las madres transmiten su genoma mitocondrial a sus hijos, tanto varones como mujeres.

El mtDNA acumula mutaciones con facilidad, téngase en cuenta que su tasa de mutación es 10 veces superior a la del DNA nuclear. En los individuos normales, prácticamente el 100% de sus moléculas de mtDNA son idénticas, situación que se define con el término de *homoplasmia*. Cuando en el mtDNA surge una mutación y se extiende por la población de mitocondrias, coexisten en la misma célula dos tipos de mtDNA, el normal y el mutante. A esta situación se le denomina *heteroplasmia*. Si el mtDNA mutante llega a proliferar tanto como para desplazar a todo el mtDNA normal, se dice que la mutación se ha *fijado*, alcanzando la homoplasmia. Es importante destacar que aquellas mutaciones que causen un grave trastorno de la fosforilación oxidativa pudieran ser solamente viables en heteroplasmia. Por otra parte, los órganos y tejidos más afectados por las mutaciones en el mtDNA serán aquellos que tengan un mayor requerimiento energético: el sistema nervioso central y los órganos de los sentidos, el músculo, el corazón, el riñón y las glándulas endocrinas. Por lo que se refiere a las hipoacusias hereditarias, las mutaciones mitocondriales son responsables de patologías tanto sindrómicas como no sindrómicas. En nuestro laboratorio hemos estudiado dos mutaciones responsables de hipoacusias no sindrómicas, A1555G y T7510C.

#### 2.5.1. Mutación A1555G en el gen del RNA ribosómico mitocondrial 12S.

Esta mutación es responsable de hipoacusia no sindrómica y además confiere una susceptibilidad incrementada a la ototoxicidad de los antibióticos aminoglucósidos.

Los antibióticos aminoglucósidos constituyen un extenso grupo que incluye, entre otros, a la estreptomicina, la gentamicina, la kanamicina y la neomicina. Es bien conocida su capacidad para provocar daños vestíbulo-cocleares cuando se usan en altas dosis durante periodos de tiempo prolongados. Por otra parte, se ha observado que también pueden producir daños cocleares en dosis bajas en individuos susceptibles. Esta susceptibilidad es hereditaria y se transmite según un patrón de herencia materna, lo cual sugería que alteraciones en el genoma mitocondrial podrían constituir la base genética de la susceptibilidad. El estudio de familias en las que varios miembros habían sufrido pérdidas auditivas después del tratamiento con aminoglucósidos reveló que todos los pacientes tenían en común la mutación A1555G en el gen del rRNA mitocondrial 12S, en homoplasmia. La mutación A1555G se encontró también en homoplasmia en una gran familia consanguínea árabe-israelí afectada de sordera neurosensorial no sindrómica. En esta familia pudo determinarse con seguridad que ninguno de sus miembros había recibido tratamiento con aminoglucósidos, lo que significaba que la mutación A1555G es, por sí sola, responsable de hipoacusia no sindrómica.

Hemos investigado la presencia de la mutación A1555G en un total de 571 familias con hipoacusias no sindrómicas, tanto prelocutivas como postlocutivas. Téngase en cuenta que, como luego veremos, la hipoacusia debida a la mutación A1555G es normalmente postlocutiva, pero es también responsable de unos pocos casos de hipoacusia prelocutiva, normalmente debidos al tratamiento precoz del paciente con antibióticos aminoglucósidos. Los tests genético- moleculares revelaron la presencia de la mutación en 97 familias, las cuales representan el 17 % del total, un porcentaje que asciende al 33 % si solamente consideramos los casos postlocutivos. Este alto porcentaje no se sospechaba previamente a la realización del estudio, y obligará a corregir los datos epidemiológicos hasta hace poco vigentes sobre la incidencia y prevalencia de los distintos tipos de herencia de las hipoacusias familiares en España (13, 14). Resultados similares han sido obtenidos por el equipo del Dr. Xavier Estivill en Barcelona.

En la mayoría de los casos, el patrón de herencia materna era evidente. Sin embargo, en algunas familias, puede confundirse con otros tipos de herencia.

Se investigó el posible papel de los antibióticos aminoglucósidos en la inducción de la sordera en estas familias. Sorprendentemente, aunque el tratamiento con dichos antibióticos pudo ser documentado en algunos individuos afectados, en la mayoría de los pacientes no hay evidencia alguna de su uso. Es más, en numerosas familias no hay ningún individuo afectado que fuera tratado con estos antibióticos.

En pacientes tratados con aminoglicósidos, la pérdida auditiva fue subsiguiente al tratamiento. En algunos casos en que ya se había manifestado una ligera pérdida auditiva, el tratamiento desencadenó un súbito empeoramiento de la hipoacusia. En los casos en que la ototoxicidad fue excluida, la edad de manifestación de la hipoacusia fue variable, desde congénita a la segunda década de la vida.

Entre los portadores de la mutación existe una amplia variación fenotípica:

- a) Individuos con audiogramas perfectamente normales. Suele tratarse de niños o jóvenes, por debajo aún de la edad de manifestación.
- b) Individuos sin conocimiento subjetivo de su hipoacusia, que sin embargo registran pérdidas moderadas o severas para frecuencias de 4.000 u 8.000 Hz.
- c) Individuos con conocimiento subjetivo de su hipoacusia, con pérdidas auditivas leves o moderadas en frecuencias conversacionales (500-2.000 Hz), y mayor afectación en las frecuencias más agudas (4.000 y 8.000 Hz).
- d) Individuos con sorderas severas o profundas, con todas las frecuencias afectadas, aunque habitualmente con mayor pérdida para frecuencias agudas. En este grupo se encuentran la casi totalidad de los portadores de la mutación tratados con antibióticos aminoglicósidos, incluyendo pacientes sordomudos en los que un tratamiento precoz desencadenó una sordera severa en periodo prelocutivo.

En la mayoría de los casos, la mutación se presenta en homoplasma. Sin embargo, en 5 familias la mutación aparece en heteroplasma, con un porcentaje de copias mutantes, diferente para cada paciente, que va del 5% al 98%. En estos casos se observa una cierta correlación entre el número de copias mutantes y su expresión fenotípica, tanto en lo que se refiere a edad de comienzo como a grado de afectación.

Tomados en conjunto, nuestros resultados sugieren que los portadores de la mutación A1555G desarrollan una hipoacusia lentamente progresiva, cuya edad de comienzo y severidad dependen de varios factores. El primero es la proporción de genomas mutantes, como ya se ha comentado. El segundo, y quizás más importante por sus radicales efectos sobre la audición, es la ototoxicidad de los antibióticos aminoglicósidos. Sin embargo, la variabilidad fenotípica observada en ausencia de tratamiento con estos fármacos indica que deben existir otros factores moduladores de la penetrancia y expresividad de la mutación. Estos factores pudieran ser ambientales o genéticos. De hecho, se ha hipotetizado que uno o más genes nucleares podrían estar implicados, siendo los candidatos más plausibles los que codifican componentes de la maquinaria de biosíntesis de proteínas de la mitocondria, y muy especialmente los que interaccionen con el rRNA 12S mitocondrial.

Dada la alta frecuencia de portadores de la mutación en la población española, nos planteamos investigar si dicha alta frecuencia podía ser debida a un único hecho mutacional (efecto fundador) o a múltiples hechos mutacionales (aparición recurrente de la mutación). El estudio fue realizado en colaboración con los equipos del Dr. Antonio Torroni, de la Universidad de Roma, y del Dr. Xavier Estivill, del Centro de Genética Médica y Molecular - IRO, de Barcelona. El genoma mitocondrial de 50 familias españolas fue investigado mediante análisis de RFLP (polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción) de alta resolución, y mediante secuenciación de la región de control. El resultado del análisis filogenético de haplotipos mitocondriales reveló que la mutación A1555G en las 50 familias estudiadas surgió como consecuencia de más de 30 hechos mutacionales independientes. Además, está asociada a haplogrupos mitocondriales comunes en la población europea (15). Estos resultados sugerían que la alta frecuencia observada en la población española podría ser extrapolable al resto de la población europea. Esta cuestión es todavía objeto de debate.

La relevancia sanitaria del trabajo realizado se pone de manifiesto si se considera que la detección precoz de portadores de la mutación A1555G es esencial para la prevención de hipoacusias severas o profundas originadas por el tratamiento con antibióticos aminoglicósidos de individuos genéticamente susceptibles (normoyentes o con hipoacusias leves antes del tratamiento).

#### *2.5.2. Mutación T7510C en el gen del tRNA-Ser(UCN).*

La mutación T7510C en el gen del tRNA-Ser(UCN) mitocondrial fue descubierta por el equipo del Dr. Robert F. Mueller (Leeds, Reino Unido) al estudiar una familia con 9 afectados en tres generaciones y un inequívoco patrón de herencia materna, con penetrancia casi completa. La hipoacusia era neurosensorial, no sindrómica y asimétrica, es decir, con distinto grado de afectación en los dos oídos. Además se observó variabilidad en el grado de afectación entre los diversos pacientes de la familia. El examen de la secuencia del mtDNA reveló la presencia de otra mutación, A4336G en el tRNA-Gln. Esta mutación se halla en el 1% de la población caucásica y se ha encontrado en pacientes con enfermedad de Parkinson o enfermedad de Alzheimer, pero queda por elucidar si desempeña algún papel causal en estas patologías. Los descubridores de la mutación T7510C postulan que la mutación A4336G podría ser responsable de la alta penetrancia de T7510C en la familia estudiada.

En nuestro laboratorio hemos encontrado otra familia con la mutación T7510C que, por lo que sabemos, sería la segunda familia en todo el mundo con esta mutación. La fami-

lia contiene 22 afectados vivos, repartidos en tres generaciones. El patrón de herencia es materno, con penetrancia casi completa. Hemos comprobado la presencia de la mutación en 21 individuos afectados. Ninguno de ellos portaba la mutación A4336G, lo que pone en duda que desempeñe algún papel en la alta penetrancia de la mutación T7510C. Al igual que en la familia previamente descrita, la hipoacusia era neurosensorial, no sindrómica y asimétrica, con diversos grados de afectación en los pacientes (manuscrito en preparación).

### **3. PUBLICACIONES DE NUESTRO LABORATORIO RELACIONADAS CON LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN SOBRE HIPOACUSIAS HEREDITARIAS**

- 1.- del Castillo I, Villamar M, y Moreno F. 1999. Hipoacusias genéticas. En *Tratado de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*, Gil-Carcedo LM, Marco J, Medina J, Ortega P, Suárez C, y Trinidad J (eds.), Proyectos Médicos, Madrid, pp. 1461-1495.
- 2.- Moreno F, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, y del Castillo I. Genética de la hipoacusia neurosensorial. Masson, en prensa.
- 3.- Menéndez I, del Castillo I, Carrillo B, Villamar M, Ponce de León M, Uriarte A, y Moreno F. 2001. Mutaciones del gen de la conexina 26 (GJB2) en familias cubanas con sorderas no sindrómicas autosómicas recesivas. *Rev Cubana Pediatr* 20:167-172.
- 4.- del Castillo I, Villamar V, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Álvarez A, Tellería D, Menéndez I, and Moreno F. 2002. A deletion involving the connexin 30 gene in non-syndromic hearing impairment. *N Engl J Med* 346:243-249.
- 5.- Álvarez A, del Castillo I, Pera A, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, Moreno R, Tapia MC, and Moreno F. A *de novo* mutation in the gene encoding connexin-26 (GJB2) in a sporadic case of keratitis-ichthyosis-deafness (KID) syndrome. Submitted to *Am J Med Genet*.
- 6.- Migliosi V, Modamio-Høybjør S, Moreno-Pelayo MA, Rodríguez-Ballesteros M, Villamar M, Tellería D, Menéndez I, Moreno F, and del Castillo I. Q829X, a novel mutation in the gene encoding otoferlin (OTOF), is frequently found in Spanish patients with prelingual non-syndromic hearing loss. *J Med Genet*, en prensa.
- 7.- Villamar M, del Castillo I, Valle N, Romero L, and Moreno F. 1999. Deafness locus DFNB16 is located on chromosome 15q13-q21 within a 5-cM interval flanked by markers D15S994 and D15S132. *Am J Hum Genet* 64:1238-1241.
- 8.- Verpy E, Masmoudi S, Zwaenepoel I, Leibovici M, Hutchin TP, del Castillo I, Nouaille S, Blanchard S, Lainé S, Popot JL, Moreno F, Mueller RF, and Petit C. 2001. Mutations in a new gene encoding a protein of the hair bundle cause non-syndromic deafness at the DFNB16 locus. *Nat Genet* 29:345-349.

- 9.- Moreno-Pelayo MA, del Castillo I, Villamar M, Romero L, Hernández-Calvín FJ, Herraiz C, Barberá R, Navas C, and Moreno F. 2001. A cysteine substitution in the zona pellucida domain of  $\alpha$ -tectorin results in autosomal dominant, postlingual, progressive, mid frequency hearing loss in a Spanish family. *J Med Genet* 38:e13.
- 10.- del Castillo I, Villamar M, Sarduy M, Romero L, Herraiz C, Hernández-Calvín FJ, Rodríguez M, Borrás I, Montero A, Bellón J, Tapia MC, and Moreno F. 1996. A novel locus for non-syndromic sensorineural deafness (DFN6) maps to chromosome Xp22. *Hum Mol Genet* 5:1383-1387.
- 11.- Arellano B, Ramírez-Camacho R, García Berrocal JR, Villamar V, del Castillo I, and Moreno F. 2000. Sensorineural hearing loss and Mondini dysplasia caused by a deletion at locus DFN3. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 126:1065-1069.
- 12.- Menéndez I, Villamar M, Carrillo B, del Castillo I, Romero L, Ponce de León M, y Moreno F. 1999. Expresión fenotípica de una sordera familiar con deleción del gen POU3F4. *Rev Cubana Pediatr* 71:205-210.
- 13.- Sarduy M, del Castillo I, Villamar M, Romero L, Herraiz C, Hernández-Calvín FJ, Tapia MC, Magariño C, Méndez del Castillo D, Menéndez-Alejo I, Ramírez R, Arellano B, Morales C, Bellón J, and Moreno F. 1998. Genetic study of mitochondrially-inherited sensorineural deafness in eight large families from Spain and Cuba. In *Developments in Genetic Hearing Impairment*, Read A, and Martini A (eds.), Whurr Publishers, Londres, pp. 121-125.
- 14.- Morales C, Sarduy M, Villamar M, del Castillo I, Mazón A, y Moreno F. 1999. Hipoacusia familiar no sindrómica transmitida por herencia mitocondrial. *Acta Otorrinolaringol Esp* 50:93-99.
- 15.- Torroni A, Cruziani F, Rengo C, Sellito D, López-Bigas N, Rabionet R, Govea N, López de Muniain A, Sarduy M, Romero L, Villamar M, del Castillo I, Moreno F, Estivill X, and Scozzari R. 1999. The A1555G mutation in the 12S rRNA gene of human mtDNA: Recurrent origins and founder events in families affected by sensorineural deafness. *Am J Hum Genet* 65:1349-1358.

## CAPITULO V

### DIAGNÓSTICO DE OTRAS ENFERMEDADES SÍNDROME DE X-FRÁGIL Y FIBROSIS QUÍSTICA (MUCOVISCIDOSIS)

#### **1. SÍNDROME DEL CROMOSOMA X-FRÁGIL**

##### **1.1. Introducción.**

El síndrome deL cromosoma X frágil (SXF) es la causa más común de retraso mental hereditario, con una prevalencia de 1/4000 en varones y 1/8000 en mujeres.

Los pacientes con SXF presentan un retraso mental de moderado a intenso en varones (IQ < 70), asociado a otras alteraciones cognitivas y de conducta (hiperactividad, trastorno de atención, lenguaje repetitivo, y otros). A este fenotipo se asocian ciertos rasgos físicos que resultan más evidentes en los individuos adultos: orejas y frente grandes, laxitud en las articulaciones y, en varones, macroorquidismo.

El SFX es una enfermedad ligada al cromosoma X, dominante, con penetrancia incompleta, siendo la penetrancia dependiente de la posición del individuo en el árbol familiar (Paradoja de Sherman). Esto significa que la enfermedad es más frecuente y más grave en los varones que en las mujeres, y que los individuos de las generaciones posteriores tienen mayor riesgo de afectación.

En 1991 se identificó el gen responsable de la enfermedad, FMR-1 (Fragile mental retardation), en la región cromosómica Xq27.3, y la alteración molecular que causa la enfermedad. Dicha alteración es una mutación dinámica que consiste en la expansión anómala de un trinucleótido repetitivo (CGG) situado en el primer exón del gen, no codificante. Dependiendo del grado de expansión del trinucleótido se diferencian tres tipos de alelos: normales (con menos de 50 repeticiones), premutados (con 50-200 repeticiones) y mutados (con más de 200 repeticiones). Los estudios genéticos han permitido comprender el complejo patrón de herencia de la enfermedad y han explicado los efectos de la mutación sobre la funcionalidad del gen.

Los conocimientos genéticos han posibilitado el diagnóstico molecular de la enfermedad que permite, en primer lugar, un diagnóstico certero del retraso mental, en varones y mujeres, y en segundo lugar, la detección de los individuos portadores asintomáticos que pueden transmitir la enfermedad y la estimación del riesgo que tiene cada portador de tener hijos afectados, que es función del tamaño de la amplificación del trinucleótido. El



test genético aunque no es simple, es totalmente fiable y, también, se puede realizar durante el periodo prenatal, después de la 13-14 semana de gestación. Algunos colectivos solicitan y aconsejan el desarrollo de programas de detección molecular de la enfermedad.

## **1.2. Aportaciones.**

Hasta el momento, en el laboratorio, hemos realizado más de novecientos estudios moleculares de X-Frágil en pacientes con retraso mental y/o con trastornos cognitivos y cerca del 9% de los casos han sido positivos. En las familias afectadas se han identificado más de 150 portadores, la mayoría mujeres. La demanda de diagnóstico prenatal no es frecuente, hasta el momento solo hemos realizado una decena de diagnósticos prenatales.

## **2. FIBROSIS QUÍSTICA (MUCOVISCIDOSIS)**

### **2.1. Introducción.**

La mucoviscidosis o fibrosis quística (FQ) es una enfermedad hereditaria multisistémica que afecta a niños y adultos. Constituye el rasgo recesivo con peligro para la vida más frecuente en la población de ascendencia europea, y su incidencia en nuestra población es de 1/2500 nacimientos. Esto, y debido a su patrón de herencia, autosómico recesivo, implica que uno de cada 20-25 individuos es portador asintomático de dicha patología. El mecanismo patogénico predominante de la FQ es la disfunción de las glándulas de secreción exocrinas de todo el organismo, existiendo un transporte iónico anómalo entre las superficies epiteliales, lo que provoca una deshidratación de las secreciones, principalmente en pulmón, páncreas e hígado, y estas secreciones anormalmente viscosas dan lugar a una amplia variedad de manifestaciones y complicaciones. Así, el fenotipo FQ es muy variable y complejo, y se caracteriza principalmente por:

- Obstrucción e infección crónica del tracto respiratorio.
- Insuficiencia pancreática exocrina y sus consecuencias nutricionales (malabsorción, malnutrición).
- Elevada concentración de electrolitos en sudor.

Otros trastornos asociados a esta patología son: íleo meconial, poliposis nasal, pansinusitis, prolapso rectal, hiperglucemia insulino dependiente no cetósica y cirrosis biliar. Es importante también la relación de la FQ con determinados tipos de esterilidad en varones, y en concreto con la causada por agenesia congénita uni- o bilateral de vasos deferentes. Por tanto, la FQ participa en el diagnóstico diferencial de numerosos trastornos tanto pediátricos como de jóvenes y adultos.

La FQ es una enfermedad monogénica que se hereda de forma autosómica recesiva, es decir, está producida por alteraciones en un único gen, situado en el brazo largo del cromosoma 7, pero los dos alelos de éste deben ser anómalos para que el individuo sea afecto. Los portadores son asintomáticos y tienen un alelo normal y uno mutante para este gen. La probabilidad de una pareja de portadores de tener un hijo afecto es del 25% en cada embarazo.

Durante la década de los 80, diferentes estudios genéticos realizados en familias afectas de FQ demostraron asociación (una segregación común) entre la enfermedad y marcadores genéticos polimórficos del brazo largo del cromosoma 7, y en 1989 se identificó el gen responsable de la FQ. Dicho gen codifica una proteína denominada CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) que constituye un canal de cloro activado por AMP cíclico. Desde entonces se han descrito más de 800 mutaciones en este gen capaces de producir la enfermedad. La más frecuente es la denominada  $\Delta$ F508, que consiste en la delección de un codón en el exón 10 del gen CFTR que codifica una fenilalanina en posición 508 de la proteína.

Diversos estudios realizados en la población española muestran una cantidad amplia de mutaciones pero algunas de ellas presentan una apreciable frecuencia. Así, por ejemplo, la mutación  $\Delta$ F508 es la más frecuente (53%), seguida por la mutación G542X (8.5%), y otras 8 ó 9 con frecuencias superiores al 1%. Para algunas de estas mutaciones ha sido posible establecer una razonable correlación genotipo-fenotipo, considerándose, por ejemplo, que la mutación  $\Delta$ F508 provoca un fenotipo más agresivo que otras.

## **2.2. Aportaciones.**

El diagnóstico molecular directo se basa en el despistaje de las mutaciones más frecuentes en nuestra población en individuos afectados de FQ. Considerando su frecuencia, el estudio de 12 mutaciones en el gen CFTR permite detectar aproximadamente el 70% de genes anómalos y, en consecuencia, se podría caracterizar casi el 50% de los individuos (identificar las dos mutaciones).

En cambio, el diagnóstico familiar se puede realizar por ligamiento genético: la existencia de marcadores polimórficos en el gen CFTR permite el diagnóstico genético indirecto mediante la identificación de los haplotipos parentales que aparecen en el individuo afecto. Así, aunque no se identifique la mutación, sí se demuestra cuál es el haplotipo que la porta. Este tipo de análisis requiere el estudio al menos del núcleo familiar (afecto y padres).

Por último, el consejo genético: una vez identificadas las mutaciones, o los haplotipos portadores, en un individuo afecto, es posible extender el estudio a otros familiares directos con el fin de establecer su riesgo real de ser portadores de la enfermedad. Asimismo, en el caso de nuevos embarazos, es posible el diagnóstico prenatal del feto.

Dada la frecuencia de la mutación  $\Delta F508$ , un estudio familiar típico se inicia con el análisis de esta mutación y el establecimiento de los haplotipos para 3 marcadores polimórficos intragénicos del gen CFTR.

En total han sido estudiados en nuestra Unidad 981 individuos, de los que 257 eran afectados, repartidos en 294 familias.

## APÉNDICE I : RESUMEN DE PACIENTES ESTUDIADOS

PATOLOGÍAS	FAMILIAS ESTUDIADAS	INDIVIDUOS ESTUDIADOS	PACIENTES CON DIAGNÓSTICO MOLECULAR CONFIRMADO
Poliquistosis renal	168	1390	633
Atrofia muscular espinal	276	1091	215
Neurofibromatosis tipo I	205	858	308
Hipoacusias neurosensoriales	472	2752	503
Síndrome X frágil	972	1620	102 varones afectados 150 hembras portadoras
Fibrosis quística	294	981	257

## **PUBLICACIONES DE LA UNIDAD RELACIONADAS CON EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR:**

1. B. Peral, C. Hernández-Chico, J.L. San Millán, R. Granell, J. Molano, S. Carrasco, J.J. Tellería, M. Devoto, F. Moreno (1991).  $\Delta$ F508 mutation and RFLP-linked loci in Spanish cystic fibrosis families. *Hum. Genet.* 87: 516-517.
2. J.A. García-Marcos, F. Moreno, I. Pascual-Castroviejo, I. López-Pajares, A. Delicado, G. Lorenzo (1992). Diagnóstico molecular en familias afectadas del síndrome X frágil. *Rev. Esp. Pediatr.* 48: 183-188.
3. E. Velasco, P. Sánchez-Corral, F. Moreno, S. Rodríguez de Córdoba (1992). Dinucleotide repeat polymorphism between the human C4BPA and C4BPB gene loci (1q32). *Hum. Mol. Genet.* 1: 552.
4. I. López-Pajares, A. Delicado, I. Pascual-Castroviejo, V. López-Martín, F. Moreno, J.A. García-Marcos (1994). Fragile-X syndrome with extra microchromosome. *Clin. Genet.* 45: 186-189.
5. F. Rousseau, D. Heitz, J. Tarleton, J. McPherson, H. Malmgren, N. Dahl, C. Barnicot, C. Mathew, E. Mornet, I. Tejada, A. Maddalena, R. Spiegel, A. Schinzel, J.A. García-Marcos, D.F. Shorderet, T. Schaap, L. Maccioni, S. Russo, P.A. Jacobs, C. Schwartz, J.L. Mandel (1994). A multicenter study on genotype-phenotype correlations in the fragile-X syndrome, using direct diagnosis with probe StB12: the first 2,253 cases. *Am.J.Hum.Genet.* 55: 225-237.
6. S.I. Pascual-Pascual, J.A. García-Marcos, M.A. Martín-Lucas (1995). Efecto del síndrome X frágil en la población de la Compañía Telefónica de España. *Rev. Neurol. (Barc.)* 23: 644-647.

## **Otras publicaciones de la Unidad en genética humana:**

1. M. Villamar, B. Gomendio, E. Perera, D. Tellería, C. Fizames, J.L. San Millán, J. Weissenbach, J.J. Schott, M. Dixon, M. Hollyoake, and F. Moreno (1994). The EURO-GEM Map of Human Chromosome 5. *Eur. J. Hum. Genet.* 2:212-213.
2. S.A. Cox, G. Vergnaud, J.L. San Millán, F. Moreno, J. Beckmann, T. Kruse, L. Contu (1994). The EUROGEM Map of Human Chromosome 17. *Eur. J. Hum. Genet.* 2:236-237.
3. A. de la Puente, E. Velasco, L.A. Pérez-Jurado, C. Hernández-Chico, F.M. van de Rijke, S.W. Scherer, A.K. Raap, J. Cruces (1998). Analysis of the monomeric alphoid sequences in the pericentromeric region of human chromosome 7. *Cytogenet. Cell Genet.* 83: 176-181.

**APÉNDICE II: TESIS DOCTORALES PRESENTADAS EN RELACIÓN  
CON LAS INVESTIGACIONES DE LA UNIDAD SOBRE ENFERMEDADES  
HEREDITARIAS**

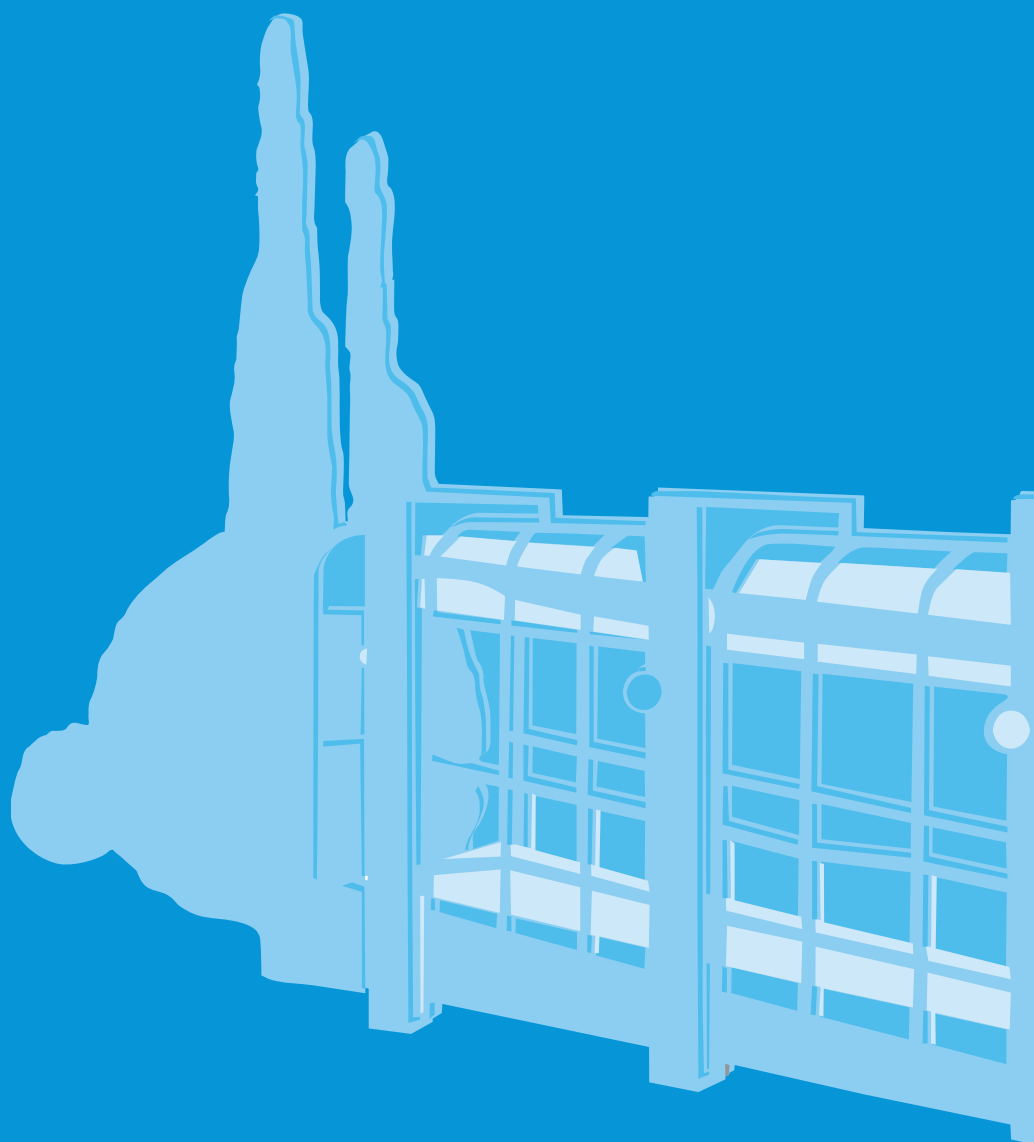
1. Estudio genético de poliquistosis renal del adulto en la población española. María Belén Peral Fuentes. 1993. Universidad Autónoma de Madrid. Calificación: Apto cum laude. Premio Extraordinario.
2. Estudio genético de familias españolas afectadas de fibrosis quística. Susana Gómez Barrero. 1996. Universidad Autónoma de Madrid. Calificación: Apto cum laude.
3. Genética molecular de las atrofas musculares espinales. Eladio Velasco Sampedro. 1996. Universidad Autónoma de Madrid. Calificación: Apto cum laude.
4. Mutaciones del gen NF1 en familias afectadas de neurofibromatosis tipo 1. Carmen Valero Quirós. 1997. Universidad Autónoma de Madrid. Calificación: Apto cum laude.
5. Estudio genético de la enfermedad poliquistosis renal autosómica dominante tipo 2. Miguel Viribay Lorite. 1997. Universidad Autónoma de Madrid. Calificación: Apto cum laude.
6. Estudios genéticos de la atrofia muscular espinal: análisis mutacional y búsqueda de factores moduladores del fenotipo. Yolanda Martín Santodomingo. En curso de redacción.











MINISTERIO  
DE TRABAJO  
Y ASUNTOS SOCIALES

REAL PATRONATO  
SOBRE DISCAPACIDAD

