

# ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS HEREDITARIAS: GENES, MUTACIONES, CLÍNICA Y EPIDEMIOLOGÍA GENÉTICA

PREMIO REINA SOFÍA 2004,  
DE PREVENCIÓN DE DEFICIENCIAS

D O C U M E N T O S • 67/2005



MINISTERIO  
DE TRABAJO  
Y ASUNTOS SOCIALES

REAL PATRONATO  
SOBRE DISCAPACIDAD

**PREMIO REINA SOFÍA 2004,  
DE PREVENCIÓN DE DEFICIENCIAS**

**ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS HEREDITARIAS:**

**Genes, mutaciones, clínica y epidemiología genética**

**Autores:**

**Francesc Palau Martínez**

**Ana Cuesta Peredo**

**Javier García Planells**

**Pilar González Cabo**

**Laia Pedrola Vidal**

**Reyes Claramunt Alonso**

**Carmen Espinós Armero**

Unidad de Genética Molecular

Instituto de Biomedicina de Valencia

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

**ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS HEREDITARIAS: Genes, mutaciones, clínica y epidemiología genética**

**AUTORES:** Francesc Palau Martínez, Ana Cuesta Peredo, Javier García Planells, Pilar González Cabo, Laia Pedrola Vidal, Reyes Calaramunt Alonso y Carmen Espinós Armero.  
Unidad de Genética y Medicina Molecular, Instituto de Biomedicina de Valencia. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

**DOCUMENTOS: 67/2005**

**Memoria de la labor de investigación galardonada con la dotación para España de los Premios Reina Sofía 2004, 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. – [cedd@furnet.es](mailto:cedd@furnet.es) – [www.cedd.net](http://www.cedd.net)

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

Primera edición: Marzo de 2005, 1.000 ejemplares

NIPO: 214-05-001-1

Depósito legal: M-9543-2005

## ÍNDICE

GLOSARIO .....	7
PREÁMBULO .....	9
AGRADECIMIENTOS .....	13
<b><u>CAPÍTULO I: ATAXIAS HEREDITARIAS</u></b> .....	15
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	15
<b>2. HALLAZGOS MÁS RELEVANTES Y CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS</b> .....	16
<b>2.1. Ataxia de Friedreich</b> .....	16
2.1.1. <i>Clonación posicional y caracterización del gen FRDA</i> .....	16
2.1.2. <i>Genética poblacional de la ataxia de Friedreich en España</i> . . .	22
2.1.3. <i>Expansión GAA y patología molecular de la ataxia de Friedreich</i> .....	24
2.1.4. <i>Fenotipos clínicos y homogeneidad genética</i> .....	26
<b>2.2. Ataxias cerebelosas autosómicas dominantes</b> .....	28
2.2.1. <i>Ataxias espinocerebelosas del adulto</i> .....	28
2.2.1.1. <i>Genética de la ataxia espinocerebelosa SCA6</i> .....	30
2.2.2. <i>Ataxias episódicas</i> .....	32
<b>3. APLICACIONES EN GENÉTICA CLÍNICA</b> .....	32
<b>3.1. Diagnóstico molecular y consejo genético de la ataxia de Friedreich</b> .....	32
<b>3.2. Diagnóstico molecular y consejo genético de las ataxias espinocerebelosas</b> .....	34
<b>4. PERSPECTIVAS TERAPÉUTICAS</b> .....	35
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	36
<b>6. PUBLICACIONES*</b> .....	37
<b><u>CAPÍTULO II: NEUROPATÍAS PERIFÉRICAS HEREDITARIAS</u></b> .....	43
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	43
<b>2. HALLAZGOS MÁS RELEVANTES Y CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS</b> .....	44

<b>2.1. Mecanismos genéticos de los reordenamientos genómicos en el cromosoma 17p11.2: duplicación CMT1A y delección HNPP</b> . . . . .	44
<b>2.2. Genes y patología molecular de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth y otras neuropatías relacionadas</b> . . . . .	48
<b>2.3. Clonación posicional de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 4A y caracterización del gen GDAP1</b> . . . . .	50
2.3.1. <i>Análisis de ligamiento y cartografiado del gen</i> . . . . .	50
2.3.2. <i>Cartografiado por homocigosidad</i> . . . . .	52
2.3.3. <i>Mapa del genoma humano: mapa físico de marcadores y genes candidatos</i> . . . . .	53
2.3.4. <i>Identificación y caracterización del gen GDAP1</i> . . . . .	55
2.3.4.1. <i>Obtención del cDNA de GDAP1</i> . . . . .	55
2.3.4.2. <i>Organización genómica del gen GDAP1</i> . . . . .	56
2.3.4.3. <i>Secuencia del gen candidato posicional GDAP1</i> . . . . .	57
2.3.4.4. <i>Expresión tisular del gen GDAP1</i> . . . . .	59
2.3.4.5. <i>Mutaciones en el gen GDAP1</i> . . . . .	60
2.3.4.6. <i>Análisis de la secuencia de aminoácidos deducida para GDAP1</i> . . . . .	62
2.3.4.7. <i>Genética de la neuropatía CMT4A: mutaciones, herencia y efectos fundadores</i> . . . . .	63
<b>3. ASPECTOS CLÍNICOS DE LAS NEUROPATÍAS PERIFÉRICAS HEREDITARIAS: CORRELACIONES GENOTIPO-FENOTIPO Y DIAGNÓSTICO MOLECULAR</b> . . . . .	71
<b>4. CONCLUSIONES</b> . . . . .	73
<b>5. PUBLICACIONES*</b> . . . . .	74
<b><u>CAPÍTULO III: TRASTORNOS DEL MOVIMIENTO</u></b> . . . . .	79
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> . . . . .	79
<b>2. HALLAZGOS MÁS RELEVANTES Y CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS</b> . . . . .	79
<b>2.1. Enfermedad de Huntington</b> . . . . .	79
2.1.1. <i>Genética clínica</i> . . . . .	79
2.1.2. <i>Diagnóstico presintomático</i> . . . . .	81
2.1.3. <i>Epidemiología genética y origen de la expansión CAG en la población valenciana</i> . . . . .	81
<b>2.2. Distrofia de torsión DYT1</b> . . . . .	85

<b>3. CONCLUSIONES</b> .....	88
<b>4. PUBLICACIONES*</b> .....	90
<b><u>CAPÍTULO IV: DISTROFIAS MUSCULARES</u></b> .....	91
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	91
<b>2. HALLAZGOS MÁS RELEVANTES Y CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS.</b> .....	91
<b>2.1. Distrofinopatías</b> .....	91
<b>2.2. Distrofia miotónica</b> .....	94
<b>2.3. Distrofia facioescapulohumeral</b> .....	96
<b>3. CONCLUSIONES</b> .....	98
<b>4. PUBLICACIONES*</b> .....	99

---

\* En cada uno de los artículos se indican en negrita los autores que en el momento de la publicación formaban parte del Grupo de Investigación.



## GLOSARIO

<b>ADCA</b>	Ataxias cerebelosas autonómicas dominantes
<b>ARCA</b>	Ataxias cerebelosas autonómicas recesivas
<b>ASO</b>	Oligonucleótido específico de alelo
<b>BAC</b>	Cromosomas artificiales de bacterias
<b>BMD</b>	Distrofia muscular de Becker
<b>bp</b>	Pares de bases
<b>cDNA</b>	DNA complementario
<b>cM</b>	centiMorgan
<b>CMT</b>	Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth
<b>CMT1A</b>	Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 1A; locus CMT1A
<b>CMT4A</b>	Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 4A; locus CMT4A
<b>DM</b>	Distrofia miotónica
<b>DM1</b>	Locus mayor de DM en el cromosoma 19q13
<b>DM2</b>	Locus de DM en el cromosoma 3q
<b>DMD</b>	Distrofia muscular de Duchenne
<b>DYT1</b>	Distonía de torsión tipo DYT1; locus DYT1
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EA</b>	Ataxia episódica
<b>EOCARR</b>	Ataxia cerebelosa de inicio precoz con reflejos conservados
<b>EST</b>	Secuencias expresadas etiquetadas
<b>FARR</b>	Ataxia de Friedreich con reflejos conservados
<b>FRDA</b>	Ataxia de Friedreich
<b>FRDA</b>	Gen de la ataxia de Friedreich
<b>FSH</b>	Distrofia muscular facioescapulohumeral
<b>GDAP1</b>	Gen de la proteína 1 asociada a la diferenciación inducida por gangliósidos
<b>GBJ1</b>	Gen de la proteína conexina 32 (Cx32)
<b>GST</b>	Glutation S- transferasa
<b>HD</b>	Enfermedad de Huntington
<b>HD-IT15</b>	Gen de la enfermedad de Huntington
<b>HNPP</b>	Neuropatía hereditaria con susceptibilidad a la parálisis por presión



<b>HSMN</b>	Neuropatía sensitivo-motora hereditaria
<b>HSN</b>	Neuropatía sensitiva hereditaria
<b>HSAN</b>	Neuropatía sensitiva y autonómica hereditaria
<b>kb</b>	kilobase
<b>Lod Score</b>	Puntuación del logaritmo de la verosimilitud
<b>LOFA</b>	Ataxia de Friedreich de inicio tardío
<b>Mb</b>	Megabase
<b>MIM</b>	Mendelian Inheritance in Man (OMIM: versión Online)
<b>MPZ</b>	Gen de la proteína P0
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>nt</b>	Nucleótido
<b>ORF</b>	Pauta abierta de lectura de un gen
<b>PAC</b>	Cromosomas artificiales de fagos P1
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PMP22</b>	Gen de la proteína de mielina periférica de 22 kDa
<b>RFLP</b>	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNAi</b>	Interferencia de RNA
<b>RT-PCR</b>	PCR retrotranscrita
<b>SCA</b>	Ataxia espinocerebelosa
<b>SCA</b>	Genes de las ataxias espinocerebelosas
<b>SNP</b>	Polimorfismo nucleotídico simple
<b>SSCP</b>	Polimorfismos conformacionales de cadena simple
<b>YAC</b>	Cromosomas artificiales de levadura
<b>UTR</b>	Región génica no traducida

En la mayoría de los casos se ha preferido mantener las siglas inglesas por ser las utilizadas en la literatura clínica y científica internacional.

## PREÁMBULO

Durante los últimos 50 años, especialmente desde el establecimiento del número correcto de cromosomas del cariotipo humano en 46 para las células somáticas, la genética ha ido introduciéndose en el campo de la medicina, en un principio tímidamente, más recientemente de un modo intenso e imparable. Hasta los años 50 del pasado siglo la genética humana se basó en el análisis genealógico de las familias. La descripción funcional del concepto de gen que hicieron Beadle y Tatum, "un gen, una enzima", cambió la importancia de la genética para la medicina. El viejo concepto de Garrod acerca de la individualidad química de los seres vivos, y especialmente del ser humano, cuya vertiente patológica eran los "errores congénitos del metabolismo", tomó cuerpo en la idea de que el defecto enzimático se debía a un gen defectuoso, es decir, mutante. Esta genética bioquímica, junto con el estudio de las anomalías cromosómicas, dio lugar a una incipiente genética médica. Sin embargo, la genética no penetró como tal en el pensamiento médico; en los años sesenta y setenta del siglo XX, los genes mutantes y las alteraciones de los cromosomas en síndromes malformativos eran sólo una parte, y no de las más relevantes, de las causas primarias de la enfermedad, junto con los microbios y los tóxicos.

En 1953 Watson y Crick describieron la estructura replicativa de la doble hélice del ácido deoxirribonucleico (DNA), la molécula portadora de la información genética y de la herencia. El posterior desarrollo de la biología molecular y de la ingeniería genética nos ha ofrecido una nueva comprensión de qué es un gen. Desde una perspectiva molecular el gen es la unidad de DNA transcribible flanqueada por elementos controladores y reguladores que no se transcriben. El conocimiento de la estructura de los genes, cómo se regulan, se transcriben y se traducen en las unidades funcionales de la célula, las proteínas, ha sido fundamental para empezar a comprender las causas y los mecanismos de producción de las enfermedades genéticas, tanto monogénicas con herencia mendeliana, como las enfermedades comunes con herencia multifactorial o compleja.

El número de enfermedades monogénicas es mayor de seis mil. Aunque cada una de ellas suele ser poco frecuente pero, en su conjunto, constituyen un problema médico de primera magnitud debido a que muchas de ellas causan graves trastornos a los pacientes y representan una gran carga física y emocional, cuando no socioeconómica, para las familias. Un grupo importante de estos trastornos monogénicos afecta al sistema nervioso. Las enfermedades neurológicas hereditarias, bien neurodegenerativas, bien neuromus-

culares, son trastornos invalidantes y crónicos para los que hace unos años no se conocía casi nada acerca de su patogenia. Cualquier aproximación racional a su tratamiento estaba fuera de lugar. Sin embargo, la situación ha cambiado drásticamente en los últimos quince años. Muchos de los genes mutantes responsables de las enfermedades neurológicas se han localizado en el genoma humano y se han caracterizado e identificado los productos génicos. Hoy en día es posible determinar la enfermedad preclínica, realizar la identificación de individuos portadores y ofrecer un diagnóstico prenatal y, esperanzadamente, conseguir tratamientos eficaces en un plazo de tiempo relativamente corto.

Esta memoria quiere ser un resumen de los estudios y hallazgos de laboratorio y de las contribuciones científicas de mi grupo de investigación en el campo de la genética molecular de las enfermedades neurológicas, trastornos que se encuadran en el término de enfermedades raras, así como las aplicaciones en medicina clínica a las que han dado lugar, concretamente por lo que respecta al diagnóstico molecular y al consejo genético. El grupo de investigación inició su andadura en diciembre de 1990 cuando me incorporé como facultativo especialista a la Unidad de Genética del Hospital Universitario La Fe de Valencia, a la sazón dirigida por el Dr. Félix Prieto, como responsable del programa de Neurogenética. Este programa se desarrolló a lo largo de diez años, entre los años 1990 y 2000, combinando la investigación genética con el diagnóstico molecular y la consulta de consejo genético. En septiembre de 2000 el grupo se trasladó al Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV), un centro del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), donde se constituyó en la Unidad de Genética y Medicina Molecular. Desde entonces los trabajos se han orientado hacia el estudio de la genética y la fisiopatología molecular y celular de las enfermedades neurológicas, empleando nuevas aproximaciones metodológicas como son los modelos animales y celulares y las modernas técnicas bioquímicas.

En la memoria que se presenta se refleja el trabajo científico y clínico de los 15 años de trayectoria del grupo en relación con tres grandes áreas de investigación de las enfermedades neurológicas; éstas son: 1) el aislamiento y la caracterización de genes mediante la estrategia de la clonación posicional, destacando la participación directa en el grupo colaborativo internacional que aisló el gen FRDA de la ataxia de Friedreich en 1996 y el descubrimiento del gen GDAP1 como responsable de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 4A; 2) análisis de mutaciones con especial mención a las mutaciones genómicas y las mutaciones dinámicas; y 3) la genética poblacional y la epidemiología genética de las enfermedades neurológicas en España y, especialmente, en la población

valenciana. La memoria está dividida en cuatro capítulos que hacen referencia a las ataxias hereditarias, las neuropatías periféricas hereditarias, los trastornos del movimiento y las distrofias musculares. En todos ellos se mencionan explícitamente los aspectos clínicos del diagnóstico molecular, incluidos los diagnósticos prenatal y presintomático, así como el consejo genético. En un afán de dejar claro que aquello que se dice y se expone en la memoria es el resultado del trabajo del grupo, las citas hacen siempre referencia a nuestros propios trabajos; para más información se puede consultar la bibliografía citada en las revisiones realizadas por miembros del grupo. La memoria se ha elaborado en función de los artículos científicos publicados por el grupo. Los trabajos científicos se indican al final de cada capítulo agrupados según los apartados en los que se divide cada uno y siguiendo un orden alfabético por el apellido del primer autor. La memoria se ha editado con un número importante de figuras y tablas, la mayoría de ellas tomadas de los trabajos originales de modo que, en ocasiones, ha sido inevitable mantener algunos epígrafes en inglés. Pido disculpas por ello.

La memoria ha sido elaborada por los miembros actuales del grupo. A manera de una presentación sucinta éstos son:

- Francesc Palau Martínez, doctor en Medicina, especialista en Pediatría y Genética Clínica. Investigador Científico del CSIC y director del grupo de investigación y de la Unidad de Genética y Medicina Molecular del IBV.
- Ana Cuesta Peredo, doctora en Farmacia, especialista en Bioquímica Clínica y, actualmente, responsable del Laboratorio de Citogenética de Sistemas Genómicos, S.L., Valencia.
- Javier García Planells, doctor en Biología y, actualmente, responsable de la Unidad de Genética Médica, Sistemas Genómicos, S.L., Valencia.
- Pilar González Cabo, licenciada en Biología y Titulada Superior del CSIC en el IBV.
- Laia Pedrola Vidal, licenciada en Biología y becaria FPI en el IBV.
- Reyes Claramunt Alonso, licenciada en Biología y becaria del proyecto Fundación "la Caixa" en el IBV.
- Carmen Espinós Armero, doctora en Biología y Titulada Superior del CSIC en el IBV.

Francesc Palau



## AGRADECIMIENTOS

A lo largo de los quince años que abarca la memoria son muchas las personas que han formado parte del grupo y otras tantas aquéllas con la que se ha mantenido una colaboración estrecha. A todas ellas estoy muy agradecido por su esfuerzo y compañerismo en el trabajo del día a día. En primer lugar quiero mencionar al Dr. Félix Prieto, jefe de la Unidad de Genética del Hospital Universitario La Fe -con quien compartí muchos años de trabajo y de ilusiones- por sus enseñanzas de maestro y por haberme dado la oportunidad y la confianza de iniciar y desarrollar el programa de Neurogenética. Todos los integrantes de la Unidad de Genética fueron siempre buenos compañeros y amigos. Lucía Martínez preparó con diligencia las muestras de DNA y realizó durante años muchos análisis genéticos con cuidado y esmero. A todos ellos les estoy profundamente agradecido. De los estudiantes de doctorado que pasaron años en el seno del grupo, Eugènia Monrós fue mi primera becaria y mucho de los logros y resultados obtenidos en el estudio de la ataxia de Friedreich se deben a ella. Su contribución en el cartografiado y caracterización del gen FRDA fue fundamental. Siempre fue una entrañable compañera y amiga. Lola Navarrete y Patricia Smeyers son médicos que mostraron un gran interés por la ciencia biomédica y por su aplicación en la práctica clínica, la primera en su tesis doctoral sobre genética molecular de la distrofia miotónica y la segunda realizándola sobre la genética clínica de la ataxia de Friedreich. Sylvia Bort hizo su doctorado sobre la genética de las neuropatías periféricas contribuyendo enormemente al estudio de las mutaciones asociadas a la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth y a la puesta a punto de técnicas de análisis de DNA para la detección de tales mutaciones. Rafael Vázquez cambió la dirección del grupo y ya orientó sus investigaciones hacia la fisiopatología de las enfermedades y los modelos animales; el no participó en los estudios genéticos y su aplicación clínica pero siempre fue el alma del laboratorio.

Durante todos estos años, las colaboraciones con colegas médicos y biólogos han sido muchas y variadas. Mención especial merecen los Dres. Juan Vílchez y Teresa Sevilla, del Servicio de Neurología del Hospital La Fe, con quienes no sólo compartí y continuo compartiendo proyectos y muchas horas de trabajo sino una profunda amistad. Mucho de lo logrado en el campo científico se debe a su buen quehacer con los enfermos y a su perspicacia clínica. Del mismo servicio también ha sido muy estimulante y gratificante trabajar junto con los Dres. Juan Burguera y Pilar Solís. Con ellos inicié los estudios

genéticos de los trastornos del movimiento y colaboré a poner en marcha el programa de diagnóstico presintomático de la enfermedad de Huntington. Las colaboraciones con colegas y compañeros de otras instituciones han sido muy importantes y muy gratificantes. Quiero mencionar aquí a los profesores del Departamento de Genética de la Universidad de Valencia, M<sup>a</sup> Dolores Moltó, Rosa de Frutos e Ignacio Marín, a los Dres. Antonio Cruz Martínez y Javier Arpa del Hospital La Paz de Madrid, a los Dres. José Berciano y Onofre Combarros del Hospital Marqués de Valdecilla de Santander y al Dr. Adolfo López de Munain del Hospital Donostia de San Sebastián. De instituciones extranjeras cabe destacar la colaboración con el grupo de la profesora Christine Van Broeckhoven de la Universidad de Amberes con quien realizamos hermosos estudios sobre las mutaciones asociadas a la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, las colaboraciones durante años con los colegas del grupo colaborativo de la genética de la ataxia de Friedreich, especialmente con la Dra. Sue Chamberlain de la Facultad de Medicina del Hospital St. Mary's de Londres, con quien me inicié en este campo, y con el Dr. Michel Koenig de la Universidad de Estrasburgo, y finalmente, mencionar al Dr. Eric LeGuern del INSERM del Hospital de la Pitié-Salpêtrière de París, con quien compartimos el interés por las formas recesivas de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth que, aunque raras, muestran cierta prevalencia en los países ribereños del Mediterráneo.

La relación y el apoyo de las asociaciones de enfermos y familiares ha sido una constante a lo largo de todos los años dedicados al estudio y a la práctica de la genética clínica de estas enfermedades neurológicas raras. Ellos se lo merecen todo y a ellos les ofrecemos los pequeños logros que hemos ido alcanzado durante estos años. La Asociación Española de Ataxias Hereditarias (AEAH), especialmente sus gentes de Valencia, la Federación de Ataxias de España (FEDAES), la Asociación Valenciana de la Enfermedad de Huntington (AVEH), la Asociación Española de Enfermedades Musculares (ASEM), han estado siempre presentes en nuestra labor diaria y han constituido y constituyen un estímulo sin comparación posible.

La investigación científica no es posible sin financiación. Desde 1991 nuestro grupo ha estado financiado por las instituciones de la Administración del Estado como son el Plan Nacional de I+D (programa de Biomedicina), el Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III, incluyendo la Red Temática sobre Ataxias Cerebelosas, y también de la Generalitat Valenciana. La Fundación "la Caixa" ha sido siempre muy generosa con nosotros. A todas ellas cabe el mérito de que hayamos podido tener continuidad en el tiempo.

# CAPÍTULO I

## ATAXIAS HEREDITARIAS

### 1. INTRODUCCIÓN

Las ataxias hereditarias son un conjunto de enfermedades neurológicas que se heredan con carácter mendeliano, en las que se afectan el cerebelo, la médula espinal, las vías espinocerebelosas y, habitualmente, los nervios periféricos. Globalmente se caracterizan por presentar un síndrome atáxico con incoordinación motora central y de las extremidades. La gran mayoría de las ataxias cerebelosas hereditarias son trastornos progresivos y degenerativos y se distinguen dos grandes grupos, las ataxias cerebelosas autosómicas recesivas (ARCA), que suelen tener un inicio precoz (antes de los 20 años de edad), y las ataxias cerebelosas autosómicas dominantes (ADCA), que suelen tener un inicio tardío (después de los 20 años). En este segundo grupo cabe distinguir las ataxias espino-cerebelosas del adulto y las ataxias episódicas. La prevalencia estimada en nuestro país de las ataxias cerebelosas es de 10,2 casos por 100.000 habitantes.

Hasta hace 10 años la causa de la mayoría de estas enfermedades no se conocía. Esta situación ha ido cambiando merced a la aplicación de la genética molecular y la estrategia de la clonación posicional al estudio de las enfermedades genéticas.

La forma más frecuente de ataxia hereditaria es la ataxia de Friedreich (FRDA, MIM 229300) con una prevalencia de de 4,7 por cada 100.000 habitantes (López-Arlandis et al. 1995), la cual se transmite con herencia autosómica recesiva. Esta enfermedad se inicia alrededor de la pubertad con un cuadro progresivo de ataxia de la marcha y de las extremidades, disartria, arreflexia de los miembros inferiores, reflejo de Babinski, anomalías esqueléticas (escoliosis y pie cavo) y una neuropatía axonal sensitiva. La mayoría de los enfermos desarrollan una miocardiopatía hipertrófica y en un 10 por cien de ellos una diabetes mellitus. Mediante el análisis de ligamiento con marcadores polimórficos del DNA el grupo de la Escuela de Medicina del Hospital St. Mary's de Londres, localizó en 1988 el locus FRDA en el cromosoma 9cen-q13, confirmado posteriormente en 1989 por el grupo de la Universidad de Estrasburgo. Por aquella época, el Dr. F. Palau hizo una estancia postdoctoral junto con la Dra. Sue Chamberlain en el Hospital St. Mary's, trabajando en el campo de la genética molecular humana y, concretamente, en la clonación del gen *FRDA* de la ataxia de Friedreich. La estrategia consistía en deter-



minar el intervalo candidato a contener el gen en la región cromosómica donde previamente se había localizado el locus y, posteriormente, aislar y caracterizar los genes ubicados en el intervalo hasta encontrar el gen mutante. Es lo que ha venido en denominarse clonación posicional, es decir, clonar un gen partiendo de su lugar en el mapa genómico o locus, sin ninguna información funcional previa. La clonación posicional tiene tres pasos fundamentales: 1) cartografiado genómico empleando técnicas de análisis genético, principalmente el análisis de ligamiento trabajando con marcadores polimórficos y DNA de familias en las que segrega la enfermedad; el objetivo es localizar el locus en una región cromosómica y después refinar la región candidata mediante recombinantes genéticos entre el locus y los marcadores empleados; 2) construir un mapa físico utilizando genotecas de vectores del tipo YAC, BAC o PAC, capaces de clonar fragmentos genómicos relativamente grandes; y 3) caracterizar los genes localizados en el intervalo crítico y buscar mutaciones en estos genes en el DNA de los individuos enfermos de las familias con las que se ha realizado el cartografiado genético.

Nuestro grupo inició sus investigaciones sobre la genética molecular de la ataxia de Friedreich tras el verano de 1988, coleccionando familias y preparando muestras de DNA para el análisis genético con los marcadores D9S15 y D9S5, ligados al locus *FRDA* (Palau et al. 1990; Palau et al. 1993). Fue el inicio de una colaboración que aún se mantiene con el Dr. Juan J. Vilchez del Servicio de Neurología del H. U. La Fe. El primer objetivo era encontrar recombinantes genéticos en familias españolas que nos ayudaran a orientar la localización del gen respecto de los marcadores D9S15 y D9S5. El objetivo final era, obviamente, aislar y caracterizar el gen *FRDA*.

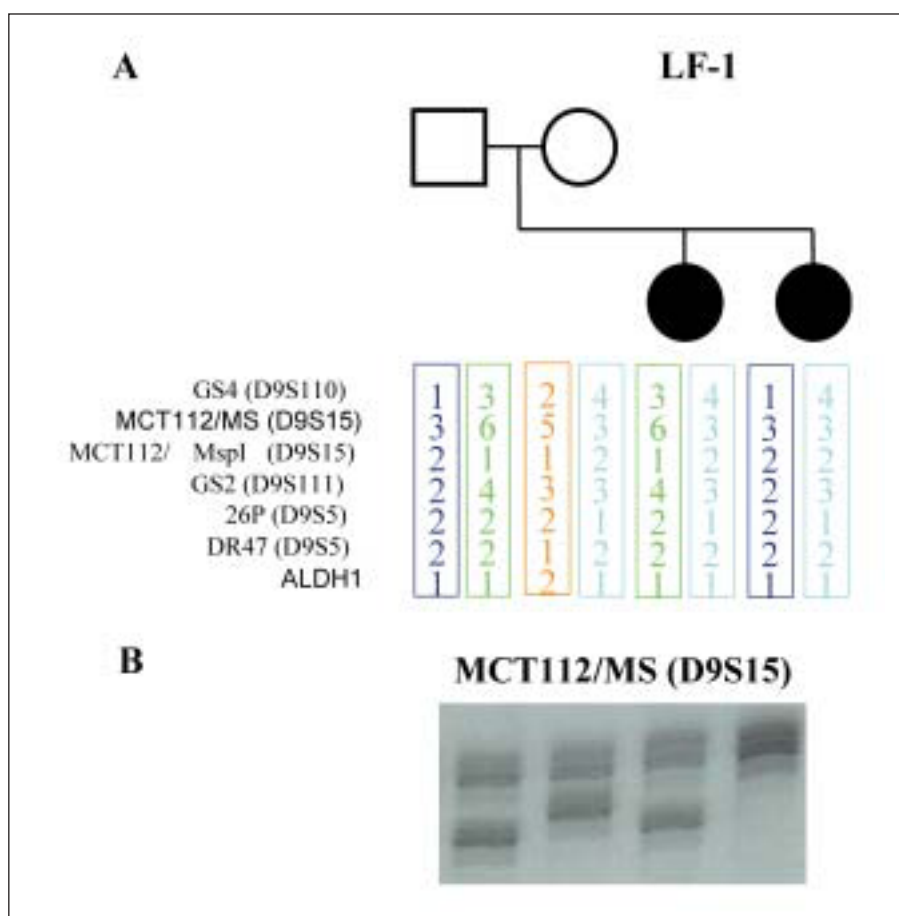
## **2. HALLAZGOS Y CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS**

### **2.1. Ataxia de Friedreich**

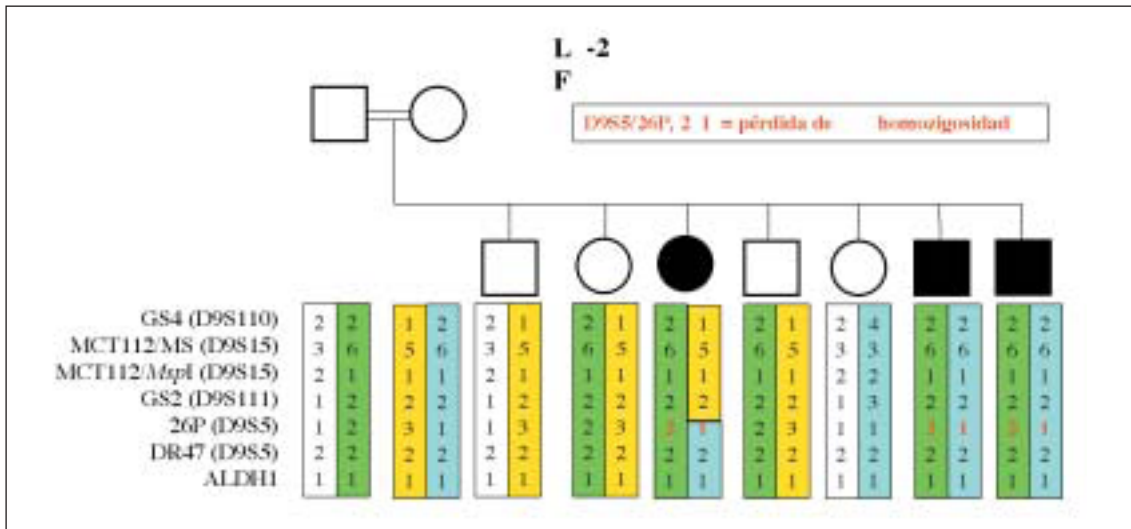
#### **2.1.1. Clonación posicional y caracterización del gen *FRDA***

En 1989-90, durante el período postdoctoral en Londres, habíamos caracterizado un recombinante en una familia valenciana con dos hijas enfermas (Fig. 1). Sin embargo, la falta de informatividad para algunos marcadores recientemente descritos no permitía orientar la dirección de búsqueda del gen. Ya de vuelta en el H.U. La Fe, con Eugènia Monrós incorporada al grupo, analizamos una serie de 22 familias múltiples y encontramos un nuevo recombinante entre los marcadores D9S5 (26P) y GS2 (Fig. 2), orientando definitivamente el gen *FRDA* hacia el centrómero del cromosoma 9 en el seno del

grupo de ligamiento. Este se podía esquematizar como cen-FRDA-D9S5-D9S15-qter. Estos resultados se vieron reflejados en sendos trabajos colaborativos (Chamberlain et al. 1993a; Chamberlain et al. 1993b). El paseo cromosómico trabajando con clones de la región obtenidos a partir de genotecas era posible. Sin embargo, aún haría falta caracterizar nuevos marcadores y estudiar nuevas familias para definir una región candidata asequible al análisis molecular. El aislamiento del gen tardaría todavía varios años.

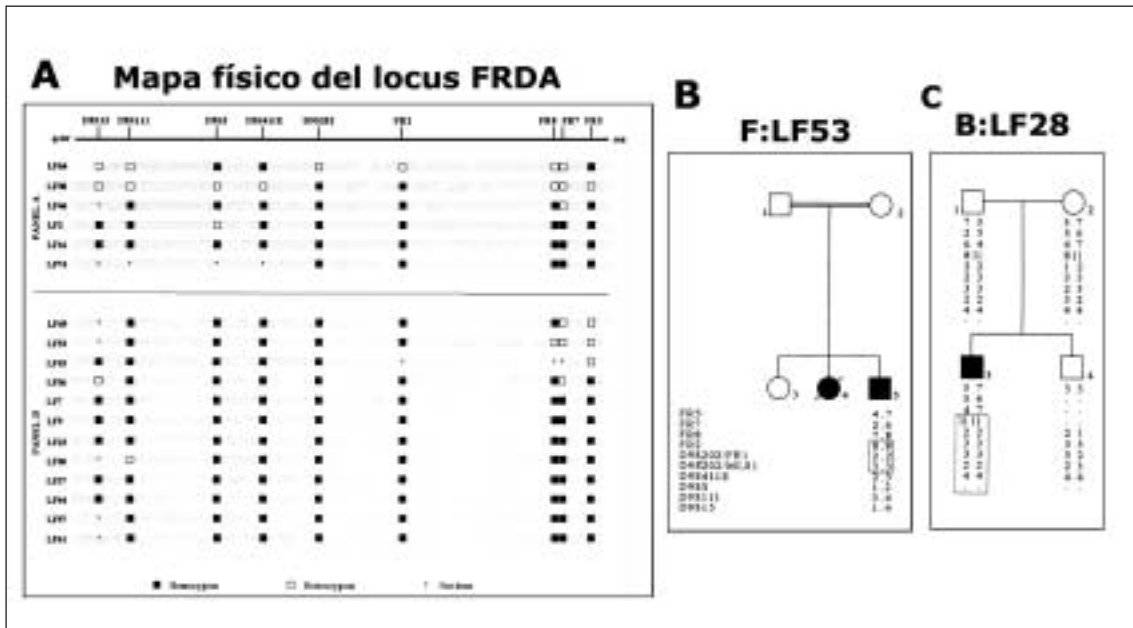


**Figura 1.** Análisis molecular de los marcadores del locus FRDA en una familia española, en la cual se encontró el primer recombinante genético para la ataxia de Friedreich. (A) Árbol genealógico y haplotipos. Se observa cómo el haplotipo del cromosoma paterno es distinto para ambas hermanas enfermas. (B) Gel de electroforesis de poliacrilamida que muestra el análisis del marcador microsatélite MCT112/MS del locus D9S15. Se observa cómo cada hermana ha recibido un alelo distinto del padre; mientras que la hermana mayor ha heredado el alelo de menor tamaño, la hermana pequeña es homocigota para el alelo del mayor tamaño, uno de ellos heredado del padre.



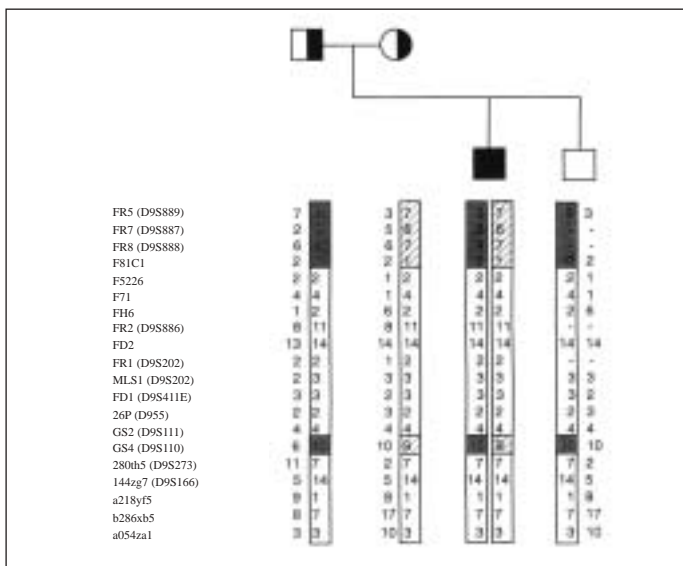
**Figura 2.** Análisis de haplotipos en la segunda familia en la que se encontró un recombinante genético en el locus *FRDA*. Los dos hermanos más pequeños muestran los mismos haplotipos, mientras que en la hermana enferma se observó una recombinación entre los loci *D9S111* y *D9S5*. Además, sobre la base de la consanguinidad de los padres y la hipótesis nula de identidad de todos los alelos para cada marcador por la homocigosidad esperada, la pérdida de tal homocigosidad en el marcador 26P del locus *D9S5* sugería de la presencia de un recombinante ancestral. Todo ello fue fundamental para indicar que el gen *FRDA* estaba localizado en sentido centromérico del brazo largo del cromosoma 9, más allá del locus *D9S5* en sentido opuesto al locus *D9S15*. Fue el principio de la clonación del gen.

Conforme la región crítica se va reduciendo resulta más difícil encontrar nuevos recombinantes genéticos. Sin embargo, dado que la ataxia de Friedreich es una enfermedad autosómica recesiva, diseñamos una nueva estrategia para definir mejor el intervalo de interés. Esta estrategia se basaba en la hipótesis de que los pacientes hijos de parejas consanguíneas deberían ser homocigotos para una misma mutación y, por ende, también para los alelos de los marcadores estrechamente ligados al gen. Postulamos que la pérdida de homocigosidad para un marcador indicaría la presencia de una recombinación ancestral. Trabajando así tendríamos de información de un gran número de meiosis por ascendencia que nosotros no podíamos analizar directamente. Del conjunto de la serie de 52 familias españolas que veníamos recolectando en el laboratorio seleccionamos aquellas que mostraban algún grado de consanguinidad o que eran homocigotas para algún marcador y procedimos a estudiar nuevos marcadores de la región. Se encontró pérdida de homocigosidad para algún marcador en 3 de 6 familias consanguíneas y en 4 de 12 en los que los haplotipos eran idénticos para ambos cromosomas. De esta manera obtuvimos datos sobre nuevos recombinantes ancestrales por ascendencia que redujeron la región candidata desde las más de 1.000 kilobases (kb) iniciales a 450 kb, entre los marcadores *D9S411E* y *FR8* (Fig. 3). Este trabajo se publicó y formó parte de la tesis de E. Monrós (Monrós et al. 1994).



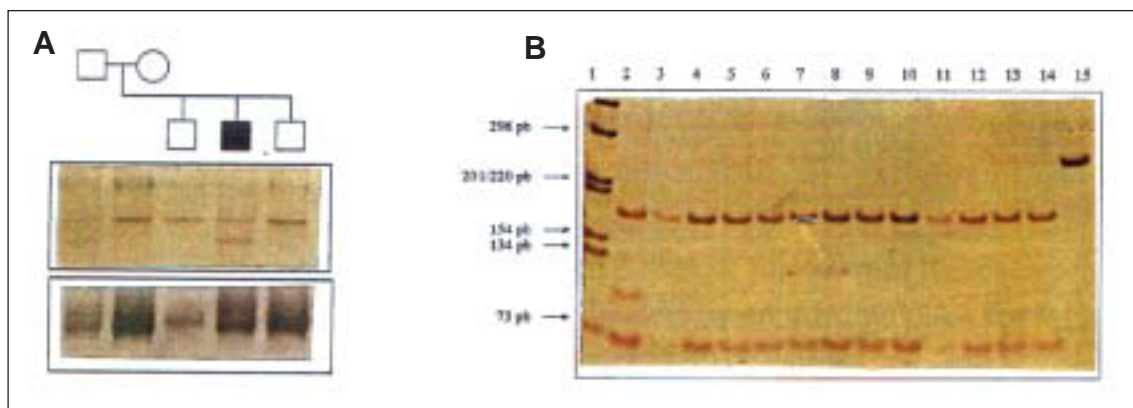
**Figura 3.** Cartografiado por homocigosidad del locus *FRDA*. (A) Mapa físico de los marcadores ligados y análisis de pérdida de homocigosidad para cada marcador y cada familia LF. Los cuadrados blancos indican la pérdida de homocigosidad para el marcador concreto. (B) Árbol genealógico y análisis genético de la familia consanguínea LF38. (C) Árbol genealógico y análisis genético para la familia LF53, no consanguínea pero que era homocigota para un haplotipo extenso entre FR2 y D9S15. En ambas familias se indica, mediante un recuadro, la región homocigota de los haplotipos contruidos.

Un estudio posterior del grupo colaborativo internacional con nuevos marcadores permitió reducir la región candidata. Concretamente el enfermo de la familia LF53 mostró pérdida de homocigosidad para el marcador F8101, lo que suponía delimitar el intervalo crítico a una región de tan sólo 150 kb (Fig. 4) entre los marcadores FR2 y F8101 (Montermini et al. 1995). Esta región genómica permitía el abordaje directo del gen *FRDA* con grandes garantías de éxito.



**Figura 4.** Diagrama del árbol genealógico de la familia LF53. Para cada individuo se indican los haplotipos de los marcadores ligados al locus *FRDA*. Los haplotipos asociados a la enfermedad están encuadrados. Se indican las regiones de heterocigosidad de origen paterno (sombreado) y materno (rayado).

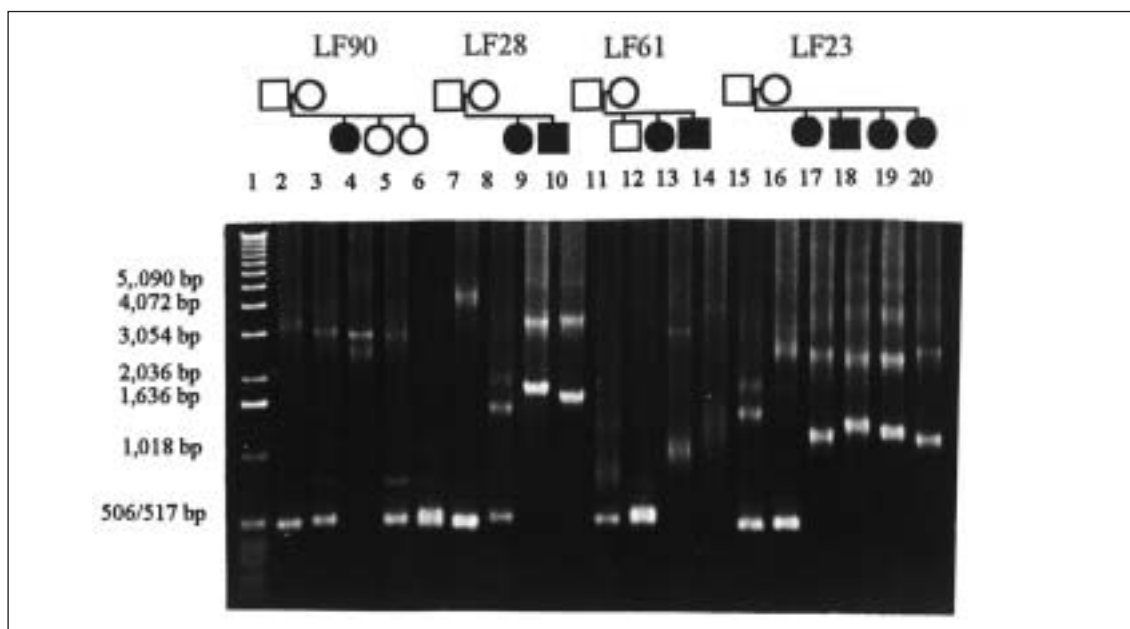
El grupo de Estrasburgo había generado un mapa físico de cósmidos en la región de 150 kb, definida mediante el análisis genético de una de nuestras familias. Este era un paso fundamental para poder aislar secuencias codificantes en la región candidata que correspondiesen al gen *FRDA*. Finalmente, en el verano de 1995 se aisló un gen, *X25*, constituido por siete exones y que ocupaba 80 kb del genoma. Este gen se expresaba en tejidos propios de la enfermedad tales como el miocardio, sistema nervioso, músculo esquelético y páncreas. El análisis de mutaciones de más de 180 familias produjo resultados decepcionantes. El cribado por la técnica de SSCP sólo puso en evidencia tres mutaciones puntuales en tres pacientes distintos. Además, en ninguno de ellos se encontró la segunda mutación esperada dado que la enfermedad aparece en individuos portadores de dos mutaciones. Una de estas mutaciones puntuales la encontramos en un paciente de nuestra serie, AF-3. Esta mutación afectaba al sitio aceptor de *splicing* del exón 3 (Fig. 5) (Campuzano et al. 1996).



**Figura 5.** Análisis de la mutación 385-2G>T del paciente AF-3. (A) En el panel se muestra el árbol genealógico de la familia indicándose con un cuadrado negro el paciente. Se aprecia un patrón distinto, tanto en la técnica de SSCP (panel de arriba) como en la técnica de heterodúplex (panel de abajo), en el DNA del enfermo como en su padre de quien ha heredado la mutación. La mutación se confirmó mediante secuenciación directa del fragmento del exón 3. (B) La mutación genera un sitio de restricción nuevo *Bst*NI, como se aprecia en la carrera 2 del panel en la que se observa una banda extra. Esta mutación no se encontró en una serie de individuos control de la población general (carreras 3 a 14). La carrera 1 es un marcador de peso molecular y la carrera 15 el fragmento sin digerir.

Parecía, pues, que el gen *X25* no era el gen *FRDA* buscado. Sin embargo, la sorpresa fue que en análisis de Southern con sondas específicas del gen y en la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) larga (Fig. 6) se observó en el DNA de los enfermos fragmentos de gran tamaño por encima de los tamaños esperados. Estos fragmentos anómalos se debían a la expansión del trinucleótido GAA localizado en el intrón 1 del gen *X25*. Los enfermos mostraban dos expansiones, mientras que los progenitores, portadores obligados, mostraban una única expansión. Además, los tres pacientes heterocigotos, incluido

AF-3, eran portadores de una expansión, siendo la segunda mutación la mutación puntual (Campuzano et al. 1996). Todos estos hallazgos confirmaban que X25 era realmente el gen mutante en la ataxia de Friedreich. Por otra parte, describíamos un nuevo tipo de mutación, la expansión de un triplete guanina-adenina-adenina en una enfermedad autosómica recesiva.



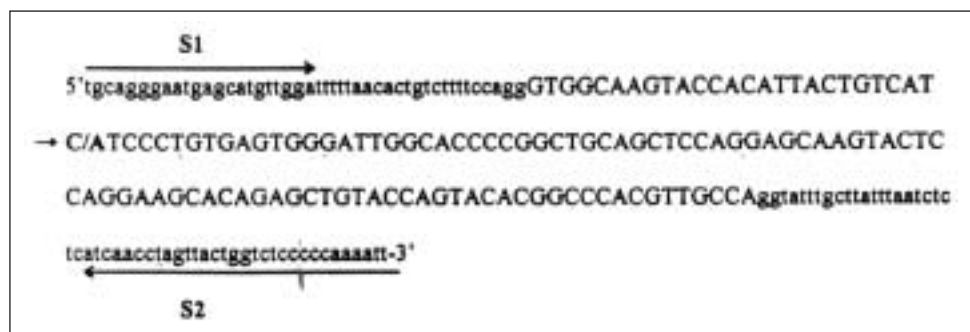
**Figura 6.** Análisis de la expansión GAA mediante PCR. Se ha estudiado cuatro familias en las que se observa que los enfermos (cuadrados y círculos oscuros) (carreras 4,9,10,13,14,17-20) tienen dos alelos expandidos, los progenitores y hermanos portadores un alelo expandido y un alelo normal de aproximadamente 500 pares de bases (pb) (carreras 2,3,5,7,8,11,12,15,16), y los hermanos no portadores únicamente alelos normales (carrera 6). La carrera 1 es un marcador de peso molecular.

Definitivamente se había conseguido caracterizar el gen *FRDA*. Este gen codifica una proteína de 210 aminoácidos denominada frataxina. La frataxina tiene un péptido señal de mitocondria y se localiza en la matriz mitocondrial, pegada a su membrana interna. La forma procesada tiene un tamaño de 18 kDa. Su función no se conoce bien todavía, aunque está involucrada en varios procesos fisiológicos de la mitocondria. No se conoce tampoco ninguna proteína que tenga las características de secuencia y estructurales de la frataxina, aunque, eso sí, se conocen frataxinas en toda la escala filogenética, desde bacterias hasta células eucariotas superiores. No es este el lugar de repasar todas las funciones atribuidas a la frataxina humana; no obstante, sólo quisiéramos indicar que muy recientemente hemos demostrado en el laboratorio que la frataxina interactúa con proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial y que podría jugar un papel como modulador en el transporte de electrones (González-Cabo et al. datos no publicados).

Uno de los aspectos aceptados por toda la comunidad científica era que la ataxia de Friedreich es una enfermedad genéticamente homogénea. Nosotros y otros autores habíamos demostrado que las variantes clínicas que afectaban a signos fundamentales que caracterizan a la enfermedad y que forman parte de los criterios clásicos para su diagnóstico, no eran consecuencia de la acción de otros genes distintos al localizado en el cromosoma 9q13 (Palau et al. 1995, ver más adelante). Sin embargo, al mismo tiempo que se caracterizaba el gen *FRDA*, tuvimos la oportunidad de estudiar una familia con un fenotipo clínico idéntico a la ataxia de Friedreich sin enfermedad cardíaca ni déficit de vitamina E. Mediante análisis de ligamiento, que confirmamos posteriormente analizando la expansión GAA, demostramos la exclusión del locus *FRDA* en esta familia. Debía haber, y así los señalamos, un segundo locus –muy raro– para el fenotipo Friedreich, el locus *FRDA2* (MIM 601992) (Smeyers et al. 1996).

### 2.1.2. Genética poblacional de la ataxia de Friedreich en España

Previamente al análisis de la expansión GAA y de otras mutaciones, se había iniciado en el laboratorio un estudio de haplotipos en 46 familias (92 cromosomas mutantes) con el objetivo de determinar cuántos haplotipos estaban asociados a la enfermedad y, por ende, inferir cuántas mutaciones podríamos encontrar en la población española. Para ello, analizamos un total de 9 marcadores descritos anteriormente y un nuevo marcador que caracterizamos nosotros, FAD1 (Fig. 7). FAD1 es un marcador dialélico (tipo SNP o "single nucleotide polymorphism") localizado en el gen *ZO-2*, a una distancia de 50 kb del gen *FRDA*. Observamos que FAD1 estaba en desequilibrio de ligamiento con el gen *FRDA*, de manera que el alelo A se asociaba fuertemente con los cromosomas mutantes tanto de pacientes españoles como franceses (tabla 1) y que los enfermos eran mayoritariamente homocigotos AA (tabla 2) (Monrós et al. 1996).



**Figura 7.** Secuencia del exón 4 y regiones flanqueantes del gen *ZO-2* donde se encuentra el SNP FAD1. La flecha indica la posición del nucleótido polimórfico. Citosina (C) representa el alelo A y adenosina (A) el alelo B. S1 y S2 son los dos cebadores diseñados para el análisis mediante PCR.

**Tabla 1.** Frecuencias de los alelos *FDA1* en cromosomas (*cr.*) normales y *FRDA*.

Alelos <i>FAD1</i>	Cr. normales españoles	Cr. <i>FRDA</i> españoles	Cr. normales franceses	Cr. <i>FRDA</i> franceses	Total normales	Total <i>FRDA</i>
<b>A (p)</b>	130 (0,75)	24 (0,16)	41 (0,77)	11 (0,17)	171	35
<b>B (q)</b>	44 (0,25)	126 (0,84)	12 (0,23)	55 (0,83)	56	181
<b>Total</b>	174	150	53	66	227	216

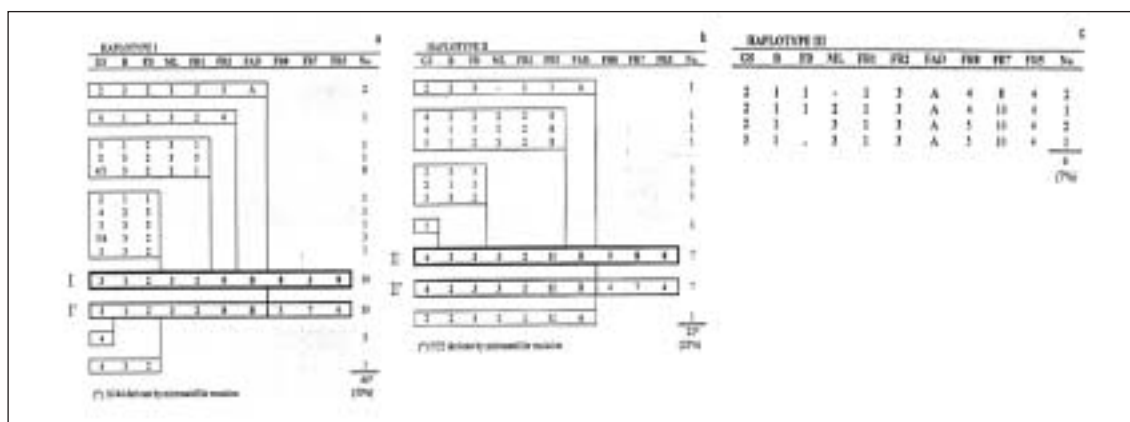
Valor  $c^2$  para el conjunto de los datos;  $c^2= 155, 54$ ; 1 g.l.;  $p<0,0001$ .

**Tabla 2.** Distribución genotípica *FAD1* en la población española normal y enferma.

Genotipo <i>FAD1</i>	Pob. Normal Española	Pob. Normal Vasca	Pob. Total Normal Observada	Pob. Normal Esperada	Pob. Total <i>FRDA</i> Observada	Pob. <i>FRDA</i> Esperada
<b>AA</b>	28	17	45	48,56	5	1,92
<b>AB</b>	27	13	40	32,87	14	20,16
<b>BB</b>	2	0	2	5,56	56	52,92
<b>Total</b>	57	30	87	87	75	75

Valor  $c^2$ : Población normal española *versus* población normal vasca:  $c^2= 0,26$ ; 1 g.l.;  $p= 0,6$  (n.s.). Población normal *versus* población enferma:  $c^2= 94,42$ ; 2 g.l.;  $p<0,0001$ .

El análisis de los 10 marcadores, incluido el *FAD1*, mostró que un total de 3 haplotipos principales se asociaban al 85 por ciento de los cromosomas mutantes, por lo que en la población española eran pocas las mutaciones esperables (Fig. 8) (Monrós et al. 1996). Este resultado se confirmaría inmediatamente tras estudiar el triplete GAA y observar que el 98 por cien de los cromosomas mutantes eran portadores de una expansión GAA (Monrós et al. 1997). La presencia de tres haplotipos básicos y sus variantes asociados a la enfermedad podría deberse a orígenes distintos de la expansión GAA a partir de los alelos normales grandes, de los que se postula que puedan actuar como reservorio en la población.

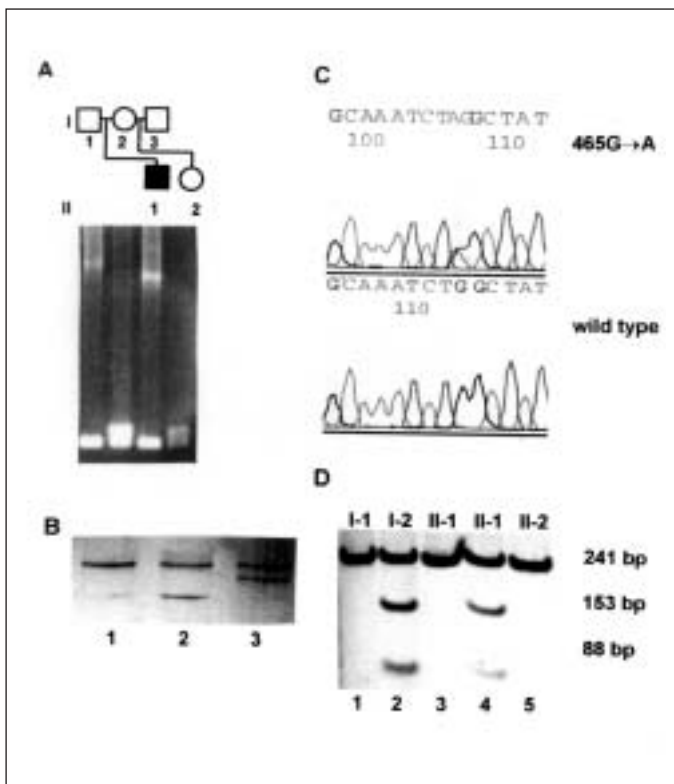


**Figura 8.** Análisis de haplotipos en 92 cromosomas mutantes *FRDA*. En cada uno de los paneles a, b y c se representa las variantes por recombinación de los tres haplotipos básicos, I, II y III, así como sus frecuencias. El resto de haplotipos raros no se muestra en la figura.



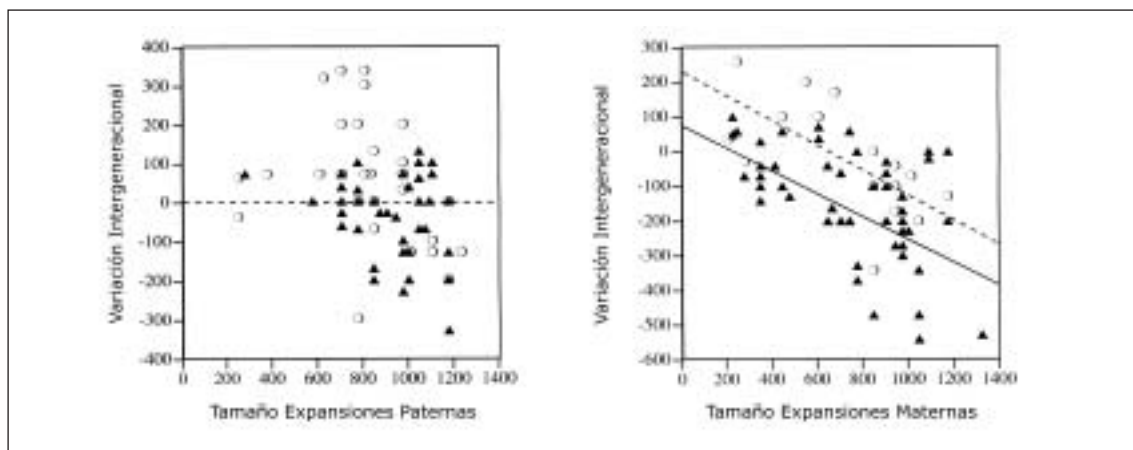
### 2.1.3. Expansión GAA y patología molecular de la ataxia de Friedreich

En el trabajo original (Campuzano et al. 1996) se había demostrado que la expansión del triplete GAA es la mutación la más frecuente, con mucho, en los cromosomas mutantes de la ataxia de Friedreich; sin embargo, no se había establecido cuál era la patología molecular completa y la distribución de los distintos tipos de mutaciones para cada población. Por otra parte, el trinucleótido GAA, al igual que otras mutaciones dinámicas (revisado en Palau 1996, 1999, 2001), mostraba una inestabilidad meiótica cuando se transmite de padres a hijos. Nos propusimos estudiar y definir estos aspectos en la población española. Para ello estudiamos una serie de 104 pacientes y 163 familiares portadores, definidos previamente mediante análisis de ligamiento. El análisis molecular mostró que la expansión GAA se encontraba en el 96 por cien de los cromosomas mutantes, por lo que la tasa de enfermos homocigotos para la expansión era del 94 por cien (Monrós et al. 1997). Los tamaños de las expansiones patológicas variaban entre 210 y 1210 repeticiones GAA (los alelos normales habían mostrado un rango entre 6 y 34 repeticiones). Posteriormente, procedimos a estudiar los alelos mutantes no expandidos en los enfermos heterocigotos. En cuatro de los siete enfermos pudimos encontrar, mediante las técnicas de SSCP y secuenciación, la segunda mutación (Fig. 9). Éstas eran mutaciones puntuales del tipo *nonsense* (sentido erróneo) o de *splicing*, lo que sugería que la proteína que sintetizaba debía ser truncada (De Castro et al 2000).



**Figura 9.** Análisis molecular en el paciente 96-230. (A) Análisis del triplete GAA mostrando un único alelo expandido (heterocigoto compuesto). (B) Análisis de SSCP, la carrera 3 muestra un patrón de bandas anómalo, lo que sugiere la presencia de una mutación puntual. (C) Secuenciación directa del DNA del paciente, apreciándose una sustitución de una guanina por una adenina en la posición 456 del gen *FRDA*; este cambio se traduce en un codón de parada en el triptófano 155, *W155X*, produciendo una proteína truncada. (D) Análisis de la mutación *W155X* mediante análisis de restricción con la enzima *AluI* en el conjunto de la familia.

Para estudiar el comportamiento meiótico de la expansión GAA en la serie indicada anteriormente, estudiamos la transmisión intergeneracional en 212 parejas progenitor-hijo/a. Demostramos que la inestabilidad meiótica intergeneracional sufría un sesgo sexual: los alelos expandidos transmitidos por los padres tendían a reducir su tamaño, mientras que los alelos maternos no mostraban una tendencia concreta. También observamos que el patrón de variación intergeneracional dependía del estatus genético del hijo: los enfermos tenían expansiones más cortas que los portadores heterocigotos. Este hallazgo se interpretó como la expresión de un fenómeno de selección postzigótico de los alelos expandidos, de manera que en los enfermos las células embrionarias y fetales tenderían a seleccionar las expansiones más cortas (Fig. 10) (Monrós et al. 1997).



**Figura 10.** Variación intergeneracional de los alelos GAA expandidos paternos (izquierda) y maternos (derecha) versus alelos expandidos de la descendencia, expresado en unidades de repetición. En el eje de abscisas se representa el tamaño de alelo paterno o materno, y en el eje de ordenadas se indica la variación en los hijos (enfermos indicado por triángulos oscuros, portadores heterocigotos sanos indicado por círculos claros). En ambos paneles de muestra la recta de regresión: en el panel de la izquierda las rectas para la transmisión padre-hijo (línea continua para los hijos enfermos, línea discontinua para los hijos portadores sanos); en el panel de la derecha la recta de regresión es igual en la transmisión madre-hijo, sea este homocigoto enfermo o portador sano.

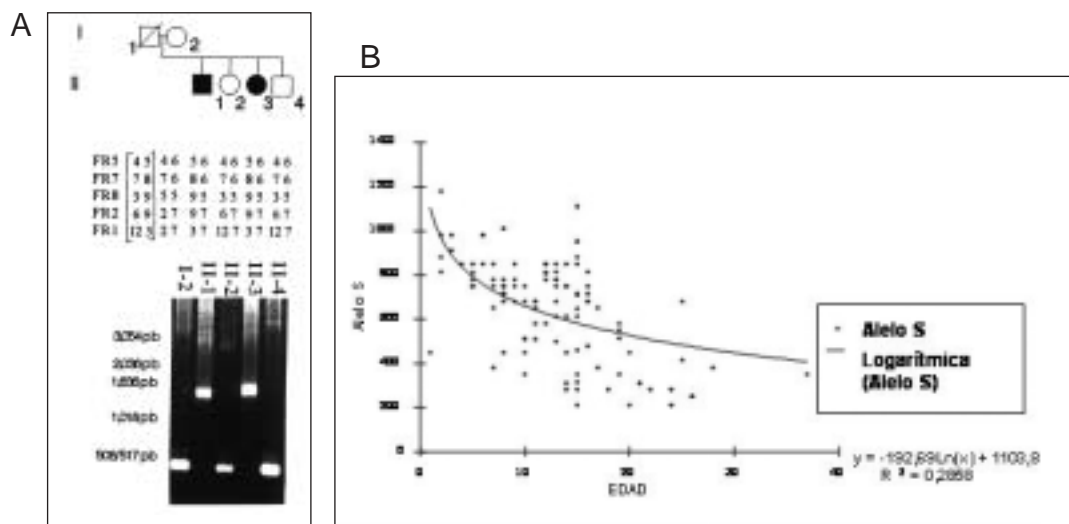
En un intento de determinar el origen de la repetición GAA y su posterior expansión en humanos, estudiamos en colaboración con el Departamento de Genética de la Universidad de Valencia la presencia de unidades GAA en primates. Observamos que el triplete se encontraba en los genes ortólogos de chimpancé, gorila, mandril y macaco rhesus en tres, dos, una y una veces, respectivamente. Esto confirmaba que los tripletes estaban presentes en primates no homínidos, pero que el fenómeno de variabilidad en el número y su posterior expansión había sido un proceso estrictamente humano (González-Cabo et al. 1999).

#### **2.1.4. Fenotipos clínicos y homogeneidad genética**

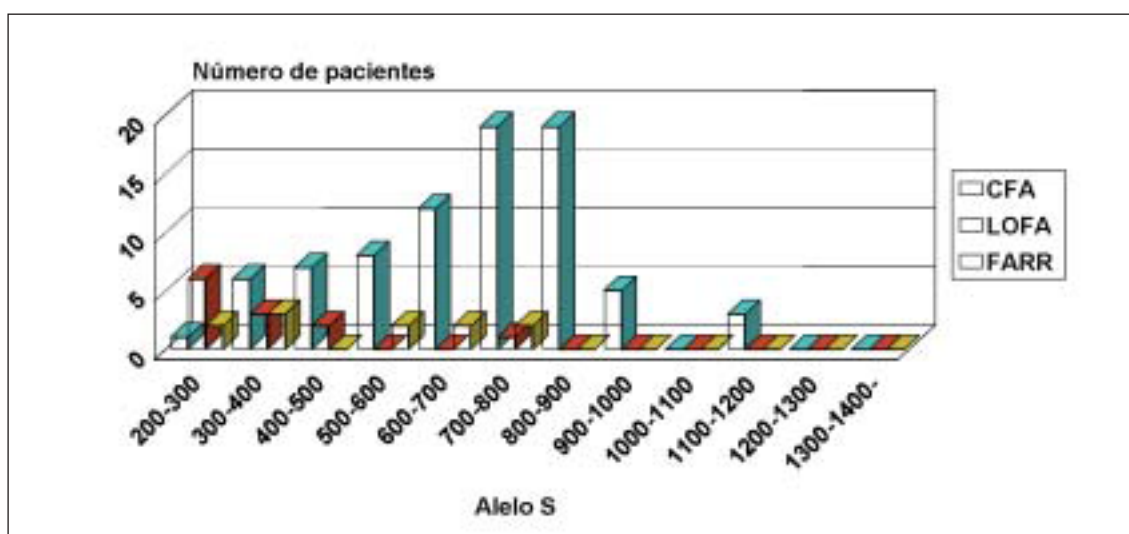
Uno de los aspectos de interés en la ataxia de Friedreich trataba sobre la variabilidad clínica que se observaba en algunos pacientes, incluso dentro de una misma familia, y ello a pesar de tratarse de una enfermedad recesiva, lo que clásicamente solía asociarse con sintomatología más o menos homogénea. Nosotros habíamos observado que algunos enfermos mostraban reflejos patelares conservados e, incluso, exaltados. La ausencia de reflejos es una manifestación de la lesión anatomopatológica de la enfermedad a consecuencia de la afectación de las neuronas del ganglio dorsal y de la neuropatía axonal sensitiva asociada. Esta arreflexia de miembros inferiores es uno de los signos principales para el diagnóstico clínico. Nos propusimos, pues, averiguar si las formas clínicas con reflejos conservados eran consecuencia de mutaciones en un segundo gen. Para ellos realizamos el análisis de ligamiento con marcadores ligados al locus FRDA en una serie de seis familias españolas e italianas. Demostramos que estas familias presentaban ligamiento al locus, por lo que la variabilidad fenotípica observada no era consecuencia de una causa genética distinta. Definimos el fenotipo como ataxia de Friedreich con reflejos conservados (FARR en sus siglas inglesas) (Palau et al. 1995).

Aislado el gen y reconocida la mutación GAA en la mayoría de pacientes en 1996, nos propusimos confirmar estos hallazgos mediante el análisis directo de la expansión GAA. En la serie mencionada de 104 pacientes confirmamos que 9 enfermos con fenotipo FARR era homocigotos para la expansión, al igual que los pacientes con la forma clásica. Es más, pudimos observar que los pacientes que habían iniciado la enfermedad después de los 20 años de edad (ataxia de Friedreich de inicio tardío, LOFA en las siglas inglesas) también eran portadores de dos alelos expandidos. Es decir, la variación en aspectos fundamentales del fenotipo clínico no eran consecuencia de heterogeneidad genética sino de otros factores. Como factor básico resultó ser el tamaño de los alelos expandidos corto (alelo S) y largo (alelo L), principalmente el más pequeño o alelo S (Fig. 11). Observamos una correlación inversa entre la edad de inicio de la enfermedad y el tamaño de la expansión. Esto se debe, probablemente, a que a menor tamaño de la expansión se transcribe más RNA mensajero y hay mayor frataxina disponible en las células. En el conjunto de la serie, observamos que los enfermos con fenotipo LOFA tenían alelos más cortos, si bien también se apreciaba aunque en menor significación para los pacientes con fenotipo FARR (Fig. 12). Finalmente también pudimos constatar que aquellos enfermos con miocardiopatía eran portadores de expansiones más grandes (Monrós et al. 1997). Los estudios en otros enfermos nos permitió corroborar estos

hallazgos (Cruz-Martínez et al. 1997; De Castro et al. 1997; Cruz-Martínez y Palau 1999; Martin et al. 1999), pudiendo ampliar el espectro clínico de la ataxia de Friedreich a enfermos que no tenían neuropatía sensitiva (Cruz-Martínez et al. 1997) o en los que la enfermedad había debutado como una ataxia sensitiva pura (Berciano et al. 1999).



**Figura 11.** Correlación del alelo corto S de la expansión GAA con la edad de inicio de la enfermedad. (A) Análisis genético de marcadores y de la expansión GAA en una familia con dos hermanos afectados que habían iniciado la enfermedad a los 26 (II-1) y 24 (II-3) años; ninguno de ellos tenía miocardiopatía y II-3 tampoco mostraba signos eletrofisiológicos de neuropatía sensitiva. El análisis de haplotipos con marcadores ya había indicado posible ligamiento al locus FRDA, lo cual se confirmó tras el análisis del triplete GAA; ambos enfermos tienen un alelo S en el rango bajo, con 280 y 310 repeticiones, respectivamente. (B) Gráfica donde se muestra la correlación inversa entre la edad de inicio y el tamaño del alelo S.



**Figura 12.** Distribución de la forma clásica de ataxia de Friedreich (CFA) y las variantes clínicas LOFA y FARR en relación con el tamaño del alelo S.

## **2.2. Ataxias cerebelosas autosómicas dominantes**

Las ataxias cerebelosas autosómicas dominantes (ADCA) son un grupo amplio y heterogéneo de trastornos atáxicos y del movimiento que se caracterizan por una herencia vertical, con afectación en generaciones sucesivas, e inicio de la enfermedad habitualmente tardío. A principios de los años noventa del pasado siglo no se conocía de ellas nada acerca de su naturaleza etiológica excepto que eran enfermedades genéticas por su carácter familiar y hereditario. A ellas se contraponían cuadros clínicos muy similares pero que afectaban a personas sin antecedentes familiares, las llamadas formas idiopáticas. Entre las ADCA cabe distinguir dos grupos básicos, las ataxias espinocerebelosas del adulto, trastornos neurodegenerativos y progresivos, y las ataxias episódicas. A lo largo de los últimos diez años se ha podido comprobar que tanto las ataxias espinocerebelosas como las episódicas muestran, sobre todo las primeras, una gran heterogeneidad genética (Palau et al. 1998; Palau 1999; Palau y Gandia 2004).

### **2.2.1. Ataxias espinocerebelosas del adulto**

Las ataxias espinocerebelosas de inicio tardío son un conjunto de cuadros clínicos caracterizados por un síndrome cerebeloso y afectación de las vías piramidal y extrapiramidal, la retina, el nervio óptico, la musculatura extrínseca ocular, el córtex cerebral, el bulbo, la protuberancia, la médula espinal y los nervios periféricos. Siguiendo la clasificación clínica que Anita Harding propuso a principio de los años ochenta, los pacientes con la forma clínica tipo I se manifiestan por un síndrome cerebeloso-plus que incluye junto con el síndrome atáxico, oftalmoplejía supranuclear, movimientos sacádicos oculares lentos, atrofia óptica, signos extrapiramidales, demencia, fasciculación facial, lingual o de las extremidades, reflejos aumentados o disminuidos y pérdida sensitiva. La forma tipo II es un síndrome cerebeloso-plus que asocia degeneración retiniana, mientras que la forma tipo III representa las variantes genéticas que se manifiestan exclusivamente con un síndrome cerebeloso puro (Palau y Gandía 2004).

Hasta el momento actual se han descrito hasta 25 loci genéticos asociados con las ataxias espinocerebelosas del adulto, algunos de ellos en una única familia. Estos loci y sus genes se han denominado globalmente como genes SCA y un dígito asociado. En un número importante de ellas se ha caracterizado el gen y la mutación. En la mayoría de los casos se trata de una mutación dinámica por expansión del trinucleótido CAG (citocina-adenina-guanina) en la ORF o región codificante del gen que se traduce en un tracto de poliglutaminas tanto en la proteína salvaje como en la mutante (Palau 1999). En unos pocos casos la mutación es dinámica pero tiene otra secuencia y otras característi-

cas; así ocurre con un triplete CAG pero en la región transcrita pero no traducida 5'-UTR del gen en la forma SCA12, un pentanucleótido ATTCT en un intrón en la ataxia SCA10 y un triplete CTG en la región no traducida 3'-UTR del gen para la forma SCA8. En la tabla 3 se muestra las características genéticas de estas enfermedades y de otras enfermedades asociadas a mutaciones dinámicas o por expansión de secuencias repetitivas en tándem. En rojo se muestran aquellas patologías producidas por la expansión de un triplete CAG, en verde aquellas producidas por la expansión de un triplete distinto al triplete CAG, en azul la producida por la expansión de un pentanucleótido y en gris aquellas patologías en las que todavía no se ha caracterizado la mutación responsable, pero que cabría pensar que estuvieran producidas por un mecanismo molecular similar. En la última columna se indica la cita en la que se describió por primera vez el gen y su número del catálogo MIM.

**Tabla 3. Enfermedades relacionadas con las expansiones dinámicas.**

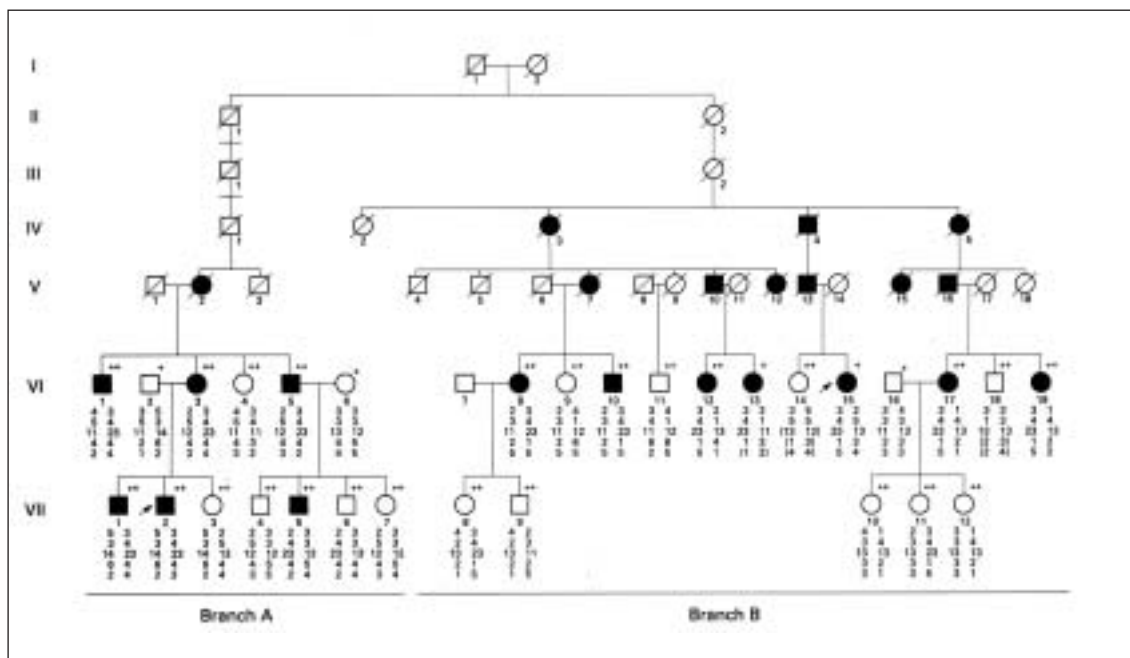
Enfermedad	Gen / proteína	Locus	Repetición (STR)	Localización	Número repeticiones			Referencia #MIM
					normal	premutación	mutación	
<b>SCA1</b>	SCA1	6p23	CAG	ORF	6-38		39-83	(Orr et al., 1993) #164400
<b>SCA2</b>	SCA2	12q24	CAG	ORF	14-31		34-77	(Sanpei et al., 1996) #183090
<b>SCA3</b>	SCA3	14q32	CAG	ORF	12-40		54-86	(Cancel et al., 1995) #109150
SCA4	?	16q22.1	?	?				(Flanigan et al., 1996) #600223
<b>SCA5</b>	?	11p11-q11	?	?				(Ranum et al., 1994) #600224
<b>SCA6</b>	CACNA1A	19p13	CAG	ORF	4-19		20-30	(Zhuchenko et al., 1997) #183086
<b>SCA7</b>	SCA7	3p14.1	CAG	ORF	4-35	28-35	34- >300	(David et al., 1997) #164500
<b>SCA8</b>	-	13q21	CTG	UTR	16-91		107- >250	(Koob et al., 1999) #603680
<b>SCA10</b>	SCA10	22q13	ATTCT	Intrón	10-22		750-4500	(Matsuura et al., 2000) #603516
<b>SCA11</b>	?	5q14-21	?	?	-		-	(Worth et al., 1999) #604432
<b>SCA12</b>	PPP2R2B	5q32	CAG	5'UTR	7-28		66-78	(Holmes et al., 1999) #604326
<b>SCA13</b>	?	19q13.4	?	?	-		-	(Herman-Bert et al., 2000) #605259
<b>SCA14</b>	PRKCG	19q13.4	-	?	-		-	(Yamashita et al., 2000) #605361
<b>SCA16</b>	?	8q23-24	?	?	-		-	(Miyoshi et al., 2001) #606364

Enfermedad	Gen / proteína	Locus	Repetición (STR)	Localización	Número repeticiones			Referencia #MIM
					normal	premutación	mutación	
<b>SCA17</b>	<i>TBP</i>	6q27	CAG	ORF	29-42		47-63	(Koide et al., 1999) #607136
<b>SCA19</b>	?	1p21-q21	?	?				(Verbeek et al., 2002) #607346
<b>SCA21</b>	?	7p21.3-15.1	?	?				(Vuillaume et al., 2002) #607454
<b>SCA22</b>	?	1p21-q23	?	?				(Chung et al., 2003) #no asignado
<b>HD</b>	<i>huntingtina</i>	4p16.3	CAG	ORF	6-34	35-39	36-180	(1993) #143100
<b>HDL2</b>	<i>junctofilina 3</i>	16q24.1	CTG	?	7-26		44-57	(Holmes et al., 2001) #606438
<b>DRPLA</b>	<i>atrophina 1</i>	12p13.31	CAG	ORF	3-35		49-88	(Koide et al., 1994) #125370
<b>SBMA</b>	<i>receptor de andrógenos</i>	Xq12	CAG	ORF	9-36		38-62	(La Spada et al., 1991) #313200
<b>DM1</b>	<i>DMPK</i>	19q13.32	CTG	3'UTR	5-37	50-180	200->2000	(Aslanidis et al., 1992) #160900
<b>DM2</b>	<i>ZNF9</i>	3q21.3	CCTG	Intrón			75-11000	[Liquori, 2001 #225] #602668
<b>FRDA</b>	<i>frataxina</i>	9q13-q21	GAA	Intrón	8-22		12-1700	(Campuzano et al., 1996) #229300
<b>FRAXA</b>	<i>FMR1</i>	Xq27.3	CGG	5'UTR	6-52	50-200	200->2000	(Fu et al., 1991) #309550
<b>FRAXE</b>	<i>FMR2</i>	Xq28	CGG	5'UTR	6-25		>200	(Knight et al., 1993) #309548

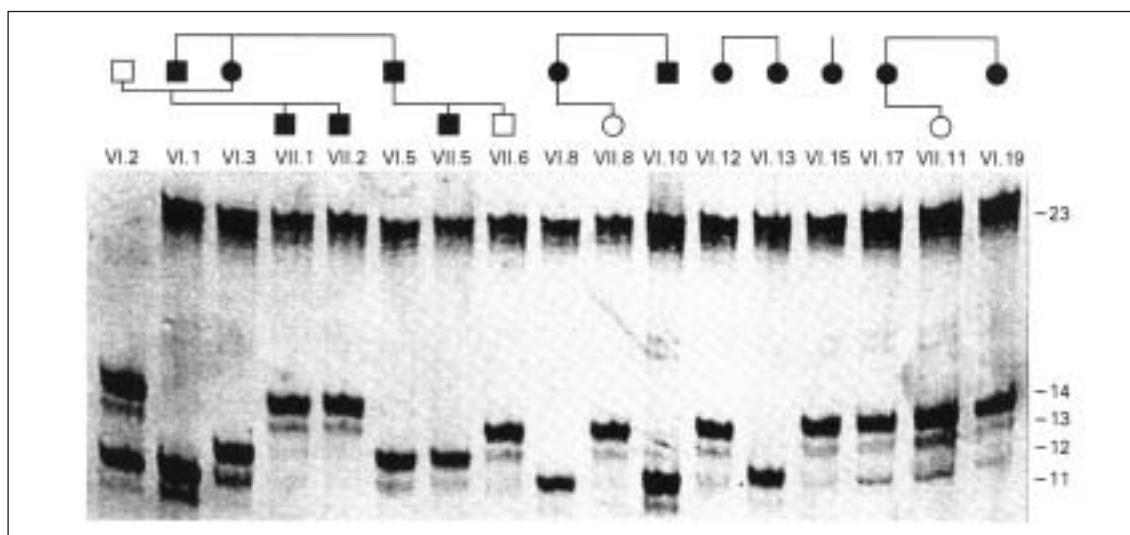
#### 2.2.1.1. Genética de la ataxia espinocerebelosa SCA6 (MIM 183086)

La ataxia espinocerebelosa tipo SCA6 es una degeneración cerebelosa autosómica dominante causada por la expansión de un triplete CAG en el exón 47 del gen *CACNA1A*, que codifica la subunidad alfa del canal de calcio voltaje-dependiente. Nosotros tuvimos la oportunidad de analizar una amplia familia valenciana compuesta de 57 miembros, 29 de los cuales habían sido examinados por nuestro grupo. Tras descartar los loci conocidos en 1996, *SCA1*, *SCA2*, *SCA3*, *SCA4*, *SCA5* y *SCA7*, se inició un proyecto de cartografiado genético a lo largo del todo el genoma. Este estudio había permitido excluir el 90 por cien del genoma cuando se describió la asociación de la expansión CAG en el gen *CACNA1A* en algunos casos aislados y familias con formas cerebelosas de las ataxias (Fig. 13). Nuestro trabajo no había incluido aún el cromosoma 19 donde *CACNA1A* está precisamente ubicado. Cuando analizamos la familia para la expansión CAG de

CACNA1A, observamos que en todos los enfermos segregaba una expansión de 23 repeticiones (Fig. 14). Observamos también que, al contrario de otras expansiones CAG, la repetición SCA6 se transmitía estable durante la meiosis (García-Planells et al. 1999).



**Figura 13.** Árbol genealógico parcial de la familia SRB. El asterisco indica que el paciente había sido examinado clínicamente. Se indican los dos probandos de las dos ramas de la familia, A y B, mediante una flecha. El estudio genético se hizo tras obtener el consentimiento informado de cada miembro de la familia. Para cada uno de los pacientes y familia se muestran los haplotipos de marcadores ligados al locus SCA6 en el cromosoma 19p13, D19S586, D19S221, D19S714 y D19S433. El análisis de ligamiento mostró un lod score de 3,29 para D19S221, confirmando ligamiento el locus SCA6.



**Figura 14.** Análisis del trinucleótido CAG del locus SCA6 en 13 pacientes (símbolos oscuros) y de tres sujetos presintomáticos positivos (símbolos claros). Se muestran seis transmisiones progenitor-hijo. Los tamaños de los alelos normales y el alelo mutante de 23 repeticiones CAG se indican a la derecha. El DNA de cada individuo de amplificó mediante PCR y se aplicó en un gel de poliacrilamida revelado con nitrato de plata.



### **2.2.2. Ataxias episódicas**

Las ataxias episódicas o periódicas se caracterizan por tener un patrón hereditario autosómico dominante y por presentar un cuadro clínico definido por episodios de ataxia de los que, generalmente, el paciente se recupera durante el período intercrítico. Los pacientes sufren ataques de ataxia, disartria, vértigo y nistagmo en la infancia o la adolescencia. Se conocen dos formas genéticas fundamentales, aunque hoy se sabe que la heterogeneidad genética es aún más amplia. La ataxia episódica tipo 1 (EA-1) se debe a mutaciones en el gen del canal de potasio *KCNA1* en el cromosoma 12. La ataxia episódica tipo 2 (EA-2) es consecuencia de mutaciones en el gen *CACNA1A*, el mismo que condiciona la ataxia espinocerebelosa SCA6 por expansión de un triplete CAG. Este mismo gen también es responsable de formas de migraña hemipléjica familiar.

En nuestro grupo tuvimos la oportunidad de estudiar una familia con una EA-1 clínica (Gómez-Gosálvez et al. 1997). El análisis molecular confirmó la presencia de una mutación puntual en el gen *KCNA1*.

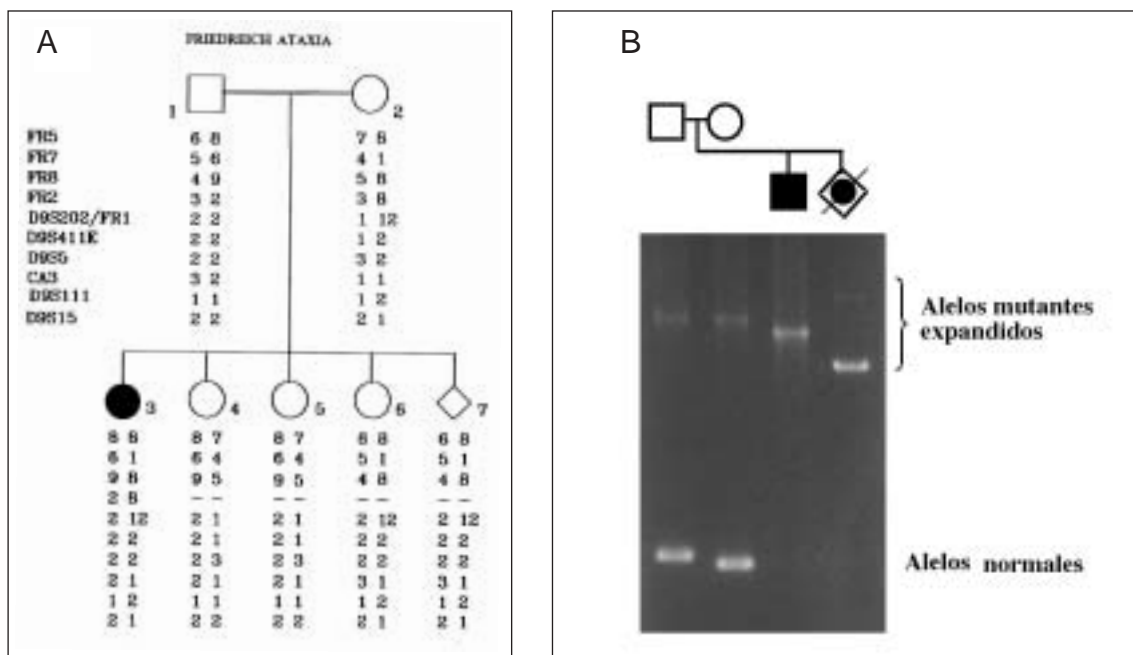
## **3. GENÉTICA CLÍNICA: DIAGNÓSTICO MOLECULAR Y CONSEJO GENÉTICO**

### **3.1. Diagnóstico molecular y consejo genético de la ataxia de Friedreich**

La ataxia de Friedreich se ha venido diagnosticando en base a criterios clínicos definidos a finales de los años setenta. Antes de los estudios genéticos no había ningún marcador biológico para el diagnóstico de la enfermedad. La localización del gen, la disponibilidad de marcadores genéticos ligados al locus *FRDA* y el aislamiento del gen y caracterización de las mutaciones, han permitido ampliar las posibilidades de diagnóstico tanto en el terreno de la clínica y de las variantes clínicas como en el diagnóstico de portadores (Palau et al. 1991) y prenatal (Monrós et al 1995).

Anteriormente, hemos descrito el fenotipo FARR como una variante de la ataxia de Friedreich asociada a la preservación de los reflejos osteotendinosos. Sin embargo, existe una forma de ataxia de inicio precoz que mantiene los reflejos (EOCARR en siglas inglesas) y que es diferente a la ataxia de Friedreich. En un estudio posterior utilizamos el análisis molecular para determinar los aspectos clínicos que diferencian la variante FARR de otras ataxias con reflejos conservados (De Castro et al. 1999).

La ataxia de Friedreich es una enfermedad autosómica recesiva. Desde el punto de vista genético la enfermedad se padece cuando un individuo es portador de dos mutaciones en los genes paterno y materno. El patrón de herencia indica que ambos progenitores son heterocigotos portadores sanos obligados. Éstas son las bases para establecer los riesgos de recurrencia para los distintos miembros de la familia y ofrecer un consejo genético. Éste último ha cambiado a partir de disponer el diagnóstico molecular para las diferentes situaciones que se pueden plantear. En este sentido, el riesgo de recurrencia para un matrimonio o una pareja con un hijo enfermo es del 25 por cien. El riesgo de ser portador de un hermano sano ya mayor es del 66 por cien. El riesgo de ser portador para los hijos de enfermos es del 100 por cien. Tanto para los enfermos como para sus hermanos portadores es importante determinar si su pareja es portadora de la expansión GAA (la tasa de portadores en la población general es de 1/100) y así poder ofrecer un consejo genético y planificar las posibles actuaciones (Palau 2001). Una de las aplicaciones clínicas más importantes es el diagnóstico prenatal a parejas con un hijo enfermo (Monrós et al. 1995) (Fig. 15). Hoy en día el diagnóstico prenatal se puede combinar con el diagnóstico preimplantatorio.



**Figura 15.** Diagnóstico prenatal de la ataxia de Friedreich. (A) Árbol genealógico y análisis de marcadores para el diagnóstico prenatal de la descendencia 7 realizado antes de conocerse el gen *FRDA* responsable de la enfermedad; el feto resultó ser portador sano y el embarazo prosiguió su curso normal. (B) Diagnóstico prenatal mediante el análisis directo de la expansión GAA; se muestran los productos de la amplificación por PCR larga y electroforesis en gel de agarosa 0,8% teñido con bromuro de etidio; el hijo enfermo es portador de dos expansiones de tamaño muy similar (una única banda), mientras que en el DNA del feto se observa dos bandas de intensidad desigual, confirmándose el estatus genético de feto homocigoto afectado. No se continuó el embarazo.

### **3.2. Diagnóstico molecular y consejo genético de las ataxias espinocerebelosas**

El análisis molecular de los genes SCA lo hemos aplicado a una serie de 198 individuos afectados pertenecientes a 152 familias con diagnóstico clínico de ataxia espinocerebelosa. Además, determinamos los alelos normales y las frecuencias alélicas de cada uno de los genes en la población normal española. El análisis nos ha permitido demostrar que el gen *SCA3* es el más prevalente en nuestra población, seguido de los genes *SCA2* y *SCA6*. *SCA8* y *SCA7* son más raros, mientras que no hemos encontrado ninguna familia ni ningún paciente con expansión en los genes *SCA1*, *SCA10*, *SCA12* o *SCA17*. Tampoco encontramos ningún caso de atrofia dentatorrubro-palidolusiana, un trastorno degenerativo que se confunde frecuentemente con una ataxia tardía (tabla 4) (García Planells, Tesis Doctoral, 2003). El estudio de los genes *SCA* nos ha permitido aplicar el diagnóstico molecular para caracterizar los aspectos fenotípicos de las distintas formas clínicas de las ataxias espinocerebelosas en colaboración con investigadores clínicos (Arpa et al. 1999; Arpa et al. 2000; Villanueva-Haba et al. 2001). La otra área fundamental de aplicación de las pruebas genéticas ha sido el consejo genético de estas enfermedades dominantes, incluyendo el análisis genético presintomático en el marco del programa de diagnóstico presintomático del H. U. La Fe, puesto inicialmente en marcha para la enfermedad de Huntington (ver más adelante).

En las enfermedades autosómicas dominantes el riesgo de transmisión de la mutación es del 50 por cien en cada gestación. Así pues, el riesgo de recurrencia de la enfermedad en una determinada familia es del 50 por cien. Esto hace que sea fundamental conocer la patología molecular en cada paciente y en cada familia para ofrecer un asesoramiento genético apropiado y las posibles alternativas clínicas y terapéuticas. Entre estas cabe reseñar el diagnóstico prenatal (siempre en el contexto de la bioética para enfermedades neurodegenerativas de inicio en el adulto) y, sobre todo, el mencionado diagnóstico presintomático a familiares de primer grado sanos, con un riesgo *a priori* de desarrollar la enfermedad del 50 por cien.

*Tabla 4. Casos positivos para la mutación (% del total).*

<b>Locus</b>	<b>Casos familiares</b>	<b>Casos no familiares</b>	<b>TOTAL</b>
<b>SCA1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>SCA2</b>	<b>10 (17,5 %)</b>	<b>1 (33,3 %)</b>	<b>11 (18,3%)</b>
<b>SCA3</b>	<b>18 (31,6 %)</b>	<b>1 (33,3 %)</b>	<b>19 (31,7 %)</b>
<b>SCA6*</b>	<b>17 (29,8 %)</b>	<b>1 (33,3 %)</b>	<b>18 (30,0 %)</b>
<b>SCA7</b>	<b>3 (5,3 %)</b>	<b>0</b>	<b>3 (5,0 %)</b>
<b>SCA8</b>	<b>9 (15,8 %)</b>	<b>0</b>	<b>9 (15,0 %)</b>
<b>SCA12</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>SCA17</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>DRPLA</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>TOTAL</b>	<b>57</b>	<b>3</b>	<b>60</b>

\* La alta frecuencia de SCA6 se debe fundamentalmente a la familia SRB antes mencionada que agrupa un total de 13 enfermos.

#### **4. PERSPECTIVAS TERAPÉUTICAS**

El objeto último de la investigación biomédica es obtener y ofrecer a los enfermos y a la población nuevas herramientas terapéuticas que permitan mejorar la salud de las personas y prevenir el desarrollo de enfermedades. La genética ha tenido mucho que decir en las últimas décadas en el terreno de las enfermedades hereditarias, tanto por lo que respecta a la comprensión de las causas y mecanismos de producción de la enfermedad, fundamentalmente describiendo los genes mutantes y las proteínas codificadas por estos genes, como por la prevención de la enfermedad, mediante el consejo genético, en el contexto de la familia y en el contexto de la población. La transformación de este conocimiento en el desarrollo de nuevas terapias eficaces es mucho más lenta que la propia investigación genética y fisiopatológica y, sin embargo, éste es el punto de inflexión médico y social que tanto científicos, profesionales sanitarios y pacientes desean alcanzar.

Desde hace varios años, en nuestro grupo venimos trabajando en la fisiopatología del déficit de frataxina empleando modelos celulares y animales, como son la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Los resultados parciales que hemos ido obteniendo se han presentado en congresos nacionales de la sociedades de Genética, Bioquímica y Biología Molecular y Neurología, y en congresos y reuniones internacionales de la Sociedad Europea de Genética Humana y de *C. elegans*.

En el laboratorio hemos obtenido un modelo de déficit de frataxina en *C. elegans* empleando la técnica de interferencia de RNA (RNAi) (Vázquez-Manrique et al. manuscrito en preparación) y hemos estudiado con qué proteínas interacciona la frataxina en las mitocondrias, donde ejerce su función tanto en levadura como el organismo superiores incluido el hombre. Los trabajos han finalizado hace pocas semanas y disponemos de resultados que nos permiten afirmar con rotundidad que la frataxina realiza su función en la cadena respiratoria mitocondrial, participando en el proceso de la fosforilación oxidativa (González-Cabo et al. manuscrito en preparación). El hallazgo es fundamental para la comprensión de la patogenia celular de la enfermedad, pero es aún más interesante el hecho de que nos ofrece datos acerca de posibles fármacos útiles para el tratamiento de la enfermedad. Alguno de estos fármacos ha dado resultados positivos en el análisis de mutantes de *S. cerevisiae* de los genes que interactúan con frataxina, mejorando el crecimiento celular de estas cepas mutantes. Esto abre una puerta clara para iniciar ensayos clínicos inmediatos.

## **5. CONCLUSIONES**

De todo lo que se ha venido exponiendo y comentando anteriormente se infiere que las ataxias hereditarias son un grupo heterogéneo de enfermedades neurodegenerativas con una amplia heterogeneidad genética. Esto es especialmente cierto para la formas autosómicas dominantes (ADCA) y, en concreto, para las ataxias espinocerebelosas. También las formas autosómicas recesivas (ARCA) muestran un amplio número de entidades clínicas; sin embargo, en este grupo de trastornos la forma más frecuente y de mayor relevancia clínica y social es la ataxia de Friedreich y para ella hay homogeneidad genética, si bien se ha descrito un segundo locus muy raro. En este contexto, las conclusiones de las investigaciones genéticas y aplicaciones clínicas las ataxias hereditarias que se hemos presentado se pueden resumir del siguiente modo:

- La ataxia de Friedreich está causada por mutaciones en el gen *FRDA* en el cromosoma 9q13, siendo la mutación por expansión del trinucleótido GAA la más prevalente.
- La expansión GAA es una mutación dinámica, la única asociada a una enfermedad autosómica recesiva, que tiene un comportamiento particular durante la transmisión meiótica.
- La expansión GAA apareció en la población española a partir de pocos sucesos mutacionales.

- Los fenotipos clínicos FARR y LOFA son variantes de la ataxia de Friedreich y no representan heterogeneidad genética.
- Las ataxias espinocerebelosas del adulto muestran una gran heterogeneidad genética en la población española. La mayoría de las formas clínicas se deben a expansiones una secuencia en tándem repetida en diversos genes. Hemos podido detectar la mutación en aproximadamente el 50 por cien de las familias, siendo la forma más prevalente la denominada SCA3 o enfermedad de Machado-Joseph.
- El análisis molecular de los genes asociados a ataxias es fundamental para establecer un diagnóstico clínico correcto. Las mutaciones dinámicas son marcadores biológicos imprescindibles en la práctica clínica.
- El consejo genético de las ataxias hereditarias es una herramienta clínica de primer orden para los pacientes y las familias que se ha visto favorecido por la disponibilidad del diagnóstico molecular y su aplicación en el diagnóstico prenatal, el diagnóstico presintomático y otras formas de diagnóstico genético.

## **6. PUBLICACIONES**

### **Ataxia de Friedreich**

#### **Clonación posicional y aislamiento del gen de la ataxia de Friedreich, *FRDA* (X25)**

- Campuzano V., L. Montermini, M.D. Moltó, L. Pianese, M. Cossée, F. Cavalcanti, **E. Monrós**, F. Rodius, F. Duclos, A. Monticelli, F. Zara, J. Cañizares, H. Koutnikova, S.I. Bidichandi, C. Gellera, A. Brice, P. Trouillas, G. De Michele, A. Filla, R. de Frutos, **F. Palau**, P.I. Patel, S. Di Donato, J.-L. Mandel, S. Cocozza, M. Koenig, M. Pandolfo. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 1996; 271: 1423-142.
- Chamberlain S., M. Farrall, J. Shaw, D. Wilkes, J. Carvajal, R. Hillerman, K. Doudney, A. E. Harding, R. Williamson, G. Sirugo, R. Fujita, M. Koenig, J.L. Mandel, **F. Palau**, **E. Monrós**, J. Vilchez, **F. Prieto**, A. Richter, M. Vanesse, S. Melançon, S. Cocozza, E. Redolfi, F. Cavalcanti, L. Pianese, A. Filla, S. DiDonato, M. Pandolfo. Genetic recombination events which position the Friedreich ataxia locus proximal to the D9S15/D9S5 linkage group on chromosome 9q. *Am J Hum Genet* 1993a; 52: 99-109.
- Chamberlain S., M. Koenig, A. Richter, **F. Palau**, M. Pandolfo. Molecular Analysis of the Friedreich's ataxia locus. En: *Inherited Ataxias. Advances in Neurology* vol. 61. A. E. Harding, Th. Duefel eds., Raven Press, New York, 1993b, pp 193-204.

- **Monrós E.**, J. Cañizares, M.D. Moltó, M. Pandolfo, R. de Frutos, **F. Prieto**, J. Vilchez, **F. Palau**. Homozygosity mapping places the Friedreich's ataxia gene to chromosome 9 centromere. *Eur J Hum Genet* 1994; 2: 291-299.
- Montermini L., F. Rodius, L. Pianese, MD Moltó, M. Cossée, V. Campuzano, F. Cavalcanti, A. Monticelli, **F. Palau**, G. Gyapay, M. Wenhert, F. Zara, P.I. Patel, S. Coccozza, M. Koenig, M. Pandolfo. The Friedreich's ataxia critical region spans a 150-kb interval on chromosome 9q13. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 1061-1067.
- **Palau F.**, J. Vilchez, M. Beneyto, J. Lopez-Arlandis, L. Badía, F. Martinez-Castellano, **F. Prieto**. Análisis genético de la ataxia de Friedreich utilizando marcadores de ADN polimórficos. *Med Clin (Barc)* 1990; 94: 651-654.
- **Palau F.**, J. Lopez-Arlandis, **E. Monrós**, J. Vilchez, **F. Prieto**. Genetics of Friedreich's ataxia in the Spanish population. En: *Handbook of Cerebellar Diseases*. R. Lechtenberg ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1993, pp. 459-462.
- **Palau F.** El gen de la ataxia de Friedreich: un hito para la neurología y para la genética humana. *Neurología* 1996; 11:163-165.
- **Smeyers P.**, **E. Monrós**, J. Vílchez, J. Lopez Arlandis, **F. Prieto**, **F. Palau**. A family segregating Friedreich ataxia phenotype is not linked to the FRDA locus. *Hum Genet* 1996; 97:824-828.

#### **Genética poblacional de la ataxia de Friedreich**

- **Monrós E.**, J. Cañizares, M.D. Moltó, F. Rodius, L. Montermini, M. Cossée, F. Martínez, **F. Prieto**, R. de Frutos, M. Koenig, M. Pandolfo, J. Bertranpetit, **F. Palau**. Evidence for a common origin of most Friedreich ataxia chromosomes in the Spanish population. *Eur J Hum Genet* 1996; 4:191-198.

#### **Expansión GAA y patología molecular de la ataxia de Friedreich**

- **De Castro M.**, **J. García-Planells**, **E. Monrós**, **R. Vázquez-Manrique**, J.J. Vílchez, M. Urtasun, M. Lucas, G. Navarro, G. Izquierdo, **F. Palau**. Genotype and phenotype analysis of Friedreich's ataxia compound heterozygous patients. *Hum Genet* 2000; 106: 86-92.
- González-Cabo P., M.I. Sánchez, J. Cañizares, J.M. Blanca, R. Martínez-Arias, **M. De Castro**, J. Bertranpetit, **F. Palau**, M.D. Moltó, R. de Frutos. Incipient GAA repeats in the primate Friedreich ataxia homologous genes. *Mol Biol Evol* 1999; 16: 880-883.
- **Monrós E.**, M.D. Moltó, F. Martínez, J. Cañizares, J. Blanca, **F. Prieto**, R. de Frutos, **F. Palau**. Phenotype correlation and intergenerational dynamics of the Friedreich ataxia GAA trinucleotide repeat. *Am J Hum Genet* 1997; 61:101-110.

#### **Fenotipos clínicos y homogeneidad genética**

- Berciano J., O. Combarros, **M. De Castro**, **F. Palau**. Intronic GAA triplet repeat expansion in Friedreich's ataxia presenting with pure sensory ataxia. *J Neurol* 1997; 244:390-391.

- Cruz-Martínez A., B. Anciones, **F. Palau**. GAA trinucleotide repeat expansion in variant of Friedreich's ataxia families. *Muscle Nerve* 1997; 20:1121-1126.
- Cruz-Martínez A., **F. Palau**. Inicio tardío y progresión lenta en la ataxia de Friedreich. Estudio clínico, electrofisiológico y de genética molecular. *Rev Neurol (Barc)* 1998;26:844-845.
- **De Castro M., S. Bort, F. Prieto, F. Palau**. Bases moleculares de las ataxias hereditarias y de las neuropatías sensitivo-motoras hereditarias en la edad pediátrica. *An Esp Pediatr* 1997; 101 (supl.):9-24.  
[Premio Ordesa de Investigación Pediátrica 1997]
- Martin J.J., L. Martin, A. Löfgren, M. D'Hooghe, K. Storm, W. Balemans, **F. Palau**, C. Van Broeckhoven. Classical Friedreich's ataxia and its genotype. *Eur Neurol* 1999; 42: 109-115.
- **Palau F.**, G. de Michele, J. Vilchez, M. Pandolfo, **E. Monrós**, S. Cocozza, **P. Smeyers**, J. Lopez Arlandis, G. Campanella, S. DiDonato, A. Filla. Friedreich's ataxia with retained lower tendon reflexes maps to the FRDA locus on chromosome 9q. *Ann Neurol* 1995; 104: 648-652.

#### **Diagnóstico genético de la ataxia de Friedreich**

- **De Castro M.**, A. Cruz-Martínez, J.J. Vilchez, T. Sevilla, M. Pineda, J. Berciano, **F. Palau**. Early onset cerebellar ataxia and preservation of tendon reflexes: clinical phenotypes associated with GAA trinucleotide repeat expanded and non-expanded genotypes. *J Periph Nerv System* 1999; 4:1-45.
- **Monrós E., P. Smeyers**, M.A. Ramos, **F. Prieto, F. Palau**. Prenatal diagnosis of Friedreich ataxia: improved accuracy by using new genetic flanking markers. *Pren Diagn* 1995; 15: 551-554.
- **Palau F., E. Monrós, F. Prieto**, J. Vilchez, J.M. Lopez-Arlandis. Genetic diagnosis of Friedreich's ataxia. *Lancet* 1991; 338: 1087.

#### **Revisiones**

- **Palau F.** Friedreich's ataxia and frataxin: molecular genetics, evolution and pathogenesis (Review). *Int J Mol Med* 2001; 7:581-589.
- **Palau F., R. Vázquez-Manrique, P. González-Cabo**. Ataxia de Friedreich: un trastorno mitocondrial. *Actualiz Neurol Neurocién Envej* 2003;7:430-435.
- **Palau F.** Autosomal recessive cerebellar ataxias. *Orphanet Encyclopedia*, September 2003. <http://orpha.net/data/patho/GB/uk-ARCA.pdf>

#### **Tesis Doctorales**

- **Genética Molecular Clínica de la Ataxia de Friedreich**  
Patricia Smeyers Durà  
Universitat de València, Facultad de Medicina, Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública



1995 Apto *cum laude* y premio extraordinario de doctorado; premio Mejor Tesis Doctoral, I Centenario Colegios de Médicos de Valencia

- **Estudi Genètic de l'Atàxia de Friedreich: Cartografiat fi del Locus FRDA i Anàlisi de Mutacions del Gen X25**

Eugènia Monrós i Marin

Universitat de València, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Genética

Apto *cum laude* y premio extraordinario de doctorado

- **Análisis molecular de la región crítica del gen FRDA y caracterización de su homólogo en *Drosophila***

Joaquín Cañizares Sales

Universitat de València, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Genética

1998 Apto *cum laude*

- **Expresión génica y biología celular de la frataxina en *Caenorhabditis elegans***

Rafael Vázquez Manrique

Universitat de València, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Genética

2003 Sobresaliente *cum laude*

## Ataxias cerebelosas autosómicas dominantes

### Ataxias espinocerebelosas del adulto

- Arpa J., **A. Cuesta**, A. Cruz-Martínez, S. Santiago, J. Sarriá, **F. Palau**. Clinical and genetic analyses of a Spanish family with spinocerebellar ataxia 6 (SCA6). *Acta Neurol Scand* 1999;99:43-47.
- Arpa J., **J. García-Planells**, R. Soler, A. Cruz Martínez, M.J. Sarriá Lucas, R. López-Pajares, M. Gutierrez Molina, S. Santiago, **F. Palau**. Spanish family with Machado-Joseph disease: neurophysiological features and neuropathy study. *Neurología* 2000; 15: 213-221.
- **García-Planells J., A. Cuesta, J.J. Vílchez, F. Martínez, F. Prieto, F. Palau**. Genetics of the SCA6 gene in a large family segregating an autosomal dominant 'pure' cerebellar ataxia. *J Med Genet* 1999; 36: 148-151.
- Villanueva-Haba V.E., M Garcés-Sánchez, L. Bataller, **F. Palau, J.J Vílchez**. Estudio de neuroimagen con análisis morfométrico de las ataxias hereditarias e idiopáticas. *Neurología* 2001; 16: 105-111

### Ataxias episódicas

- Gómez-Gosálvez F., P. Smeyers, P. Escrivá, F. Clemente F, J. Mallada, F. Mulas, **F. Palau**, E. Millet. Ataxia periódica familiar com mioquimia sensible a acetazolamida: presentación de una familia. *Rev Neurol [Barc]* 1997;25:1925-1927

## Revisiones

- **Palau F., M. De Castro, A. Cuesta, J. García Planells.** Genética de las ataxias hereditarias. En: *Diagnóstico Molecular en Genética Médica*. M. Lucas ed. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, 1998, pp. 133-154.
- **Palau F.** Mutaciones dinámicas y enfermedad. *Medicine* 1999; 7: 6507-6514.
- **Palau F., R. Gandia.** Degeneraciones espinales y espinocerebelosas. En: *Neurología Extrahospitalaria*. A. Alayón ed., Grupo Aula Médica, 2004, pp. 961-974.

## Tesis Doctorales

### **Genética y epidemiología de las mutaciones dinámicas producidas por la expansión del trinucleótido CAG**

Javier García Planells

Universitat de València, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Genética  
2003 Sobresaliente *cum laude*



## **CAPÍTULO II**

### **NEUROPATÍAS PERIFÉRICAS HEREDITARIAS**

#### **1. INTRODUCCIÓN**

Las neuropatías periféricas hereditarias son trastornos que afectan a los nervios periféricos y se clasifican en neuropatías sensitivo-motoras hereditarias (NSMH), neuropatías sensitivas hereditarias (NSH) y neuropatías sensitivas y autonómicas hereditarias (NSAH). Las formas que afectan tanto a los nervios motores como a los sensitivos o NSMH son las más frecuentes, con una prevalencia en nuestro país de 28 cada 100.000 habitantes. En el conjunto de las NSMH se distingue cuatro fenotipos: la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT), la neuropatía de Déjérine-Sottas (DS), la neuropatía con hipomielinización congénita (CH) y la neuropatía con susceptibilidad a la parálisis por presión (HNPP). La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth es de todas ellas la forma más común de neuropatía periférica hereditaria y se corresponde con el síndrome clásico de atrofia peroneal descrito por Charcot y Marie en París y Tooth en Londres en 1886.

La fisiopatología de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth es compleja. En base a criterios electrofisiológicos e histopatológicos la neuropatía CMT se clasifica en dos grandes grupos: 1) formas CMT desmielinizantes o CMT1 que afectan primariamente a la mielina y 2) formas CMT axonales o CMT2 en las que la lesión primaria está en el axón neuronal. Las formas CMT1 se reconocen por que los enfermos muestran velocidades de conducción nerviosa disminuidas y procesos de desmielinización y remielinización ("bulbos de cebolla") en la biopsia de nervio. Por el contrario, los pacientes con formas CMT2 tienen velocidades de conducción normales o sólo algo reducidas y pérdida importante del número de axones en los corte histológicos. Sobre esta heterogeneidad fisiopatológica, la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth muestra una gran heterogénea genética. Se reconocen los patrones mendelianos clásicos, autosómico dominante –el más frecuente–, autosómico recesivo y ligado al cromosoma X. Hasta el momento actual se han descrito más de 20 genes y más de 30 loci asociados a la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth y otras neuropatías relacionadas (Palau et al. 2002; Baiget et al. 2004).

La primera localización de un gen asociado a la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth se hizo en 1983 mediante análisis de ligamiento, definiéndose el locus CMT1B en el cro-

mosoma 1. Sin embargo, no fue hasta 1991 cuando se encontró la primera mutación que causa la enfermedad, la duplicación de 1,5 megabases (Mb) en el cromosoma 17p11.2 que causa la forma CMT1A (MIM 118220), de herencia autosómica dominante. La duplicación CMT1A es la mutación más prevalente en el conjunto de las neuropatías hereditarias y se encuentra en el 60-70 por cien de los enfermos. En la región genómica de 1,5 Mb se encuentra el gen *PMP22* el cual es el responsable de la enfermedad por un efecto de dosis génica. Se han descrito algunas mutaciones puntuales en el gen *PMP22* que también producen la enfermedad o formas más graves como la neuropatía DS. El resto de la patología molecular se distribuye, tal como se ha mencionado, en más de 20 genes. De estos tienen importancia clínica por su relativa frecuencia el gen *GJB1* que codifica la proteína conexina 32 y causa la forma CMTX, ligada al X, y es responsable del 10 por cien de los casos de CMT, y el gen *MPZ* que codifica la proteína más frecuente en la mielina del sistema nervioso periférico, P<sub>0</sub>, y causa el 3-4 por cien de la patología molecular de estos enfermos (Bort et al. 1997a; Palau y Bort 1997). El resto de genes descritos afecta un porcentaje menor de conjunto de familias con estas neuropatías periféricas hereditarias.

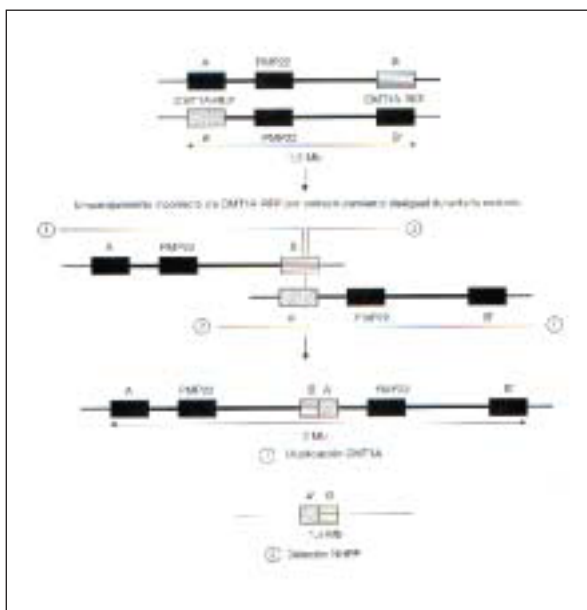
Esta gran variabilidad clínica y genética, incluyendo los diferentes patrones de herencia que se observa, hace que el diagnóstico y el consejo genético sean fundamentales en el manejo clínico de los pacientes y de las familias afectadas por neuropatías hereditarias. Ambos, diagnóstico y consejo, se apoyan hoy en día en la investigación genética de familias amplias en las que segregan las distintas variantes clínicas. En nuestros trabajos, realizados durante los últimos doce años, hemos orientado las investigaciones en tres áreas, a saber: 1) origen genético de la duplicación CMT1A en las células germinales humanas; 2) análisis de los genes más prevalentes y patología molecular de las neuropatías periféricas en familias españolas; y 3) aislamiento y caracterización del gen responsable de la forma grave CMT4A. Además, en este tiempo se ha aplicado el análisis molecular en el diagnóstico de las neuropatías y el consejo genético.

## **2. HALLAZGOS Y CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS**

### **2.1. Mecanismos genéticos de los reordenamientos genómicos en el cromosoma 17p11.2: duplicación CMT1A y delección HNPP**

La duplicación de 1,5 Mb en la región cromosómica 17p11.2 es la mutación principal que causa neuropatía CMT tanto autosómica dominante como en casos esporádicos, sin

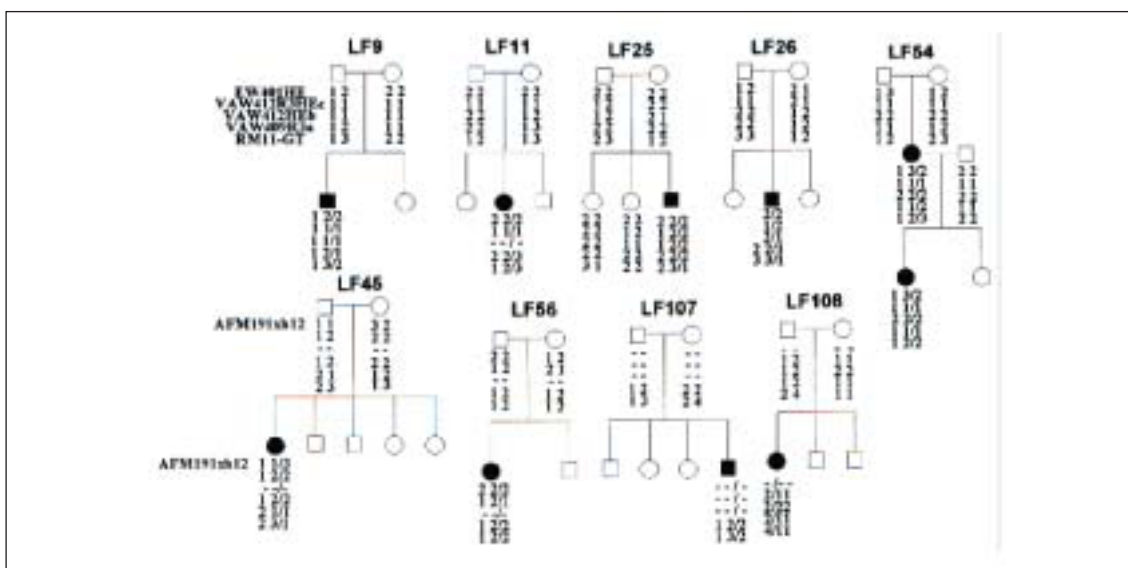
antecedentes familiares. En 1991 se había postulado que el origen de la duplicación era independiente para cada familia. Así, en cada una de ellas, la enfermedad habría aparecido con un caso *de novo* esporádico y a partir de éste se habría transmitido a la sucesivas generaciones con carácter dominante. El mecanismo genético que se había postulado era el entrecruzamiento desigual entre cromátides durante la meiosis (Fig. 16). En 1993 se demostró que el producto recíproco del entrecruzamiento, esto es, una deleción, era la causa de otro tipo de neuropatía desmielinizante, la neuropatía hereditaria con susceptibilidad a la parálisis por presión (HNPP) (MIM 162500).



**Figura 16.** Mecanismo de producción de la duplicación CMT1A de 1,5 Mb que incluye el gen PMP22. Se representan dos cromátides no hermanas, cada una flanqueada por los elementos CMT1A-REP proximal (A y Aφ) y distal (B y Bφ). Si se produce durante la meiosis un entrecruzamiento desigual por similitud entre los elementos REP, como se indica en la figura entre B y Aφ, se producen dos productos en sendos gametos, una duplicación (1) y una deleción (2). La fecundación del gameto con duplicación con un gameto normal dará lugar a un individuo con la neuropatía CMT1, mientras que la fecundación de un gameto normal por el gameto portador de la deleción dará lugar a un individuo con otra neuropatía, la neuropatía hereditaria con susceptibilidad a la parálisis por presión (HNPP).

En 1992 nos propusimos estudiar la genética de la duplicación CMT1A en casos en los que se había originado como una nueva mutación y, además, confirmar las hipótesis sobre los mecanismos de producción que se había postulado. Para ello, investigamos el origen parental (del padre o de la madre) en una serie de nueve casos genéticamente esporádicos de CMT1 en los que habíamos determinado previamente la presencia de la duplicación *de novo*. Cuatro de ellos eran españoles y cinco belgas. El análisis se hizo

empleando los marcadores polimórficos EW401HE (locus D17S61), VAW412R3HE c y b (locus D17S125), VAW409R3a y RM11-GT (locus D17S122). El análisis de los haplotipos nos demostró que en todos los casos la duplicación se había producido en la espermatogénesis paterna mediante un entrecruzamiento desigual entre cromátides no hermanas de los cromosomas 17 durante la meiosis (Palau et al. 1993). En estudios posteriores ampliamos la serie de casos esporádicos con duplicación y encontramos una duplicación de novo producida en la ovogénesis materna en la familia LF108. La proporción origen masculino versus femenino era de 8:1 (Bort et al. 1997) (Fig. 17).

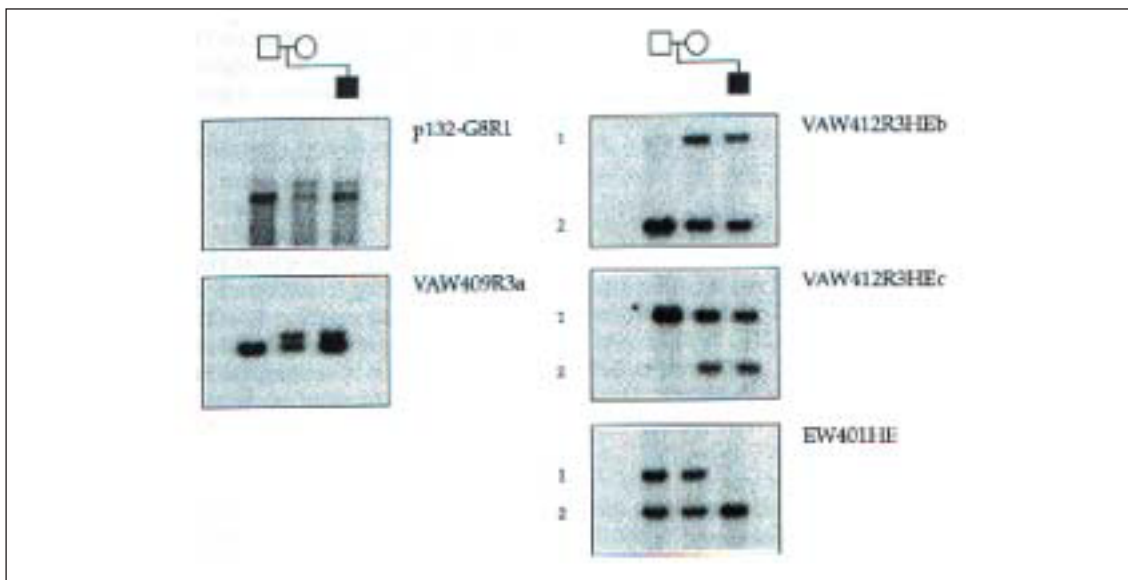


**Figura 17.** Árboles genealógicos de las familias con duplicación CMT1A de novo identificadas a partir de 75 familias no emparentadas. Se muestran los genotipos de cada marcador y los haplotipos construidos. En cada uno de los enfermos (cuadrado o círculo oscuros) se aprecia tres alelos para cada marcador, lo que pone de manifiesto la presencia de la duplicación. Los dos alelos ubicados en la duplicación se indican juntos a un lado de la línea oblicua. Se observa que los alelos duplicados proceden del padre en todos los casos excepto en la familia LF108 en que proceden de la madre.

La región de 1,5 Mb está flanqueada por dos secuencias con una similitud del 98%, los elementos CMT1A-REP. Estos elementos se alienan incorrectamente y provocan el fenómeno referido de entrecruzamiento desigual durante la meiosis. En principio este hecho debería ocurrir por igual en meiosis masculinas y femeninas; sin embargo, tal como habíamos demostrado, ocurría mayoritariamente en meiosis masculinas, lo cual sugería que o bien el mal alineamiento es más frecuente en meiosis masculinas, o bien las duplicaciones de origen paterno son más estables que las de origen materno.

Desde el punto de vista genómico y mecánico encontramos un caso que merecía un comentario aparte. En el paciente de la familia LF26, la duplicación era de un tamaño más pequeño. El análisis del marcador VAW409R3a indicaba claramente que el pacien-

te era portador de tres alelos, confirmado también por el análisis del gen PMP22 mediante la sonda p132-G8R1, pero el análisis con los otros marcadores ponía en evidencia que la duplicación no se extendía hasta los loci genómicos de estos marcadores (Fig. 18). En ese momento no se pudo demostrar que tamaño tenía la duplicación, pero más tarde pudimos confirmar que era de aproximadamente 800 kb (Meuleman et al. 1997).



**Figura 18.** Análisis de la duplicación en la familia LF26. Se muestra el análisis de Southern de cinco polimorfismos tipo RFLP, cuatro ya mencionados en el texto y un quinto localizado en el gen PMP22 y reconocido por la sonda p132-G8R1 tras digestión del DNA con las enzimas HincII y EcoRI. Se observa la presencia de tres cargas alélicas para los marcadores p132-G8R1 y VAW409R3a; por el contrario, el paciente es homocigoto para el marcador EW401HE siendo ambos padres heterocigotos, indicativo de que no hay duplicación del locus. Tampoco se observan tres dosis alélicas en los otros dos marcadores VAW412R3HE b y c.

En un intento de comprender los mecanismos básicos que subyacen a la generación de los mutaciones recíprocas -la duplicación CMT1A y la delección HNPP- durante el entrecruzamiento desigual entre cromátides, colaboramos con el grupo del Dr. E. LeGuern de la unidad INSERM U289 del Hôpital Pitié-Salpêtrière de París con el objetivo de estudiar una serie amplia de 63 casos esporádicos *de novo*. Se pudo observar que si bien la mayoría de duplicaciones se originaban en la espermatogénesis paterna, había un grupo pequeño de duplicaciones que lo hacían en la ovogénesis materna. Sin embargo, un hallazgo fundamental fue que las duplicaciones CMT1A se producían por intercambio desigual entre cromátides no hermanas de cromosomas 17 homólogos; por el contrario, cuando la duplicación era de origen materno, el mecanismo de intercambio desigual se produce entre cromátides hermanas de un mismo cromosoma 17 (Lopes et al. 1998; 1999) (tabla 5). Este último fenómeno es también el más frecuente en la producción de



deleciones. Los entrecruzamientos se producían en una pequeña región menor de 1,7 kb (Lopes et al. 1998) y se podían explicar por un mecanismo de reparación de roturas de doble cadena de DNA, similar al descrito en levaduras (Lopes et al. 1999).

**Tabla 5.** Origen parental y mecanismo cromosómico de producción de 63 reordenamientos (duplicación y deleción) de novo en 17p11.2

Mecanismo	Origen paterno	Origen maternto	Total
Intercromosómico	49 (CMT1A)	5 (CMT1A)	54
Intracromosómico	1 (CMT1A)	6 (4 CMT1A; NHPP)	7
ND	1 (NHPP)	1 (NHPP)	2

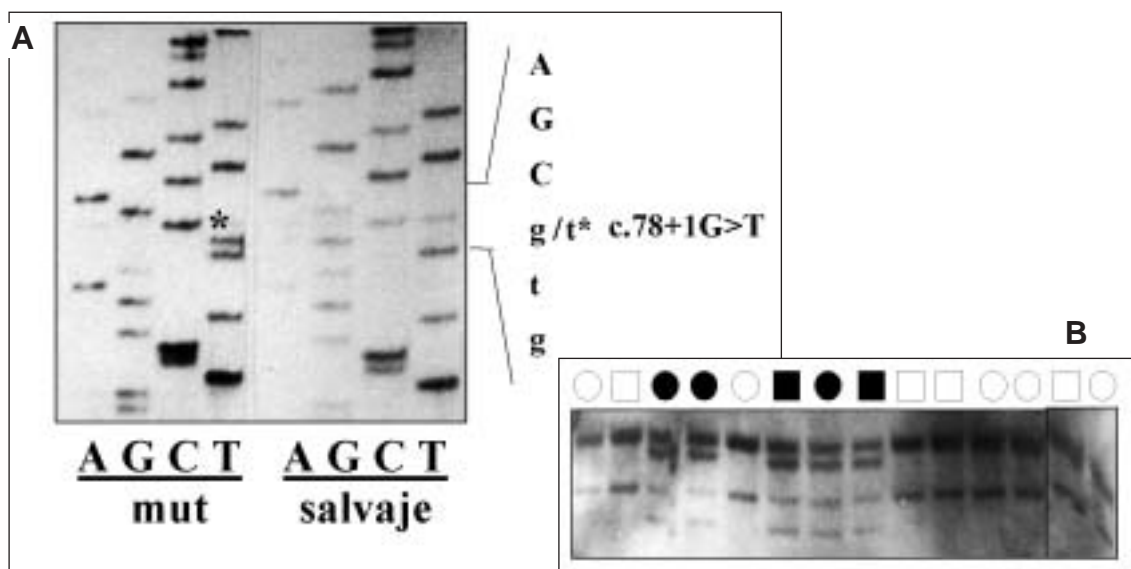
ND = no determinado

## **2.2. Genes y patología molecular de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth y otras neuropatías relacionadas**

A pesar de que la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth y en general las neuropatías hereditarias son trastornos mendelianos, su genética puede considerarse compleja debido a que el número de genes involucrados es muy amplio, habiéndose descrito 22 genes hasta el momento actual. No obstante, la distribución de la patología molecular no es homogénea y hay varios genes muy prevalentes y otros que cuya frecuencia es muy rara (Palau et al. 2002). A mediados de los años noventa del pasado siglo investigamos la patología molecular de una serie consecutiva de 132 familias y casos aislados no emparentados con la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, todos de origen español, con el objetivo de determinar la distribución de los principales genes mutantes en nuestra población y conocer las mutaciones más prevalentes (Palau y Bort 1997). Para ello analizamos sistemáticamente en los enfermos de la serie la duplicación CMT1A y buscamos mutaciones puntuales o pequeñas en los genes *PMP22*, *MPZ* y *GJB1*, que dan lugar a las formas clínicas más comunes, CMT1A (MIM 118220), CMT1B (MIM 118200) y CMTX (MIM 304040), respectivamente. Encontramos que la duplicación era la mutación más frecuente afectando al 68% de las familias (Bort et al. 1995), una cifra muy similar a la obtenida en el conjunto de familias europeas (Nelis et al. 1996). Investigamos la presencia de mutaciones en los genes reseñados obteniendo los siguientes los resultados: las mutaciones en el gen *GJB1*, que codifica la proteína Cx32, se encontraban en 10 familias (7,5%), en el gen *MPZ* se encontraron mutaciones en 5 familias (3,75%) y, finalmente, se encontró una mutación puntual en el gen *PMP22* tan sólo en dos pacientes esporádicos (1,5%) (Bort et

al. 1997, 1998). En su conjunto, se encontró alguna mutación en el 80,75% de los casos, fueran familiares o esporádicos. Restaba aproximadamente un 20 por cien por diagnosticar y tipificar su patología molecular. Este porcentaje es aparentemente bajo con respecto a otras poblaciones, probablemente debido a que en la población española las formas recesivas son raras, mientras que en otras poblaciones éstas formas mendelianas son más frecuentes como consecuencia de una mayor tasa de consanguinidad.

Junto con el estudio de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, también analizamos la patología molecular de la neuropatía hereditaria con susceptibilidad a la parálisis por presión. En una primera serie de 20 familias encontramos en 19 de ellas la delección de 1,5 Mb; sin embargo, tuvimos la oportunidad de analizar una familia relativamente grande en la que se había descartado la delección. El fenotipo clínico de HNPP era típico, por lo que procedimos al análisis de ligamiento con los marcadores del locus CMT1A/HNPP obteniendo un *lod score* de 2,7, sugestivo de ligamiento (es definitivo un valor de 3 o mayor). Ante este resultado, procedimos a analizar el gen PMP22 mediante la técnica de cribado de mutaciones SSCP. Encontramos un patrón anómalo que segregaba con la enfermedad. La secuenciación posterior demostró la presencia de la mutación c.78+1G>T (Fig. 19). Aparentemente, esta mutación producía una "no lectura" del exón 1 ("exon skipping"), lo que podía producir un fenómeno molecular similar a la delección del gen (Bort et al. 1997). Esta mutación era la segunda mutación puntual descrita en la HNPP.



**Figura 19.** Análisis de la mutación c.78+1G>T en la familia LF-HNPP6. (A) Análisis SSCP de cribado de mutaciones en el exón 1 del gen PMP22; se observan dos bandas anormales en los enfermos (cuadrados y círculos oscuros). (B) Secuenciación de DNA del paciente probando, observándose una sustitución de una guanina por una timina (señalado por un asterisco) en el primer nucleótido del sitio donante de splicing en el intrón 1 del gen.

### **2.3. Clonación posicional de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 4A y caracterización del gen *GDAP1***

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 4A (CMT4A, MIM 214400, 607706) es un trastorno de los nervios periféricos motores y sensitivos grave, descrito originalmente en cuatro familias tunecinas con un fenotipo desmielinizante, y el locus localizado en el cromosoma 8q13-q21.1. En 1997 iniciamos un proyecto con el objetivo de localizar e identificar el gen causante de una forma grave de neuropatía CMT que nuestros colaboradores del Servicio de Neurología del H. U. La Fe habían descrito en dos familias (Cuesta A., Tesis Doctoral 2003). La enfermedad se caracterizaba por el inicio muy precoz en la infancia, neuropatía axonal, disfonía por parálisis de cuerdas vocales y herencia autosómica recesiva (Sevilla et al. 2001; 2003).

#### **2.3.1. Análisis de ligamiento y cartografiado del gen**

Como en las dos familias los enfermos eran varones excluimos, en primer lugar, el cromosoma X. Posteriormente, realizamos el análisis de exclusión de los loci CMT que se habían descrito hasta el momento. En este proceso encontramos posible ligamiento, con *lod scores* máximos de 2,01 para los marcadores D8S286 y D8S167, en el locus CMT4A en 8q21.1 (tabla 6; Fig. 20) (Sevilla et al. 2001).

**Tabla 6.** Valores de Lod Score para los marcadores ligados al locus CMT4A en las familias LF 249 y LF20.

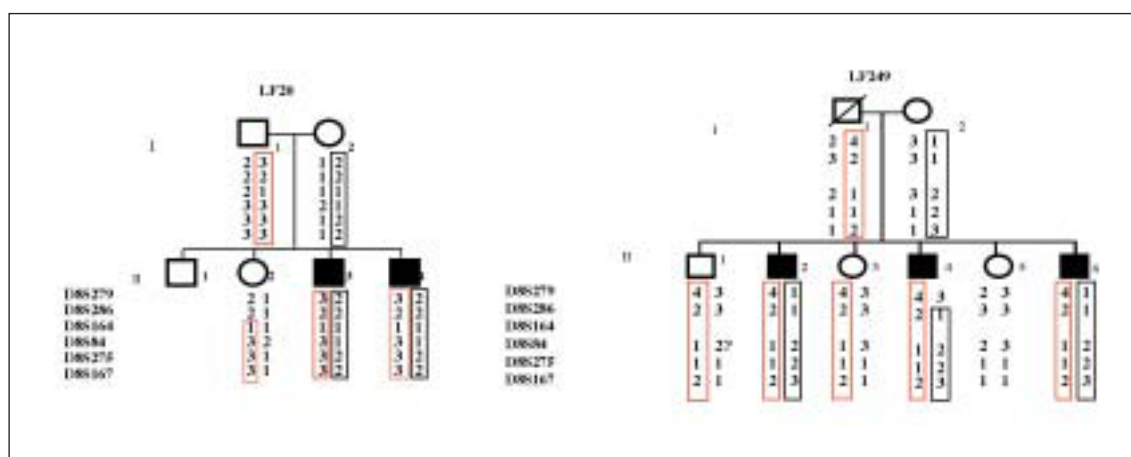
	<b>Lod Score (Z) para las fracciones de recombinación (<math>\theta</math>)</b>					
<b>Marcador</b>	<b>0.00</b>	<b>0.10</b>	<b>0.20</b>	<b>0.30</b>	<b>0.40</b>	
<b>D8S279</b>	$-\infty$	0.82	0.62	0.33	0.10	
<b>D8S286</b>	2.01	1.54	1.04	0.55	0.16	
<b>D8S164</b>	0.97	0.71	0.46	0.22	0.07	
<b>D8S84</b>	$-\infty$	0.60	0.50	0.28	0.09	
<b>D8S275</b>	1.43	1.06	0.71	0.38	0.11	
<b>D8S167</b>	2.01	1.54	1.04	0.55	0.16	

En esta región se encuentra el gen *PMP2* y procedimos a investigar la presencia de mutaciones en los enfermos mediante SSCP y secuenciación directa de los cuatro exones del gen. No encontramos ningún cambio y lo descartamos como gen candidato.

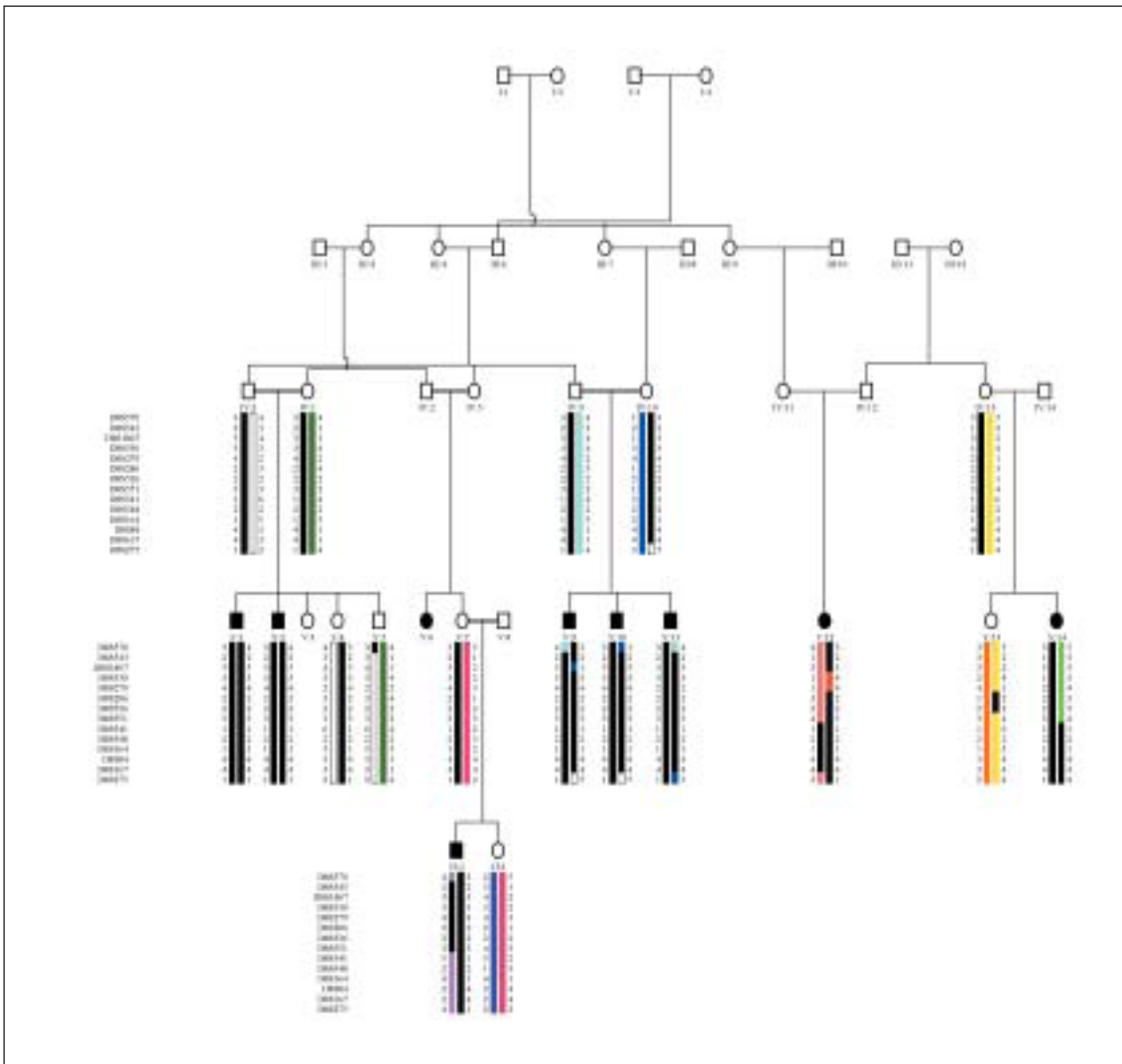
En el año 2000 dispusimos de una nueva familia, esta vez muy grande con varios matrimonios consanguíneos, LF38, con un cuadro clínico muy similar a las dos anteriores. LF38 era la tercera familia con un fenotipo axonal y disfonía en alguno de sus miembros, en la que habíamos realizado la exclusión de la duplicación CMT1A en dos miembros enfermos hacía bastantes años. Cuando volvimos a tener contacto con la familia extendimos el árbol genealógico a 28 individuos con un total de 10 enfermos. El árbol muestra tres parejas consanguíneas entre primos hermanos y otras parejas con sospecha de consanguinidad. Es una familia originaria de un pequeño pueblo de la provincia de León. Para el estudio genético dispusimos de DNA de 9 enfermos y de miembros sanos, incluyendo los padres de los enfermos. El análisis de ligamiento con varios marcadores microsatélites de la región del locus CMT4A dio valores de *lod score* superiores a 3 (tabla 7), confirmándose el ligamiento de una manera definitiva, no sólo para esta familia sino para el conjunto de las tres familias que segregaban un fenotipo CMTAR axonal con disfonía.

**Tabla 7.** Valores de Lod Score para los marcadores ligados al locus CMT4A en la familia LF38

Marcador	<i>Lod Score</i> (Z) para las fracciones de recombinación ( $\theta$ )						
	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
D8S541	4.61	4.52	4.17	3.73	2.80	1.82	0.84
D8S164	3.63	3.6	3.43	3.13	2.40	1.57	0.71
D8S286	4.19	4.11	3.77	3.33	2.44	1.53	0.65
D8S279	3.15	3.08	2.81	2.46	1.75	1.06	0.42



**Figura 20.** Árboles genealógicos y haplotipos de las familias LF20 y LF249 con los marcadores ligados al locus CMT4A. Se observa que los individuos enfermos comparten el mismo haplotipo (indicado mediante un rectángulo rojo) en cada una de las familias.

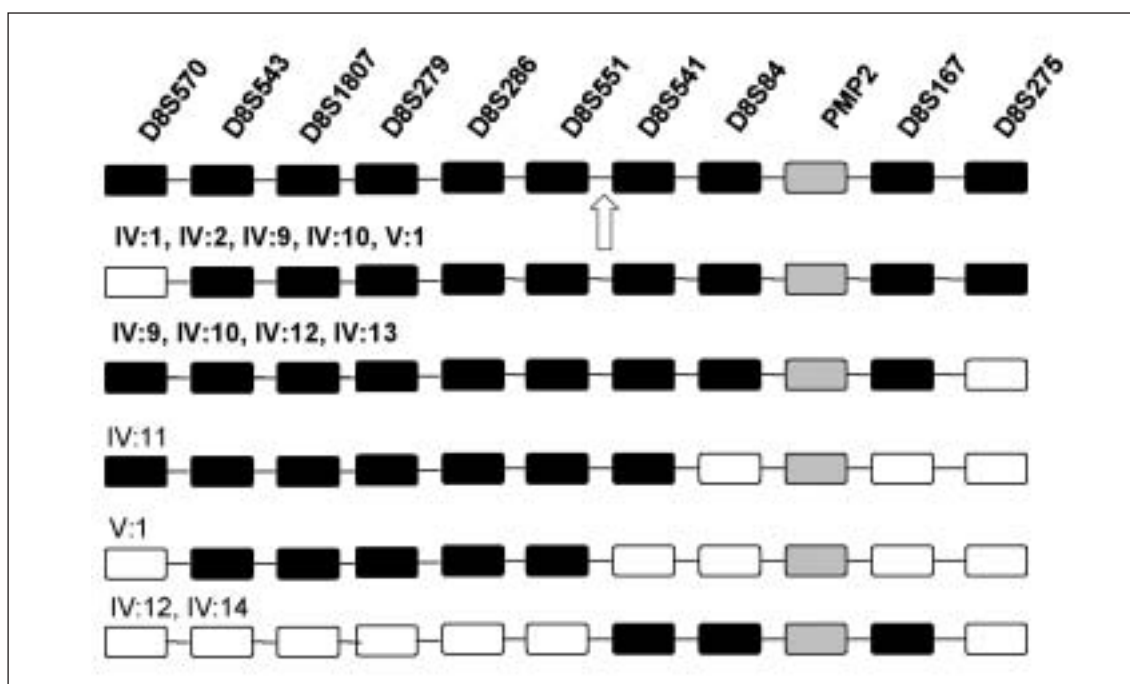


**Figura 21.** *Árbol genealógico y análisis de haplotipos en la familia LF38 utilizando 15 marcadores microsatélites situados en 8q21.1. Las barras negras indican el haplotipo ancestral asociado a la enfermedad. Los colores que aparecen en haplotipos con una parte en negro son indicativos de recombinantes genéticos ancestrales sobre le haplotipo original, en negro, portador de la mutación.*

### 2.3.2. Cartografiado por homocigosidad

La estructura de la familia LF38 nos daba la oportunidad de un nuevo abordaje genético. En enfermedades recesivas de baja frecuencia el cartografiado por homocigosidad en familias consanguíneas constituye una aproximación más útil y eficaz que el análisis de ligamiento a la hora de cartografiar el gen mutante. Esta técnica, como ya mencionamos en el capítulo I, consiste en la búsqueda de grandes zonas de homocigosidad en los individuos afectados nacidos de padres consanguíneos. La pérdida de homocigosidad se interpreta como la presencia de recombinantes genéticos ancestrales, ocurridos en algún momento en generaciones anteriores. Procedimos a saturar la región 8q13-8q21.1 con marcadores microsatélite que cubren una región de 10 centiMorgans (cM) alrededor del

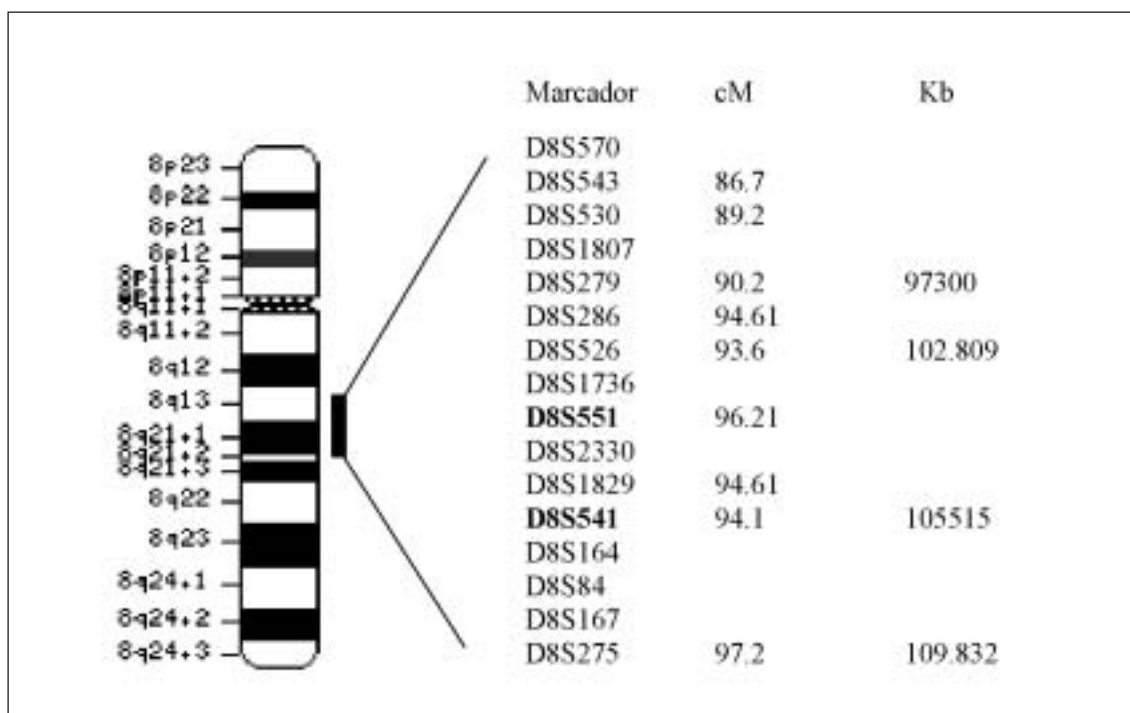
locus CMT4A. En total se analizaron 15 marcadores y se construyeron los haplotipos para estudiar si los individuos enfermos eran homocigotos para estos marcadores y ver en cuál de ellos se perdía la homocigosidad. Los pacientes IV.1, IV.2, IV.9, IV.10 y IV.11 fueron homocigotos para la región comprendida entre D8S543 y D8S164. Sin embargo, observamos pérdida de homocigosidad en el marcador telomérico D8S541 en el paciente V.1 y en el marcador centromérico D8S551 en los pacientes IV.12 y IV. 14. Estos hallazgos permitían reducir la región candidata a la flanqueada por estos dos marcadores, estos es, a 2 cM. El gen *PMP2* quedaba fuera del intervalo crítico definido por los recombinantes, lo que lo descartaba en esta familia (Fig. 22).



**Figura 22.** Diagrama donde se representa los sucesos recombinantes encontrados que reducen la región candidata para la localización del locus asociado a la enfermedad a 2 cM entre los marcadores microsatélites D8S551 y D8S541, según indica la flecha. Se puede observar la pérdida de homocigosidad en el paciente V.1 para el marcador D8S541 mientras que en los pacientes IV.12 y IV.14 se produce para el marcador D8S551.

### 2.3.3. Mapa del genoma humano: mapa físico de marcadores y genes candidatos

Los resultados anteriores nos permitieron reducir el tamaño de la región candidata a un intervalo genético de 0.5-2 cM, flanqueado por el marcador centromérico D8S551 y telomérico D8S541. La región candidata presentaba ya un tamaño adecuado para construir un mapa físico detallado. Iniciamos entonces la caracterización la región mediante el cribado de una genoteca genómica humana clonada en PACs (cromosomas artificiales derivados del fago P1), *RPCII 3-5 human PAC library n° 704*, mediante PCR directa de los marcadores ligados sobre los DNAs de los *pool* primarios.

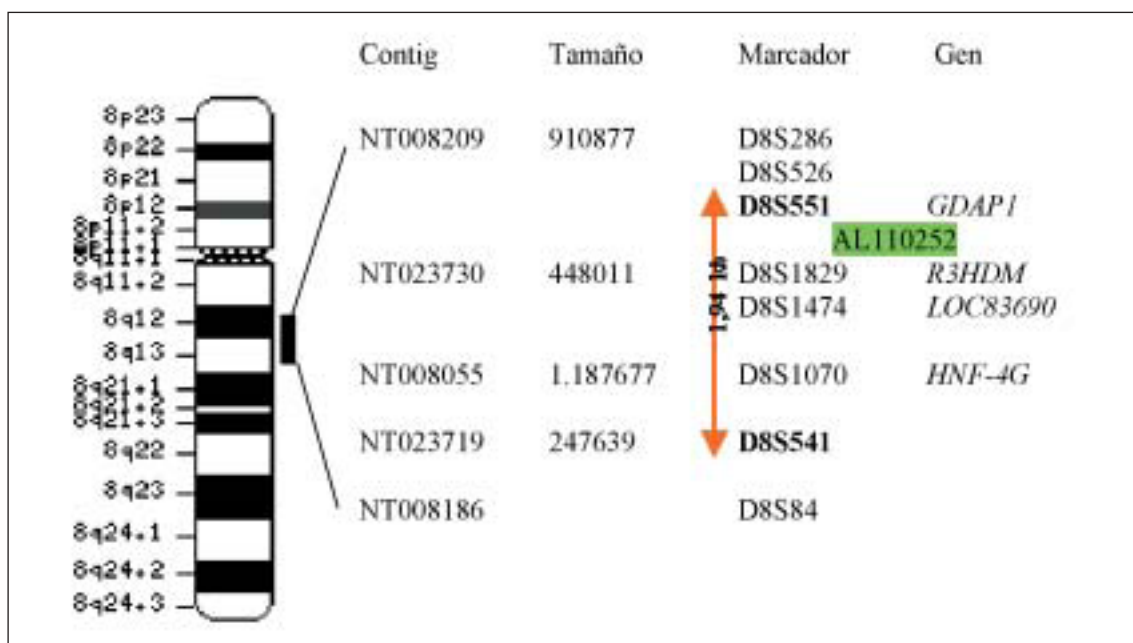


**Figura 23.** Mapa genético anterior a la publicación del Proyecto Genoma Humano donde se encuentran localizados los marcadores microsatélites utilizados en el análisis estadístico de ligamiento y en el cartografiado por homocigosidad en las familias LF20, LF249 y LF38. Fuentes de información: Généthon: <http://www.genethon.fr>; CHLC (Cooperative Human Linkage Center, <http://www.chlc.org> y Genome DataBase, <http://www.gdb.org>.

Por aquel entonces, en febrero de 2001, se hizo público el primer borrador del Proyecto Genoma Humano (PGH). Nos decidimos a realizar una búsqueda electrónica de las secuencias genómicas en las bases de datos del PGH público (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y el *Human Genome Working Draft* (<http://genome.cse.ucsc.edu/>), que contenían los marcadores flanqueantes D8S551 y D8S541. D8S551 está incluido en el contig genómico NT\_008209 de 910.877 pb, y D8S541 está localizado en el contig genómico NT\_23719 de 247.639 pb, en 8q21.1. Entre estos dos contig genómicos hay otros dos contigs más, NT\_023730 de 448.011 pb, que contiene los marcadores D8S1829 y D8S1474, y NT\_008055 de 1.187.677 pb, que no contiene ninguno de los marcadores utilizados en nuestro estudio. Analizando estos datos pudimos determinar la distancia física exacta en la cual estábamos trabajando, que era de 1.939.172 pb, esto es, 1,94 Mb (Fig. 24).

En esos momentos se encontraban cartografiados en este intervalo por anotación genómica 4 genes o transcritos: el gen que codifica para la proteína 1 asociada a la diferenciación inducida por gangliósidos, *GDAP1*; *R3HDM*, un gen que codifica a un inhibidor de la tripsina; *LOC83690*, que codifica para una proteína rica en cisteínas, y el gen *HNF-*

4G, que codifica el factor 4<sup>?</sup> nuclear de hepatocito, un factor de transcripción que se expresa en las células  $\beta$  del páncreas y en otros tejidos. Teniendo en cuenta la posible función y la expresión tisular de los distintos genes, consideramos como primer candidato el gen *GDAP1*. Los criterios que nos sugerían esta posibilidad eran los siguientes (Liu et al. J Neuroscience 1999): 1) *GDAP1*, al igual que otros nueve genes, se sobre-expresaba en un sistema de diferenciación de las células la línea Neuro2a, derivada de un neuroblastoma de ratón, transfectadas con la enzima GD3 sintasa ( $\alpha$ 2,8-sialiltransferasa), la cual juega un papel importante en la biosíntesis de los gangliósidos de las series b y c; 2) el gen homólogo de ratón, *Gdap1*, se expresaba muy fuertemente en cerebro, detectándose un transcrito de 4,1 kb en los experimentos de Northern blot.



**Figura 24.** Mapa físico posterior a la publicación del Proyecto Genoma Humano donde se encuentran ya localizados en 8q13-q21.1 los marcadores microsatélites utilizados en nuestro trabajo. También se muestran los genes descritos en ese momento (15-2-2001) en la región cromosómica. Remarcado en verde aparece la secuencia EST AL110252 que se encuentra localizado 344 pb después del codón de parada del gen *GDAP1*.

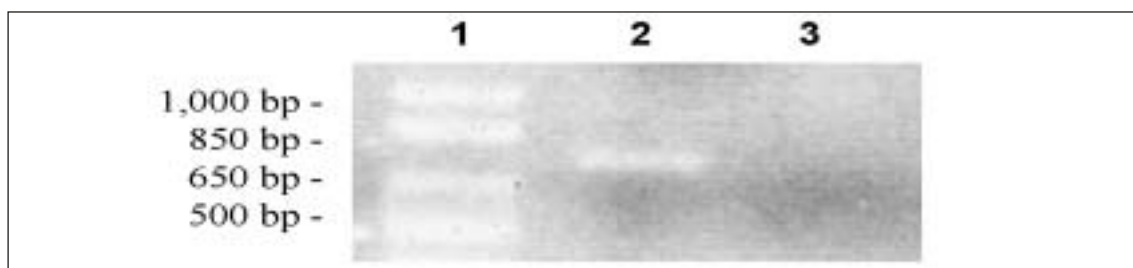
### 2.3.4. Identificación y caracterización del gen *GDAP1* (Cuesta et al. 2002)

#### 2.3.4.1. Obtención del cDNA de *GDAP1*

En la base de datos GenBank, la secuencia de mRNA correspondiente a *GDAP1* (Y17849) es incompleta ya que carece de inicio de la transcripción y de cola poli-A. La secuencia está formada por una ORF de 1077 nt, con sólo siete nt *upstream* del codón de inicio de la traducción, ATG. Por otra parte, todos los ESTs cartografiados identificados como parte del cDNA del *GDAP1* tienen una secuencia 3' truncada y ninguna contiene



la cola poli-A que indica el 3' final del gen (<http://genome.cse.icsc.edu/>). Observamos que un EST de 2505 pb, AL110252, localizado 344 nucleótidos después del codón de parada de GDAP1 contenía varias posibles señales de poliadenilación pero sin ninguna ORF. Nosotros postulamos que esta secuencia podía formar parte del gen. Para demostrarlo, diseñamos unos cebadores, mGDAP5D y mGDAP8R, basándonos en la secuencia del exón 6 y la secuencia del EST AL110252, respectivamente. A partir de cDNA de una genoteca de cerebro humano fetal (Stratagene, California), amplificamos un fragmento de 754 pb, de los cuales 54 pb son parte del exón 6, 360 pb del EST AL110252 y 344 pb de la secuencia genómica existente entre ambos (Fig. 25). Este resultado nos sugería que el EST es una parte del exón 6 no traducida.



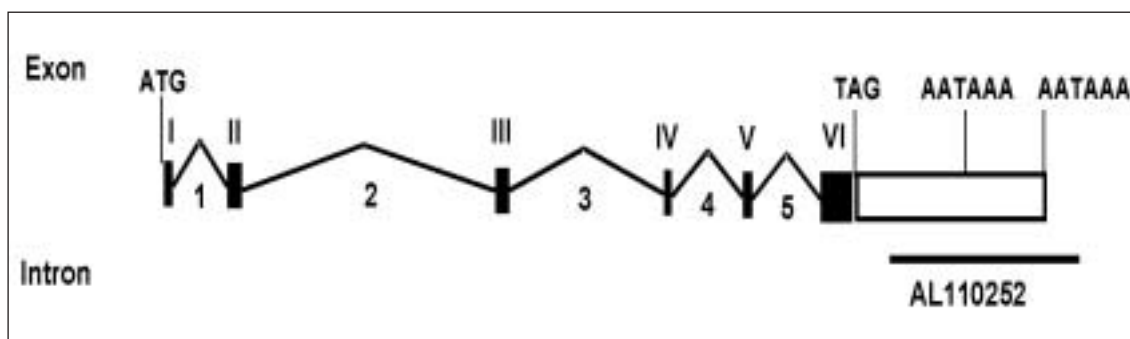
**Figura 25.** Análisis del extremo 3' del gen *GDAP1*. El EST AL110252 localizado 344 nt después del codón de parada de *GDAP1* contiene varias señales de poliadenilación, pero no se detecta ninguna ORF por lo que postulamos que forma parte del cDNA del gen. Línea 1: marcador de DNA de 1Kb plus; Línea 2: Fragmento de 754 pb amplificado a partir de cDNA de una genoteca de cerebro fetal humano el cual incluye 54 pb del exón 6, 360 pb del EST AL110252 y 344 pb de la secuencia genómica existente entre ambos. Línea 3: control negativo de la reacción.

#### 2.3.4.2. Organización genómica del gen *GDAP1*

*GDAP1* se encuentra localizado a 54.216 pb del marcador D8S551 y 1.954.878 pb del marcador D8S541. Se extiende a lo largo de una región genómica de 13.9 Kb de DNA genómico en 8q21.1. La secuencia de *GDAP1* contiene una ORF de 1077 nt y codifica para una proteína de 358 aminoácidos. Para establecer la estructura exón-intrón, comparamos la secuencia del cDNA con la secuencia genómica mediante el programa BLASTn. Confirmamos que la secuencia codificante de *GDAP1* está compuesta por 6 exones y 5 intrones, estando el exón 6 parcialmente traducido (Fig. 26). Con el objetivo de definir las secuencias de los sitios donantes y aceptores de *splicing*, diseñamos cebadores internos de los intrones, amplificando cada uno de los exones y de sus secuencias flanqueantes. En todos los casos se cumplía la regla “GT-AG” de las secuencias consensus de *splicing*. La secuencia de nucleótidos de las uniones de *splicing* y el tamaño de cada exón e intrón aparecen resumidos en la tabla 6. El codón de inicio de la traducción, ATG, se encuentra en el exón 1.

**Tabla 6.** Tamaño en pb de los intrones y exones del gen *GDAP1*. Secuencias de los sitios donantes y aceptores de splicing correspondientes a los exones del gen *GDAP1*.

Exón	pb	Intrón	pb	Sitio aceptor de splicing	Sitio donador de splicing
I	117	1	695		<i>caaaaggtacaaca</i>
II	193	2	8620	<i>tctccaggtgcgc</i>	<i>tggatggtaatggt</i>
III	174	3	1523	<i>tctccaggtgcgc</i>	<i>ttcgtagtatgtaa</i>
IV	95	4	910	<i>attatcaggccaaa</i>	<i>cttaaagtaagcca</i>
V	115	5	115	<i>ttaattagtcaaag</i>	<i>ccccaggtagggtc</i>
VI	382			<i>ctaattagaagagg</i>	



**Figura 26.** Organización genómica del *GDAP1* humano. Estructura del gen en intrones y exones. La secuencia codificante del exón 6 está en negro y la secuencia no codificante está en blanco. Los exones codificantes se representan en cajas negras y los intrones con una línea negra que conecta los exones.

#### 2.3.4.3. Secuencia del gen candidato posicional **GDAP1**

La secuenciación de los seis exones y de los fragmentos amplificados abarcando parte del exón 6 y el EST AL110252 a partir de cDNA de cerebro humano nos proporcionó una secuencia consenso para el gen candidato posicional *GDAP1*. El tamaño del transcrito depende de la señal de poliadenilación que se tenga en cuenta. De hecho, en la secuencia del EST AL110252 y, por ende, en el extremo 3' del cDNA, hay hasta tres señales AATAAA (Fig. 27). Los datos del Northern blot (ver más adelante) indican que dos de estas señales se utilizan realmente en la transcripción fisiológica del gen.

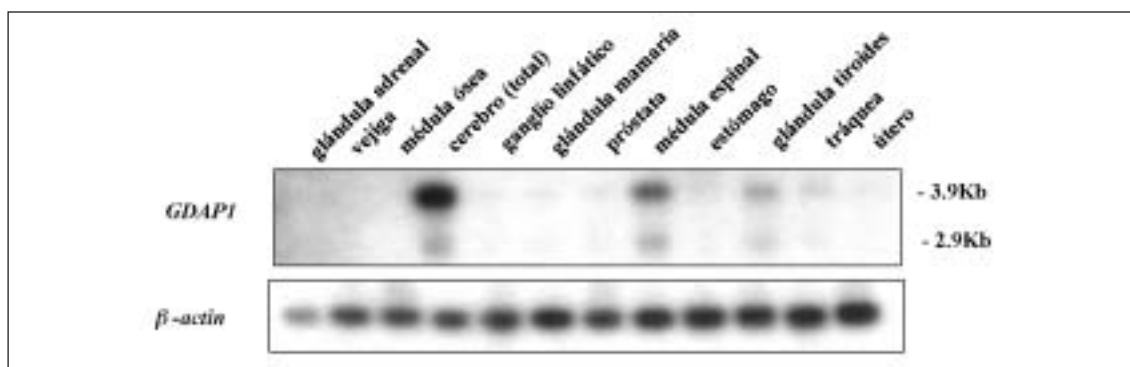
ATGGCTGAGAGGCAGGAAGAGCAGAGAGGGAGCCCGCCCTTGAGGGCGGAAGGCAAGGCC-  
 GACGCGGAGGTTAAGCTCATTCTGTACCATTGGACGCATTTCGTTACGCTCTCAAAAGATGGCTGA-  
 GAGGCAGGAAGAGCAGAGAGGGAGCCCGCCCTTGAGGGCGGAAGGCAAGGCCGACGCGGAGGTTA-  
 AGCTCATTCTGTACCATTGGACGCATTTCGTTACGCTCTCAAAAGGTGCGCTTGGTAATTGCTGAAAAGG-  
 CATTGGAAGTGCAGGAACATGATGTAAGTCTGCCCTTGAGTGAGCACAATGAGCCTTGTT-  
 TATGCGTTTGAACCAACTGGAGAAGTGCCTGTCTTATCCACGGGGAAAACATAATTTGTGAGGC-  
 CACTCAGATCATTGATTATCTTGAACAGACTTTCCTGGATGAAAGAACACCCAGGTTAATGCCTGATAA-  
 AGAAAGCATGTATTACCCACGGGTACAACATTACCGAGAGCTGCTTGACTCCTTGCCAATGGATGCCTA-  
 TACACATGGCTGCATTTTACATCCTGAGTTAACTGTGGACTCCATGATCCCGGCTTATGCAACTACAAG-  
 GATTCGTAGCCAAATTGGAAAACACAGAGTCTGAGCTGAAGAACTTGTCTGAAGAAAACCCAGATTTA-  
 CAAGAAGCATACTTGCAAAACAGAAACGACTTAAATCAAAGCTGCTTGATCATGACAATGTCAAG-  
 TATTTGAAGAAAATTCTTGATGAGTTGGAGAAAGTCTTGGATCAGGTTGAAACTGAATTGCAAAGAA-  
 GAAATGAAGAAACCCAGAAAGAGGGCCAGCAACCTTGGCTCTGCGGTGAATCCTTACCCTGGCA-  
 GACGTCTCACTCGCTGTACATTGCATCGACTGAAGTTCCTGGGGTTTGAAGGAGAAAACCTGGGAA-  
 ACGGAAAGCGACCAAACTTGGAAACCTATTACGAGCGTGTCTTGAAGAGAAAAACATTTAACA-  
 AGGTTTAGGACATCAACAATATTTAATCTCTGCAGTGTGCCAACAGCATTCCGGGTGGCCAAGA-  
 AAAGGGCCCCAAAAGTTCTTGGCAGCAGCACTTGTGGTTGCTTGGTTGCTTGCAGGAGTGGGA-  
 TATTTTGTCTTTATGCTTTTCAGAAAAGAGGCTTGGCAGCATGATATTAGCATTAGACCCAGACCAAT-  
 TATTTCTAGGTTTGTGGGATCTTGTCTGGCAGCTCATCCAAGCATTTAGCTAGACCCCTGT-  
 GATTGCCCGTGGCTCTCTGAGTCTGTCTTATTGAGTAGTTAGCAGTATTTTTCTAAAATTCAGAAGT-  
 CATCTTTGTTACACAACACAGGGTTCAGGTAGCAATAGGACACAAAATTGCTTTATTCTACAACCTGC-  
 CAGCTCCAGGCAGAAATAGGAAGGCAAAGAGATAAGAGAAGGAAAAATGAGAGAATGAAGTCTGTA-  
 TAGGGTAGAGCAATAGAAAAGTAAGCTTCGGGTGCCTCCAACGTTTCATGGCTGCCTGTCTCATTGGTAA-  
 ACCTCACATTTAGTTACTTGTGGGCTACTGCCACACATACACTTCTGTAATTGAGAACTCTTAGGAGAG-  
 GACTAGGGAATCACTGGGGATAGTGGGCTGGAGAGAACCCAGGCTTTATATGTATACTTTGACCT-  
 CAGTGTAAATTTAAATGCTTATGAATCACACACATTGCTTTAGTAAGATTAAGTGTATATACTAGAA-  
 ATTTGATGCTCATTGGAACACATCTGCCTAGCATTCTCTGTAAGAGTCTTAAGTGATATTAAGAT-  
 GATTCCTTACCATTTCAGATGGTCCGCAATTTGAATTACCAAGTGGTAATGGTTCTTACTGTTTTA-  
 GATGGTGCCTGTGAGATAACCATTCTCTGGATGGTCATGTCCAGTCAGTGGGAGGTAGAAAAGGTGG-  
 CATCTGTAGCCCTCTCATAACATAAGTGGCATTAGGTGAATGTCCAGCTAATCACTAGCATGTC-  
 TAGGTATTGGCTGGGTAGTGGGTATTTGATGATCTGGGGCACCAAATATGTTTCATTCTCTCGTTTGGG-  
 GAGGCTGGTCTGTAAACACAAAAATTGTTGTCCAGATCTTTCATCTGTTTATGATCATCAACAAA-  
 GACTTGTTAGAAAGGTCTAGTCTTAGCACTTGGCAGTTAATCTAGGGAAGATGAATTAATGGGTAGA-  
 TAGTGATGCATACTGTATTCACTGATGATGTTAAGGGATTTGGGGGGGATACCTCAGTTCATGTGGA-  
 AAGGACAGTCTCGGTGTGTCCCATGAATAACCTTGGAACTGCAACAAATGGTTTTGTGCTCAGAAAA-  
 AGTCTTTCATGGTGACAGGAAGACAGTTTCCCTGGAGCTGGCCATGAAGGCCTTAGAAGC-  
 CATTCTGGTGTCTGGTGGGTAGCAGGCATAGAGATGATGTGCCGAGGTCCCAGTGAACAACAGTAGC-  
 CAAAGAATGTACTAATTTATCATTAAATAGGAAAGTGCATACCTAGGAAACAATGACTTTTTGATGGCAA-  
 AATGATTTTTTAATTCTATTTTGTATGCTGTAATTCATTTTCATGACCTAGTTGTATTAGAAAACCTTGTAT-  
 GAACTATATGTTCCCGATTTACAAAAAAATTAATAAAACCTCCAGAGTAAACTCAGTCAAAACAATAATT-  
 GAGTAGCAGCTTTTATAACATTTAAAATTTGCACATGAGTGTGTTGTGCATATGGAGTGTCTGA-  
 ATCTGTTGCTGGGACATACCAATCCATGTATTTCATTAGAGCCATAGAAGTTATTATTCATTAGTTCA-  
 TAGTGTGTTGAGTCTTTTATGTCACCTCTGTTAGAAAACAAGAAGTCTGATCGTGAAGAAATAAGAATTG-  
 GATTTTATAAAAACCTCTGAAGGATATTTACCTATGAAAAAGTTGTTAAGATAAA\*AATAGAAGTC-  
CATGGTTAACTTTTCCTTCAATTTATATTTCCTGAATCATAGGGAATCTTTCTAGAATGTGTTTATA-  
ATTTCTTGTACAGTTTCTTTGGAATAACGTTAAAGATAGTGGCAATTTTCATATATTTTCATGGATACTT-  
GAGTTTGTGCTTTTAAAGGTGTTTGTGTTAGGGATACAATGACCACTAGATGTCGCTGTTTATCCAGTA-  
GACTAAGATTGAGTGTCTTTTGTTCAGCAACTCTTCTAAAATGTTTCAAGCAAAGATAGTAAT-  
GACCTCAGTTTCTGAAATAAGGGCATCTTCATCAGATTATTCTGTTTTAAAAAAAAGCTTGAAGGCA-  
AATGTGAGTGATTTCAGTGTCTTGAAGGGATTACAGTATCACACAATGTCAAGCTAGAGTTAAACA-  
CAGTATTAGCTAAATAGGCACTTATGTGATTTTTCTTTTTTCATGATTATCGGTGACTGGTCAGTGTACT-  
CATCAATTTCCAAAATTTGTATAAATATCACAAATTAGAAAAATGCCTGAGGTAATAAAGT-  
TATGTTGGCTTTTTGTGTCTTAAACACATAAATACTATTGTTATTGCAGCAGATGCCTTTTGAATC-  
CATTTTCCATAATTGCGGATAGTCATAAATTGCTTGTCAATTTTTAGTAATTATTGCTGTTGACAC-  
CAGCGTTGTAGATTTTGGTGTGTTGAATGCAGTAGAGACCAAGACACTATTCTGTAAGATCAATA-  
AA\*AGTAATTGAAAATAAATATGAACCCTAAAA

**Figura 27.** Secuencia del cDNA del gen *GDAP1*. La secuencia consta de 2630nt y abarca desde el ATG de inicio de la traducción hasta el extremo 3' UTR. Los exones aparecen en distintos colores. El inicio del EST AL110252 aparece remarcado en verde y los distintos sitios de poliadenilación se muestran en negrita y subrayados. Con un asterisco se señalan los dos sitios que deben ser utilizados según los datos del Northern blot (ver apartado siguiente).

#### 2.3.4.4. Expresión tisular del gen **GDAP1**

Los datos disponibles del trabajo de Liu et al., publicado en la revista *Journal of Neuroscience* en 1999, sugerían que el gen homólogo de ratón se expresa únicamente en cerebro. Para determinar el patrón de expresión del gen GDAP1 humano realizamos dos aproximaciones experimentales, un Northern blot de tejidos humanos y una RT-PCR tanto de tejidos humanos como murinos.

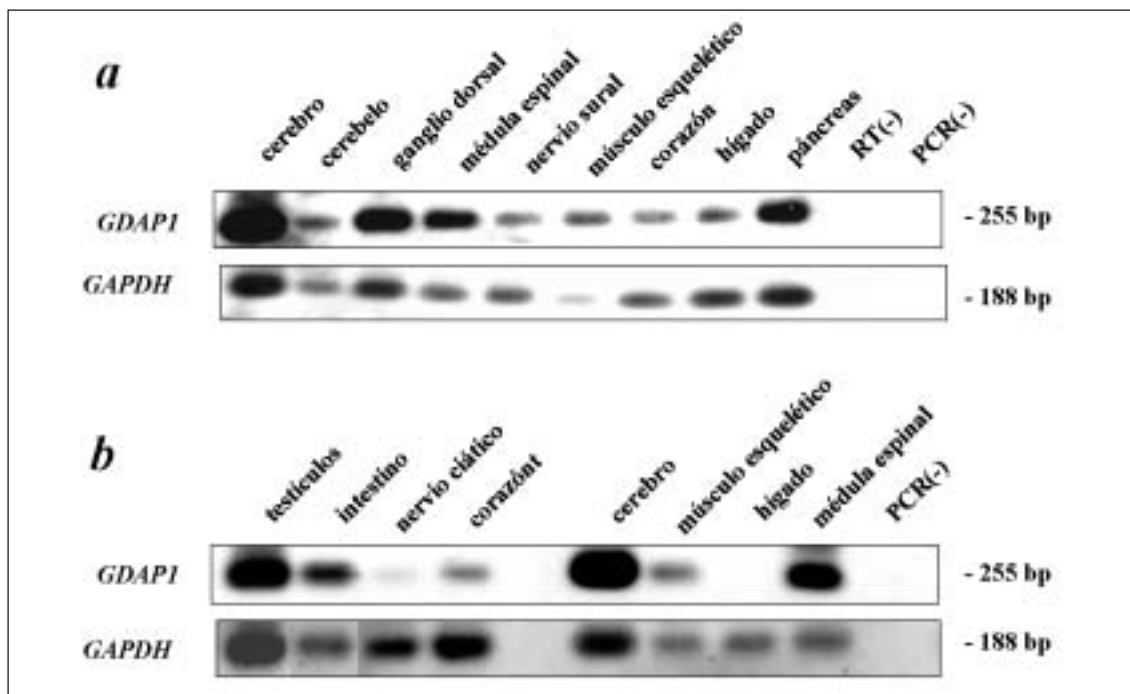
En el análisis de Northern blot de mRNA-poli(A)<sup>+</sup> de varios tejidos humanos (Clontech, California) utilizamos como sonda génica un fragmento de 1.015 pb amplificado a partir de la genoteca de cerebro fetal humano que comprende la casi totalidad de la ORF. Detectamos dos transcritos de un tamaño aproximado de 3.9 Kb y 2.9 Kb, respectivamente (Fig. 28). El transcrito de mayor tamaño e intensidad estaría de acuerdo con la utilización del tercer sitio putativo de poliadenilación en el EST AL110252, mientras que el transcrito de 2.9 Kb se correspondería con el uso primer sitio putativo de poliadenilación en dicho EST. Como control de la cantidad de RNA en cada tejido hibridamos la misma membrana con una sonda de  $\beta$ -actina. Aunque en la mayoría de tejidos se observaba una expresión basal, ésta era mucho más intensa y evidente en cerebro total y en médula espinal. Entre los tejidos de origen no neurológico llamaba la atención la señal de intensidad intermedia de la glándula tiroides.



**Figura 28.** Análisis de expresión del mRNA del gen *GDAP1*. Northern-blot mostrando la existencia de dos transcritos diferentes en *GDAP1*, el transcrito mayor, de 3,9 Kb, y un segundo transcrito de 2.9 Kb. La expresión era mayoritaria en cerebro y médula espinal, y en menor medida en glándula tiroides. Se empleó la  $\beta$ -actina como control de dosis de carga.

El experimento de RT-PCR (PCR tras transcripción inversa de mRNA a cDNA) se diseñó de modo que se pudiera detectar amplificación de DNA genómico contaminante. Como control de la reacción se amplificó el gen *GAPDH* (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa) que tiene una expresión generalizada en todos los tejidos. El análisis de RT-PCR mostró también que *GDAP1* tiene una expresión ubicua, aunque mucho más marcada en tejido nervioso., tanto en humano como murino. La expresión en nervio sural

humano y en nervio ciático de ratón nos indicaba que el gen *GDAP1* no se expresa sólo en neuronas sino que también existe expresión en células de Schwann. Sin embargo, se observó expresión mayor en los tejidos del sistema nervioso central que en tejidos del sistema nervioso periférico (Fig. 29).



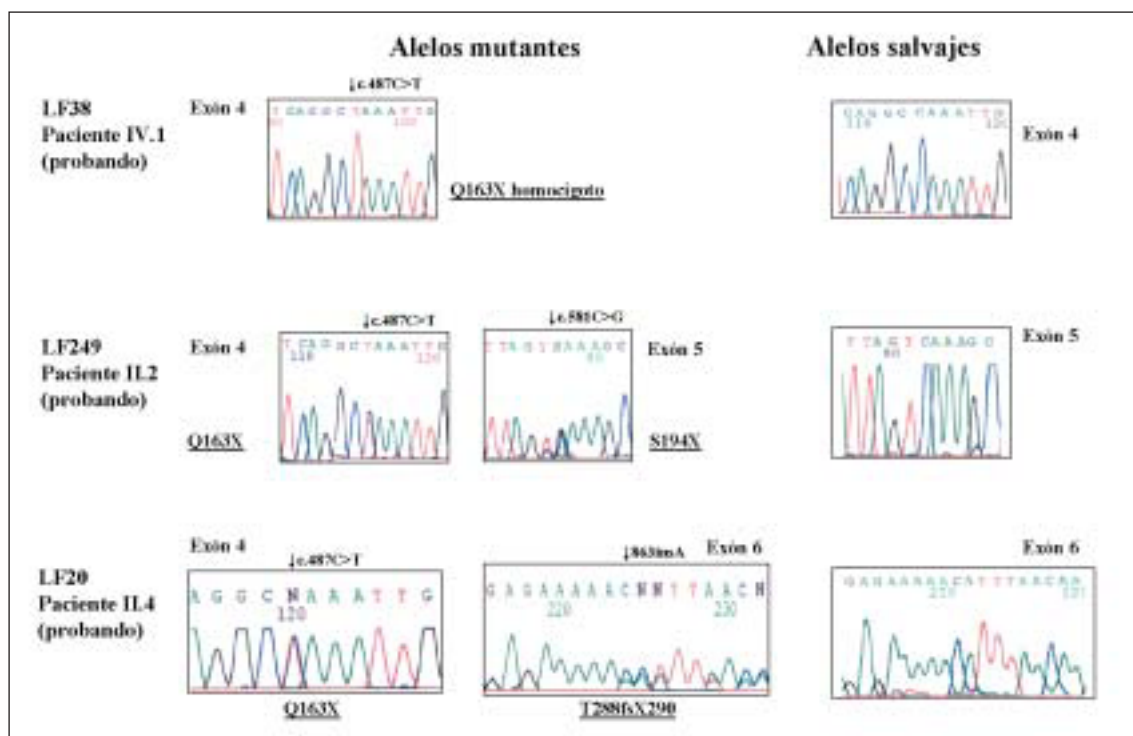
**Figura 29.** Análisis de expresión del mRNA del gen *GDAP1*. Análisis de diferentes tejidos humanos(a) y de ratón (b) mediante RT-PCR de *GDAP1*. Se usó como control de calidad y cantidad de RNA, el *GAPDH*. Los distintos tejidos se indican en la parte superior de cada línea. En las dos últimas líneas hay un control RT(-) sin transcriptasa inversa, y un control PCR(-), sin DNA en la reacción.

#### 2.3.4.5. Mutaciones en el gen *GDAP1*

Basándonos en el cartografiado del gen *GDAP1* en el intervalo definido en 8q21.1 y de su expresión en el sistema nervioso tanto en humanos como su ortólogo en ratón, nos planteamos la búsqueda de mutaciones en el gen en los pacientes probando en las tres familias de las que disponíamos con un fenotipo clínico similar y a partir de las cuales habíamos logrado localizar el gen. Para ello, realizamos la amplificación a partir de DNA genómico y posterior secuenciación de los 6 exones y sus secuencias intrónicas flanqueantes, utilizando cebadores específicos diseñados a partir de las secuencias del gen.

Encontramos seis alelos mutantes y detectamos tres mutaciones distintas, dos sustituciones de un nucleótido y una inserción de un nucleótido. Las sustituciones son una transición c.487C>T en el exón 4 y una transversión c.581C>G en el exón 5, las cuales producen dos mutaciones sin sentido, Q163X y S194X, respectivamente. Ambas dan

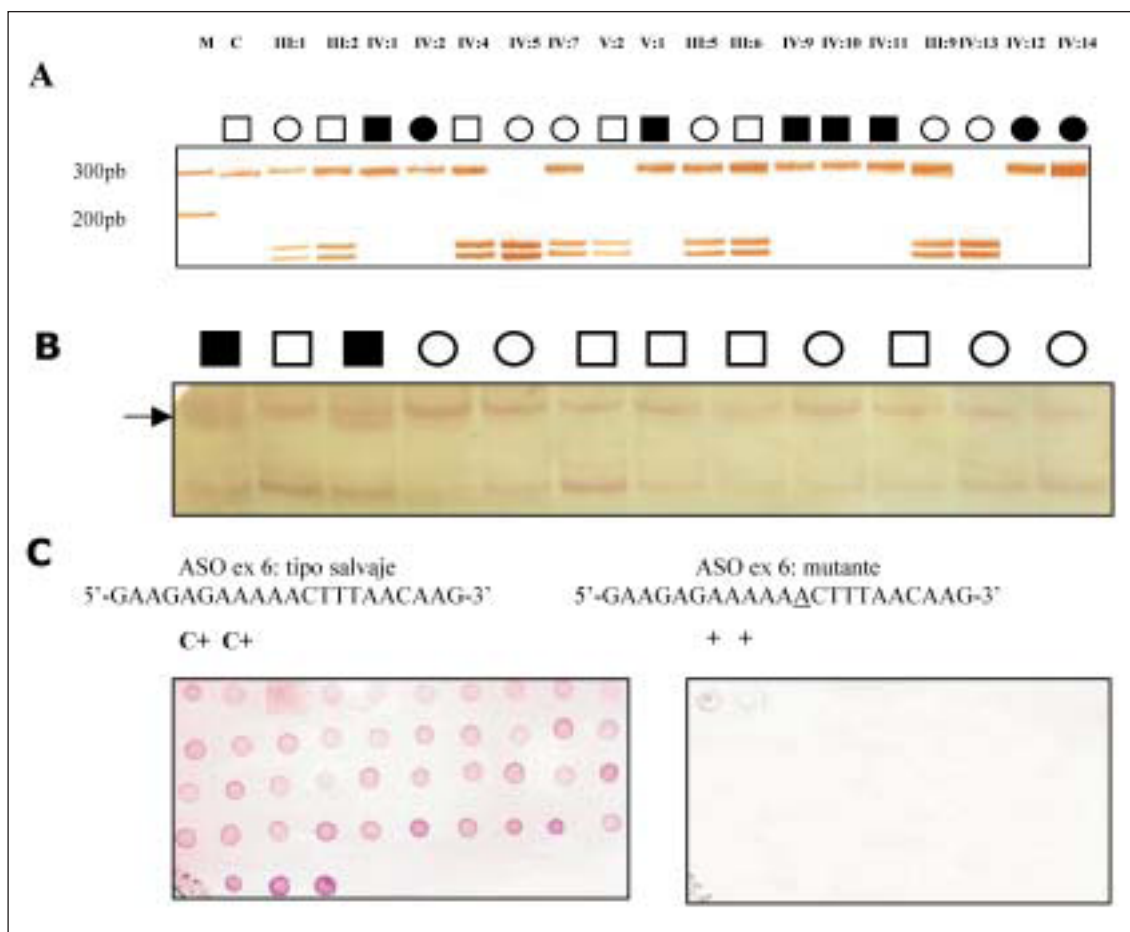
lugar a codones de parada cuya consecuencia es una proteína truncada. La tercera mutación es la inserción de una adenina, c.863-864insA, en el exón 6 que produce una mutación que altera la pauta de lectura, tipo *frameshift*, con dos aminoácidos distintos de la proteína salvaje después de la treonina 288 y terminando la proteína en el codón 290 (T288fsX290). El probando de la familia LF38, IV:1, era homocigoto para la mutación Q163X. El probando de la familia LF 249, II:2, era heterocigoto para las mutaciones Q163X y S194X. El probando de la familia LF20, II:4, era heterocigoto para las mutaciones Q163X y T288fsX290 (Fig. 30).



**Figura 30.** Análisis de mutaciones de *GDAP1* en las tres familias, LF38, LF249, y LF20. Electroforegramas de las mutaciones de *GDAP1* en tres probandos a la izquierda y controles normales para los exones 4, 5 y 6 a la derecha del panel. En la imágenes de la izquierda se indica la mutación sobre el recuadro y bajo y subrayado el cambio sobre la secuencia de la proteína. El paciente IV.1 de la familia LF 38 es homocigoto para la mutación sin sentido Q163X. El paciente II.2 de la familia LF 249 es heterocigoto compuesto para las mutaciones Q163X y S194X. El paciente II.4 de la familia LF20 es heterocigoto compuesto para las mutaciones Q163X y T288fsX290.

Posteriormente, se analizó a todos los miembros de las tres familias y se confirmó en cada genealogía la segregación mendeliana de las distintas mutaciones con la enfermedad. La transición c.487C>T destruye un sitio de restricción *HaeIII*, lo que permitió el estudio de la mutación en las tres familias mediante análisis de restricción. En la figura 31A se muestra este análisis de restricción en el DNA de los miembros de la familia LF38. La mutación c.581C>G del exón 5 se investigó en los familiares mediante SSCP (Fig. 31B). La mutación c.863-864insA se analizó empleando una técnica de ASO (oligonucleótidos específicos de alelo en sus siglas en inglés) (Fig. 31C).

Con el fin de determinar si estos cambios se no eran polimorfismos frecuentes del gen *GDAP1*, se estudiaron 134 cromosomas de 67 individuos normales de población española. En ninguno de ellos encontramos ninguna de la tres mutaciones, por lo que se determinó que no eran polimorfismos y que sí eran la mutaciones causantes de la enfermedad.



**Figura 31.** Análisis de las mutaciones en las tres familias mediante técnicas de análisis de restricción, SSCP, y ASO. (A) Segregación de la mutación del exón 4 en la familia LF38 mediante análisis de restricción. La sustitución c.487C>T elimina un sitio de restricción *HaeIII* generando dos fragmentos de 148 y 140 pb respectivamente. (B) Análisis de la mutación c.581C>G del exón 5 mediante SSCP en los dos enfermos se observa un patrón anómalo de bandas. (C) Análisis mediante ASO de la mutación c.863-864insA del exón 6 en los dos pacientes portadores de dicha mutación y en población normal.

#### 2.3.4.6. Análisis de la secuencia de aminoácidos deducida para **GDAP1**

La proteína GDAP1 deducida de la ORF (marco de pauta de lectura en las siglas inglesas) está formada por 358 aminoácidos. El análisis comparativo de la secuencia del gen *GDAP1* con las secuencias depositadas en las diversas bases de datos mostraba que presenta una homología con diversos organismos. En primer lugar tenía una homología con la proteína de ratón de un 94%, indicando una gran conservación en las dos especies. La región en la cual difiere más, es en el extremo N- terminal de la proteína (Fig. 32).

*rGDAP1* MARRQDEARAGVPLRVEGPPDKEVHLILYHWTHSFSSQKVRLVIAEKALKCEEHDVSLPL  
*hGDAP1* MARRQEEQRGSPPLRGKKGADAEVKLILYHWTHSFSSQKVRLVIAEKALKCEGHVSLPL  
  
*rGDAP1* SEHNPEWFMRLNSAGEVPVLVHGNIICEATQIIDYLEQTFLDERTPRLMPDEGSMYYPR  
*hGDAP1* SEHNPEWFMRLNSTGEVPVLHGENIICEATQIIDYLEQTFLDERTPRLMPDKESMYYPR  
  
*rGDAP1* VQHYRELLDSLPMDAYTHGCILHPELTVDSMIPAYATTRIRSQIGNTESELKKLAEENPD  
*hGDAP1* VQHYRELLDSLPMDAYTHGCILHPELTVDSMIPAYATTRIRSQIGNTESELKKLAEENPD  
  
*rGDAP1* LQEAYIAKQKRLKSKLLDHDNVKYLKKILDELEKVLQVETELQRRNEETPEEGNQPWLC  
*hGDAP1* LQEAYIAKQKRLKSKLLDHDNVKYLKKILDELEKVLQVETELQRRNEETPEEGQQPWLC  
  
*rGDAP1* GESFTLADVSLAVTLHRLKFLGFARRNWGHGKRPNLETYYERVLKRKTFNKVLGHVNNIL  
*hGDAP1* GESFTLADVSLAVTLHRLKFLGFARRNWGNKRPNLETYYERVLKRKTFNKVLGHVNNIL  
  
*rGDAP1* ISAVLPTAFRVAKKRAPKXXXXXXXXXXXXXXXXXXXYFAFMLFRRRLGSMILALRPRPNYF  
*hGDAP1* ISAVLPTAFRVAKKRAPKVLGTTLVVGLLAGVGYFAFMLFRKRLGSMILALRPRPNYF

**Figura 32.** Comparación de las secuencias de aminoácidos de la proteína GDAP1 humana (*hGDAP1*) y de ratón (*rGDAP1*). Las secuencias presentan una homología del 94% siendo el extremo N-terminal donde más difieren. El alineamiento se realizó con el programa BLAST2.

Por otro lado, presenta una homología con la proteína de *Drosophila melanogaster* (CG4623) de un 48% (identidad 30%) y con *Arabidopsis thaliana* (T14N5.14) de un 46% (identidad 30%). También detectamos un parálogo, GDAP1like-1 (GDAP1L1), (MGC3129), con una homología del 71% (identidad 57%).

La secuencia de aminoácidos de GDAP1 tiene una gran similitud con las glutation-S-transferasas (GSTs). Detectamos dos dominios característicos de las GSTs en las posiciones 26-119 (N-terminal) y 210-287 (C-terminal) respectivamente. El análisis de la estructura secundaria de los residuos aminoacídicos 25 a 100 muestra la topología de un sitio de unión al glutatión,  $\alpha\alpha\alpha\alpha$ , que generalmente se localiza en los 80 aminoácidos del dominio plegado similar a tioredoxina en N-terminal de las GSTs, seguido por el dominio II,  $\alpha$ -hélice para reconocimiento de sustratos xenobióticos. La secuencia terminal del GDAP1 muestra dos dominios putativos transmembrana.

El análisis filogenético de GDAP1 demuestra que GDAP1 no pertenece a ningún grupo de familias de GSTs ya caracterizadas, pero pertenece quizás a un nuevo grupo, monofilético, que incluye los GDAP1 humanos y de ratón junto con los de *Drosophila melanogaster* (CG4623) y *Arabidopsis thaliana* (T14N5.14) y GDAP1L1, (MGC3129) (Cuesta et al. 2002; Marco et al. 2004).

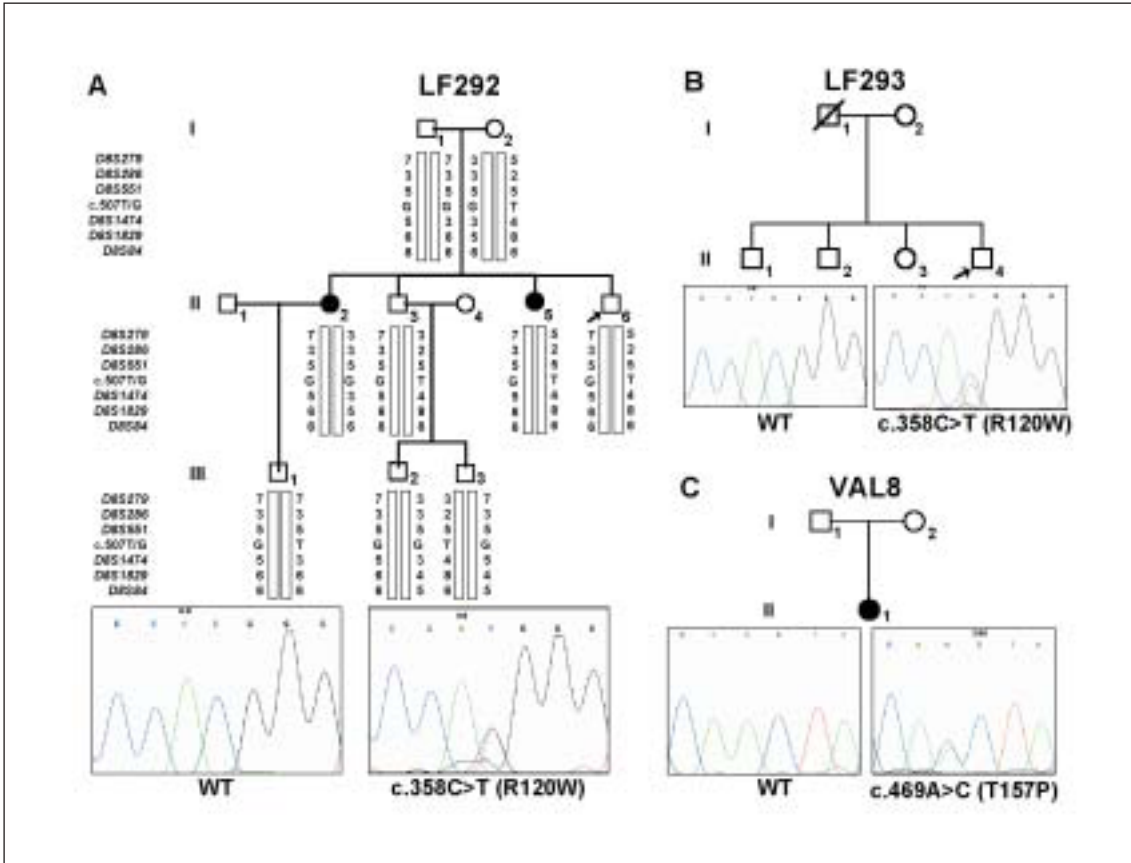
#### 2.3.4.7. Genética de la neuropatía CMT4A: mutaciones, herencia y efectos fundadores

Tras demostrar que las mutaciones en el gen *GDAP1* causan la enfermedad CMT4A con patrón axonal en tres familias, nos planteamos estudiar la genética de la enfermedad en la población española. Para ello analizamos el gen en 106 casos aislados y 19 familias

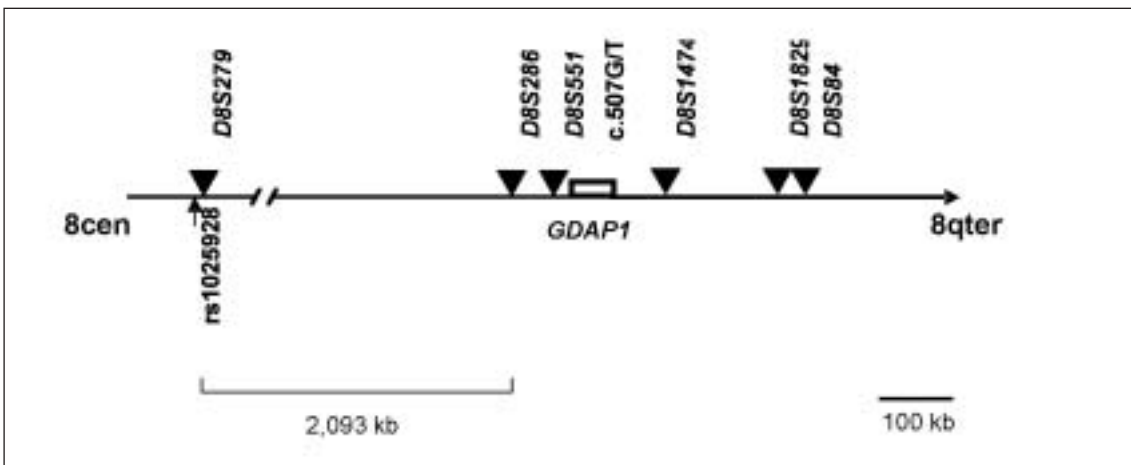


con distinto tipo de herencia mendeliana y en los que, previamente habíamos excluido mutaciones en los genes más prevalentes, *PMP22*, *MPZ* y *GJB1* (Claramunt et al. 2004). El análisis molecular nos ofreció los siguientes resultados: mutaciones en 7 casos aislados y en 5 familias, incluyendo las tres familias originales con herencia autosómica recesiva y, para sorpresa nuestra, dos familias con herencia autosómica dominante. Encontramos 6 mutaciones distintas en 21 alelos mutantes de los 12 pacientes probados.

Las mutaciones que ya habíamos descrito –Q163X, S194X y T288fsX290- (Cuesta et al. 2002) se encontraron en una o más familias adicionales. Además, se encontraron tres mutaciones nuevas. Un paciente con una mutación S194X en un cromosoma presentó una deleción de 4 pb AAAG en el otro cromosoma. Esta deleción representa una mutación por pérdida de la pauta de lectura que genera un codón de parada en la posición 145 (E114fsX145), y predice una disrupción importante de la síntesis de GDAP1. Las otras dos mutaciones eran cambios de aminoácidos de sentido equivocado, R120W y T157P. La mutación R120W se encontró en heterocigosis en dos familias que segregaban el fenotipo CMT como un rasgo autosómico dominante y la mutación T157P se detectó en un caso esporádico expresándose otra vez la enfermedad como rasgo dominante. Después de secuenciar todos los exones y regiones intrónicas flanqueantes no encontramos ninguna otra mutación en los pacientes dominantes. Además, no encontramos estos cambios de nucleótidos en 196 cromosomas control en individuos de la población general española, sugiriendo de nuevo que ni R120W ni T157P eran polimorfismos neutros. La neuropatía CMT4A, tanto desmielinizante como axonal, se describió originalmente en familias segregando la enfermedad como un rasgo autosómico recesivo. Analizando nuestra serie encontramos, pues, dos familias y un caso esporádico con una sola mutación. En la familia LF292, la mutación R120W mutación segrega con la enfermedad en tres generaciones (Fig. 33). La mutación se asociaba con un haplotipo construido con los marcadores microsatélites D8S279 a D8S84 (Fig. 33A y Fig. 34). En la familia LF293 encontramos la mutación R120W en los dos hermanos afectados (Fig. 33B). En esta familia los padres no estaban disponibles para los estudios clínicos y genéticos, pero el padre estaba afectado por historia. La niña afectada de la familia VAL8 era heterocigota para la mutación T157P (Fig. 33C); la mutación no se encontró en ninguno de los progenitores. Mediante genotipado de 10 microsatélites no ligados al locus CMT4A excluimos falsa paternidad y confirmamos que la mutación era un suceso *de novo*. Tomadas en su conjunto, las tres familias representan la expresión del fenotipo CMT como un trastorno dominante.



**Figura 33.** Árboles genealógicos, mutaciones y segregación de haplotipos de las familias *CMT4A* autosómicas dominantes. Los individuos afectados están indicados con símbolos oscuros y los no afectados mediante símbolos claros. Se muestran las secuencias directas de las mutaciones en *GDAP1* identificadas en los tres probandos. La secuencia del alelo salvaje (WT) se encuentra a la izquierda y la mutación a la derecha de cada familia. (A) Familia LF292 con tres generaciones de afectados; debajo de cada símbolo individual se indica los genotipos de siete marcadores; el haplotipo asociado con el cromosoma mutante se muestra en negro. (B) Familia LF293 para las que se postula la segregación dominante por la afectación del padre por historia (indicado como un símbolo medio relleno). (C) Paciente esporádica como consecuencia de una mutación de novo T157P.



**Figura 34.** Mapa físico del locus *CMT4A*. El gen *GDAP1* se indica con una caja oscura. Los marcadores microsatélites ligados se indican arriba. Los marcadores tipo SNP rs1025928 y rs959424 en el locus D8S279 se ubican bajo de la línea.

Encontramos cuatro mutaciones en más de un cromosoma. Para determinar si cada mutación tenía un origen ancestral común, procedimos a investigar la presencia de un haplotipo común compartido. Para construir haplotipos buscamos marcadores SNP en la secuencia codificante y secuencias flaqueantes intrónicas de *GDAP1*. Tras cribar 224 cromosomas mediante análisis de SSCP únicamente encontramos el SNP c.507T/G en la región codificante (exón 4), el cual representa un cambio sinónimo S169S. En esta situación, procedimos a construir haplotipos extendidos mediante el análisis de seis marcadores microsatélites flanqueantes *D8S279*, *D8S286*, *D8S551*, *D8S1474*, *D8S1829* y *D8S84*, los cuales se extienden ~2,83 Mb alrededor del locus *CMT4A* (Fig. 34).

La mutación más frecuente en nuestra población es Q163X. Cinco pacientes eran homocigotos para Q163X y tres pacientes eran heterocigotos compuestos para Q163X y una mutación diferente. Cuatro pacientes, incluyendo tres homocigotos, procedían de valles del País Vasco; en definitiva, siete cromosomas portadores de Q163X tenían origen vasco. Los otros seis cromosomas mutantes procedían de otras comunidades de España, esto es, Castilla y León y el País Valenciano (Fig. 35).



**Figura 35.** Mapa de España y sus 17 Comunidades Autónomas. Los cromosomas portadores la mutación Q163X están representados círculos negros: 7 en el País Vasco, 4 en el País Valenciano y 2 en Castilla y León.

Para estudiar el origen de la mutación, construimos haplotipos en el locus CMT4A locus en nuestras familias. Cuando consideramos sólo el haplotipo nuclear *D8D551-c.507G/T-D8S1474* observamos tres haplotipos diferentes asociados con la mutación Q163X: el haplotipo 5-G-3 se observó en 11 cromosomas, mientras que los haplotipos 4-G-3 y 5-G-2 se asociaban con los cromosomas C y F, respectivamente (Fig. 36). Las variaciones alélicas observadas representan el cambio de una única repetición que podría haberse producido por mutación. Con todo ello, interpretamos que los tres haplotipos representan un haplotipo ancestral común, habiéndose originado los cromosomas C y F por mutaciones de los elementos repetitivos. Nosotros postulamos que la mutación Q163X se originó una vez en la Península Ibérica y se encuentra en enfermos y familias segregando el fenotipo CMT4A como consecuencia de un efecto fundador.

Para confirmar esta hipótesis extendimos el análisis de haplotipos con más microsatélites. El análisis de todos los marcadores nos sugirió de nuevo la presencia de un haplotipo común ancestral 7-3-5-G-3-6-6. Siete de los 13 cromosomas comparten el haplotipo común, mientras que encontramos variaciones en algunos microsatélites en los otros seis cromosomas (Fig. 36). Observamos alelos diferentes en los marcadores *D8S286* y *D8S1829* en el cromosoma C. Este hallazgo plantea la cuestión de si el cromosoma C derivó del ancestral después de varios sucesos genéticos (mutaciones o recombinaciones). Sin embargo, dado que los marcadores flanqueantes *D8S279* (el alelo 7 representa el 8% de los cromosomas normales) y *D8S84* (el alelo 6 representa el 54% de los cromosomas normales) no cambiaban respecto del haplotipo común pensamos que la hipótesis de un único origen para la mutación Q163X es la más probable. En el locus *D8S279* el cromosoma ancestral se divide en tres haplotipos diferentes: tres cromosomas son portadores del alelo 5 (cromosomas E, F y H), un cromosoma el alelo 3 (cromosoma J) y otro el alelo 6 (cromosoma I). Con el fin de determinar si la variación se generó por recombinación (*D8S279* se encuentra a 2,1 Mb más allá de *D8S286*) o por mutación de las repeticiones, ampliamos el genotipo del locus *D8S279* empleando SNP estrechamente ligados. Nuestro argumento era que el análisis de SNP muy cercanos reduciría el riesgo de mutación del marcador siendo, al mismo tiempo, mínima la posibilidad de recombinación. Genotipamos el SNP rs1025928 (alelo T 70%, alelo C 30% en la población normal) en los pacientes. Observamos cinco segregaciones alélicas de los marcadores rs1025928-*D8S279* en los cromosomas mutantes: C-7, T-5, C-5, T-3 y C-6. Postulamos que el haplotipo corto C-7 representa el cromosoma ancestral portador del haplotipo extendido C-7-3-5-G-3-6-6. A partir de ahí, la variación en *D8S279* asociada con el alelo C se interpretaba como consecuencia de una mutación (cromosomas E, H e I), mientras que la pre-

sencia del alelo T sugería que la variación en *D8S279* sería consecuencia de un suceso recombinante (cromosomas F y J). Empleando la variabilidad intraalélica de los marcadores más cercanos *D8S551* y *D8S1474* estimamos la edad de la mutación Q163X en aproximadamente 33.000 años (1650 generaciones, 20 años por generación).

Recientemente, el grupo de James Lupski del Baylor Collage de Houston, en Texas, Estados Unidos, ha publicado en la revista *Annals of Neurology* tres familias hispanoamericanas con pacientes homocigotos para la mutación Q163X. Dos de las familias eran originarias de Costa Rica (familias HOU364 y HOU726) y una de Perú (familia HOU531). Debido a que los enfermos de las tres familias compartían un haplotipo común y tenían un origen hispánico, estos autores postularon que se trataba de una mutación fundadora originada en la Península Ibérica. Con el objetivo de confirmar esta hipótesis comparamos los haplotipos en el locus *CMT4A* aquellos de los pacientes españoles. Pudimos observar que cuatro de los cromosomas hispanoamericanos compartían el haplotipo común C-7-3-5-G-3-6-6 con los cromosomas españoles. Los otros dos cromosomas mostraban diferencias alélicas en los marcadores rs1025928 y *D8S279* (Fig. 36). Estos datos confirman que la mutación Q163X tiene un origen ancestral común en pacientes y familias de ambos lados del Océano Atlántico y la existencia de un efecto fundador de la mutación Q163X en la Península Ibérica. Observamos, también, una variación idéntica en el locus *D8S279* tanto en los cromosomas españoles como en los hispanoamericanos. Los cromosomas R y J compartían el mismo haplotipo mientras que el cromosoma S tenía un haplotipo idéntico al de los cromosomas E y H. Estos hallazgos planteaban dos posibles hipótesis sobre la migración: primera, la mutación Q163X migró desde España a América en una ocasión, probablemente asociada con el alelo 7, y más tarde los otros haplotipos aparecieron bien por recombinación bien por mutación; segunda, la mutación Q163X llegaría a América en más de un movimiento migratorio. Tras el análisis de los orígenes geográficos, nosotros proponemos que la mutación migró en tres ocasiones distintas hacia América. Al menos una de estas migraciones partió del País Vasco, la asociada a los cromosomas J (vasco) y R (peruano).

Esta misma clase de análisis la aplicamos a otras dos mutaciones encontradas en dos cromosomas cada una: S194X y T288fsX290 (Fig. 37). Observamos que cada una de las mutaciones se asociaba con un único haplotipo confirmando un único origen para cada una. La mutación S194X se asoció con un haplotipo común de *D8S551* a *D8S84* en los dos cromosomas españoles. Tuvimos la oportunidad de estudiar una familia marroquí (PN860) homocigota para esta mutación y confirmamos que S194X tiene un origen común España y en Marruecos (Nelis et al. 2002; Claramunt et al. 2004).

Familia	Cromosoma nº	5' marcadores flanqueantes					GDAPI SNP					3' marcadores flanqueantes			Ref.
		rs1025928	D8S279	D8S286	D8S551	c.507G/T	D8S1474	D8S1829	D8S84	Origen étnico					
LF38	A	C	7	3	5	G	3	6	6	España/León	Cuesta et al. (2002)				
	B	C	7	3	5	G	3	6	6						
LF249	C	C	7	2	4	G	3	5	6	España/Valencia	Cuesta et al. (2002)				
	D	C	7	3	5	G	3	6	6	España/Valencia	Cuesta et al. (2002)				
LF135	E	C	5 mut	3	5	G	3	6	6	España/Valencia					
	F	T	5 rec	3	5	G	2	6	6						
VAL1	G	C	7	3	5	G	3	6	6	España/Vasco	Claramunt et al. (2004)				
	H	C	5 mut	3	5	G	3	6	6						
VAL3	I	C	6 mut	3	5	G	3	6	6	España/Vasco	Claramunt et al. (2004)				
	J	T	3 rec	3	5	G	3	6	6						
VAL4	K	C	7	3	5	G	3	6	6	España/Vasco	Claramunt et al. (2004)				
	L	C	7	3	5	G	3	6	6						
VAL5	M	C	7	3	5	G	3	6	6	España/Vasco	Claramunt et al. (2004)				
	N	C	7	3	5	G	3	6	6	Costa Rica	Boerkoe et al. (2003), Claramunt et al. (2004)				
HOU726	O	C	7	3	5	G	3	6	6						
	P	C	7	3	5	G	3	6	6	Costa Rica	Boerkoe et al. (2003), Claramunt et al. (2004)				
HOU531	Q	C	7	3	5	G	3	6	6						
	R	T	3 rec	3	5	G	3	6	6	Perú	Boerkoe et al. (2003), Claramunt et al. (2004)				
S		C	5 mut	3	5	G	3	6	6						

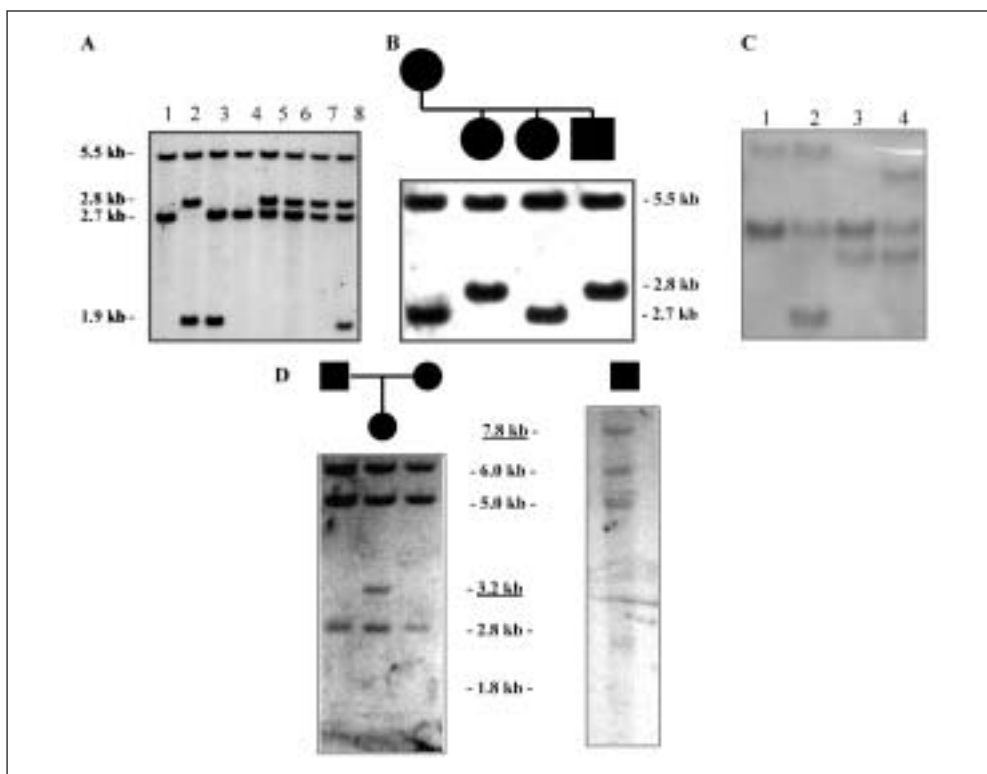
**Figura 36.** Haplotipos GDAPI asociados con la mutación Q163X. La figura muestra los haplotipos asociados con los 13 cromosomas españoles (A a M) y los 6 (N a S) hispanoamericanos. Las familias se indican en la primera columna. Se aporta el origen étnico. El color gris se emplea para identificar los alelos compartidos por todos los cromosomas. Algunos alelos divergen del haplotipo ancestral común. Cuando están en gris claro postulamos que se generó por mutación (mut); por el contrario, cuando se marcan en blanco se sugiere que se debió a un suceso recombinante (rec).

Mutación	Familia	5' microsátelites flanqueantes				GDAPI SNP				3' microsátelites flanqueantes				Ref.
		D8S279	D8S286	D8S551	c.507G/T	D8S1474	D8S1829	D8S84	Origin					
<b>S194X</b>	LF249	3	4	2	T	1	5	5	España	Nelis et al., Clarament et al. 2004				
	LF127	7	3	2	T	1	5	5	España	Claramunt et al. 2004				
	PN860	6	4	2	T	1	5	5	Marruecos	Nelis et al., Clarament et al. 2004				
		6	4	2	T	1	5	5						
<b>T288fsX290</b>	LF20	5	3	5	T	1	6	7	España	Claramunt et al. 2004				
	LF127	5	3	5	T	2	5	6	España	Claramunt et al. 2004				

**Figura 37.** Haplotipos GDAPI asociados con las mutaciones S194X y T288fsX290 en cromosomas españoles y marroquíes. Los alelos compartidos para cada marcador se indican en color gris. Cuando se sospecha un suceso recombinatorio los alelos se marcan en blanco.

### 3. ASPECTOS CLÍNICOS DE LAS NEUROPATÍAS PERIFÉRICAS HEREDITARIAS: CORRELACIONES GENOTIPO-FENOTIPO Y DIAGNÓSTICO MOLECULAR

La variabilidad genética de las neuropatías periféricas, tanto mendeliana como molecular, ha hecho del análisis molecular una herramienta muy importante para el diagnóstico de los pacientes y para el consejo genético. En este contexto, resulta fundamental la incorporación en la historia clínica del árbol genealógico. Este es la herramienta imprescindible para definir el patrón de herencia y, con ello, orientar dos aspectos básicos del consejo genético, el riesgo de recurrencia y el diagnóstico molecular. El diagnóstico molecular es el que ha de permitir ofrecer a las parejas la posibilidad de diagnóstico prenatal y preimplantatorio. En el diagnóstico de las distintas mutaciones hemos aplicado una amplia variedad técnicas moleculares basadas en el análisis de polimorfismos tipo RFLP o del tipo microsatélites para la duplicación CMT1A y la delección HNPP (Fig. 38) o el análisis de cribado mediante SSCP y secuenciación posterior del DNA.



**Figura 38.** Análisis molecular de la duplicación CMT1A y HNPP. (A) RFLP VAW409R3a/MspI mediante Southern blot que detecta tres alelos y la carga de dosis génica para el estudio de la duplicación CMT1A; la banda de 5,5 kb es un control de carga. (B) Idéntico análisis de la delección HNPP en una familia en la que se aprecia la pérdida de heterocigosidad en la segregación de la mutación de la madre a su primera hija y su hijo. (C) Análisis del microsatélite STR-9B en cuatro pacientes con CMT1, observándose en los casos 2 y 4 tres alelos y en los casos 1 y 3 dos alelos, pero apreciándose doble dosis génica interalélica. (D) Análisis de Southern del fragmento de unión que produce la duplicación CMT1A (banda de 3,2 kb) en el panel izquierdo y de la delección HNPP (banda de 7,8 kb) en el panel de la derecha.



En el laboratorio, nuestro grupo ha tenido la oportunidad de estudiar y diagnosticar más de 500 familias con neuropatía periférica hereditaria. Trabajando con este amplio material biológico hemos podido estudiar la expresión clínica de las mutaciones en distintos genes y establecer correlaciones entre el genotipo y el fenotipo clínico. En base a esta experiencia, hemos participado en varios seminarios internacionales cuyos objetivos eran definir criterios diagnósticos, correlaciones clínico-genéticas y guías clínicas de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth y de la neuropatía hereditaria con susceptibilidad a la parálisis por presión. Estos seminarios han sido: "2nd Workshop of the European CMT Consortium: 53<sup>rd</sup> ENMC International Workshop on Classification and Diagnostic Guidelines for Charcot-Marie-Tooth type 2 and Distal Hereditary Motor Neuropathy, September 1997, Naarden, Holanda" (Neuromus Dis 1998a) y "3rd Workshop of the European CMT Consortium: 54<sup>rd</sup> ENMC International Workshop on Genotype/Phenotype Correlations in Charcot-Marie-Tooth type 1 and Hereditary Neuropathy with Liability to Pressure Palsies, November 1997, Naarden, Holanda" (Neuromus Dis 1998b).

La neuropatía hereditaria con susceptibilidad a la parálisis por presión o HNPP es un trastorno que ha merecido mayor atención desde que se describió en 1993 la delección de 1,5 Mb como la mutación más frecuente asociada a la enfermedad. En nuestro grupo hemos realizado colaboraciones con investigadores clínicos con el objetivo de determinar los aspectos clínicos y electrofisiológicos de esta neuropatía en pacientes con delección y en la familia con la mutación c.78+1G>T, descrita anteriormente (Pou Serradell et al. 1995; Cruz-Martínez et al. 1997a), incluyendo peculiaridades como la neuropatía del plexo braquial no dolorosos (Cruz-Martínez et al. 1997a; Gil-Néciga et al. 2000), la duración de los bloqueos de conducción y la parálisis del nervio ciático poplíteo externo provocada por la pérdida de peso (Cruz-Martínez et al. 1997b).

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 4A se definió en 1993 como una neuropatía autosómica recesiva desmielinizante cuyo locus, CMT4A, estaba localizado en el cromosoma 8q13-q21.1. En contraste con estos hallazgos en familias tunecinas, nosotros encontramos ligamiento genético en el mismo locus en tres familias españolas con neuropatía axonal. El aislamiento del gen *GDAP1* (Cuesta et al. 2002) permitió confirmar que las formas desmielinizantes y las formas axonales son variantes alélicas de la misma neuropatía genética. El estudio clínico, electrofisiológico e histopatológico de los pacientes de las tres familias originales (Sevilla et al. 2003) y de nuevos pacientes (Claramunt et al. 2004) nos ha indicado que la lesión básica de la neuropatía CMT4A es axonal. Gran parte de los pacientes de nuestra serie también presentan disfonía por parálisis de cuerdas vocales.

#### **4. CONCLUSIONES**

En los apartados anteriores se han presentado los hallazgos y resultados de nuestra actividad científica sobre la genética de las neuropatías periféricas hereditarias y su aplicación en la práctica médica y la genética clínica. Hemos confirmado que las neuropatías hereditarias muestran heterogeneidad genética en nuestro país y hemos demostrado que la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 4A está causada por mutaciones en el gen *GDAP1*. Las conclusiones más importantes del trabajo realizado se resumen del modo siguiente:

- La duplicación CMT1A de 1,5 Mb en 17p11.2 es la mutación más frecuente responsable de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth; la duplicación y las mutaciones en los genes *GJB1*, *MPZ* y *PMP22* causan el 80 por cien de los casos en la población española. La deleción de 1,5 Mb es la mutación más frecuente causante de la neuropatía hereditaria con susceptibilidad a la parálisis por presión, aunque también puede deberse a una mutación en el gen *PMP22*.
- La duplicación CMT1A es la mutación más frecuente en los pacientes esporádicos. Mayoritariamente se produce por un entrecruzamiento desigual entre cromátides no hermanas durante la espermatogénesis paterna; en raras ocasiones se produce durante la ovogénesis materna y por entrecruzamiento entre cromátides hermanas.
- La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 4A está causada por mutaciones en el gen *GDAP1* en el cromosoma 8q21.1. Este gen codifica una proteína de 358 aminoácidos que se expresa principalmente en sistema nervioso central y periférico. El análisis filogenético sugiere que se trata de una proteína de una nueva subfamilia de glutation S-transferesas (GST). Los estudios recientes en el laboratorio nos han mostrado que *GDAP1* se expresa en neuronas y no en células de Schwann, y que se localiza en la mitocondria (Pedrola et al. enviado a publicar).
- El estudio clínico, electrofisiológico e histopatológico de los enfermos con mutaciones en *GDAP1* indica que la lesión fundamental está localizada en el axón, lo que está a favor de que CMT4A es una neuropatía axonal.
- La mutación causante de CMT4A más frecuente en la población española es la Q163X. Esta mutación también se ha encontrado en familias hispanoamericanas. A pesar de su diversidad geográfica y étnica hemos demostrado que tiene un origen único y ocurrió aproximadamente hace 33.000 años, probablemente en la Península Ibérica. La mutación probablemente migró a América en tres sucesos migratorios distintos.

- El análisis genético y molecular de los genes más prevalentes asociados a las neuropatías periféricas hereditarias es una herramienta fundamental para la determinación del diagnóstico clínico de estos trastornos neurológicos y para ofrecer un consejo genético a los pacientes y a las familias.

## 5. PUBLICACIONES

### Mecanismos genéticos de los reordenamientos genómicos en el cromosoma 17p11.2: duplicación CMT1A y delección HNPP

- **Bort S.**, F. Martínez, **F. Palau**. Prevalence and parental origin of de novo 1.5 Mb duplication in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Am J Hum Genet* 1997a;60:230-233.
- Lopes J., N. Ravisé, A. Vanderberghe, **F. Palau**, V. Ionasescu, M. Mayer, N. Lévy, N. Wood, N. Tachi, P. Bouche, P. Latour, M. Ruberg, A. Brice, E. Leguern. Fine mapping of *de novo* CMT1A and HNPP rearrangements within CMT1A-REP evidences two distinct sex-dependent mechanisms and candidate sequences uninvolved in recombinations. *Hum Mol Genet* 1998;7:141-148.
- Lopes J. S. Tardieu, K. Silander, I. Blair, A. Vandenberghe, **F. Palau**, M. Ruberg, A. Brice, E. LeGuern. Homologous DNA exchanges in humans can be explained by the yeast double-strand break repair model: A study of 17p11.2 rearrangement associated with CMT1A and NHPP. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 2285-2292.
- Meuleman J. A. Löfgren, **S. Bort**, E. Nelis, A. Vandenberghe, **F. Palau**, C. Van Broeckhoven, V. Timmerman. Identification of junction fragments in patients with partial CMT1A duplication or HNPP deletion in chromosome 17p11.2. 165<sup>e</sup> Réunion de la Société Belge de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Jette, 1997. *Arch Physiol Biochem* 1997;105:B10.
- **Palau F.**, A. Löfgren, P. De Jonghe, **S. Bort**, E. Nelis, T. Sevilla, J.J. Martin, J. Vilchez, **F. Prieto**, C. Van Broeckhoven. Origin of the de novo duplication in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: unequal nonsister chromatid exchange during spermatogenesis. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 2031-2035.

### Genes y patología molecular de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth

- **Bort S.**, E. Nelis, V. Timmerman, T. Sevilla, A. Cruz-Martínez, F. Martínez, J.M. Millán, J. Arpa, J.J. Vilchez, **F. Prieto**, C. Van Broeckhoven, **F. Palau**. Mutational analysis of the MPZ, PMP22 and Cx32 genes in patients of Spanish ancestry with Charcot-Marie-Tooth disease or hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Hum Genet* 1997;99:746-754.
- **Bort S.**, T. Sevilla, J.J. Vilchez, **F. Prieto**, **F. Palau**. Diagnóstico y prevalencia de la duplicación del locus CMT1A en la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 1. *Med Clin* 1995; 104: 648-652.

- **Bort S.**, T. Sevilla, **J. García-Planells**, D. Blesa, N. Paricio, J.J. Vílchez, **F. Prieto**, **F. Palau**. Déjérine-Sottas neuropathy associated with de novo S79P mutation of the peripheral myelin protein 22 (PMP22) gene. *Hum Mut* 1998;suppl. 1:S95-S98.
- Nelis E., C. Van Broeckhoven, P. De Jonghe, A. Löfgren, A. Vandenberghe, P. Latour, E. Le Guern, A. Brice, ML Mostacciulo, F. Schiavon, **F. Palau**, **S. Bort**, et al. Estimation of the mutation frequencies in Charcot-Marie-Tooth disease type 1 (CMT1) and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPP): a European collaborative study. *Eur J Hum Genet* 1996; 4: 25-33.
- **Palau F.**, **S. Bort**. Molecular pathology in 132 consecutive unrelated patients with Charcot-Marie-Tooth disease. 6th European CMT-Consortium Annual Symposium, Amberes, Bélgica, julio 1997. *J Periph Nerv System* 1997; 2:397-398.
- Pou A., J.M. Espadaler, J.M. Aragonés, E. Bufill, F. Alameda, J.J. Vílchez, T. Sevilla, A. Piqueras, **F. Palau**, **S. Bort**. Deleción del cromosoma 17p11.2 en familias españolas con neuropatía hereditaria por vulnerabilidad excesiva a la presión. *Neurología* 1995; 10: 367-374.

#### **Clonación posicional de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 4A y caracterización del gen *GDAP1***

- **Claramunt R.**, **L. Pedrola**, T. Sevilla, A. López de Munain, J. Berciano, **A. Cuesta**, **B. Sánchez-Navarro**, J. M. Millán, G. M. Saifi, J. R. Lupski, J. J. Vílchez, **C. Espinós**, **Palau F.** Genetics of Charcot-Marie-Tooth disease type 4A: mutations, inheritance, phenotypic variability, and founder effect. *J. Med Genet* 2004 (en prensa; doi: 10.1136/jmg.2004.022178).
- **Cuesta A.**, **L. Pedrola**, T. Sevilla, **J. García-Planells**, M. J. Chumillas, F. Mayordomo, E. LeGuern, I. Marín, J. J. Vílchez, **F. Palau**. The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nature Genet* 2002;30:22-25.
- Marco A., **A. Cuesta**, **L. Pedrola**, **F. Palau**, I. Marín. Evolutionary and structural analyses of *GDAP1*, involved in Charcot-Marie-Tooth disease, characterize a novel class of glutathione transferase-related genes. *Mol Biol Evol* 2004; 21:176-187.
- Nelis E., S. Erdem, P. Y. K. Van den Bergh, M-C. Belpaire-Dethiou, C. Ceuterick, V. Van Gerwen, **A. Cuesta**, **L. Pedrola**, **F. Palau**, AAWM. Gabrëels-Festen, C. Verellen, E. Tan, C. Van Broeckhoven, P. De Jonghe, H. Topaloglu, V. Timmerman. Mutations in *GDAP1*: autosomal recessive CMT with both demyelination and axonopathy. *Neurology* 2002; 59:1865-1871.
- Sevilla T., **A. Cuesta**, M. J. Chumillas, F. Mayordomo, **J. García-Planells**, **F. Palau**, J. J. Vílchez. Clinical and genetic studies in three Spanish families with severe autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth axonal neuropathy. *Acta Myol* 2001;20:49-52.

## Aspectos clínicos de las neuropatías periféricas hereditarias: correlaciones genotipo-fenotipo y diagnóstico molecular

- Cruz-Martínez A., **S. Bort**, J. Arpa, J. Duarte, **F. Palau**. Clinical, genetic and electrophysiological correlation in hereditary neuropathy with liability to pressure palsies with involvement of PMP22 gene at chromosome 17p11.2. *Eur J Neurol* 1997; 4:274-286.
- Cruz-Martínez A., **S. Bort**, J. Arpa, **F. Palau**. Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies after weight loss. *Eur Neurol* 1997; 37:257-260.
- Gil-Néciga E, E. Franco, A. Sánchez, A. Donaire, I. Chinchón, **F. Palau**. Plexopatía braquial recurrente familiar como única expresión clínica de una neuropatía con susceptibilidad a la presión. *Neurología* 2000; 15: 177-181.
- Infante J., A. García, O. Combarros, J. I. Mateo, J. Berciano, M. J. Sedano, E. J. Gutierrez-Rivas, **F. Palau**. Diagnostic strategy for familial and sporadic cases of hereditary neuropathy with liability to pressure palsies with chromosome 17p11.2 deletion. *Muscle Nerve* 2001;24:1149-1155.
- **Palau F.**, Coautor del informe. 2nd Workshop of the European CMT consortium: 53<sup>rd</sup> ENMC International Workshop on Classification and diagnostic guidelines for Charcot-Marie-Tooth type 2 (CMT2 - HMSN II) and distal hereditary motor neuropathy (distal HMN - spinal CMT)", 26-28 September 1997, Naarden, The Netherlands, por De Jonghe P, Timmerman V, Van Broeckhoven C and co-authors. *Neuromusc Dis* 1998; 8: 426-431.
- **Palau F.**, Coautor del informe. 3rd Workshop of the European CMT consortium: 54<sup>rd</sup> ENMC International Workshop on Genotype/phenotype correlations in Charcot-Marie-Tooth type 1 and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies", 28-30 November 1997, Naarden, The Netherlands, por Haites N, Nelis E, Van Broeckhoven C and co-authors. *Neuromusc Dis* 1998; 8: 591-603.
- Sevilla T. **A. Cuesta**, M. J. Chumillas, F. Mayordomo, **L. Pedrola**, **F. Palau**, J. J. Vílchez. Clinical, electrophysiological and morphological findings of Charcot-Marie-Tooth neuropathy with vocal cord palsy and mutations in the GDAP1 gene. *Brain* 2003; 126: 2023-2033.

## Revisiones

- Baiget M., **F. Palau**, V. Volpini, Ayuso C. Patología Molecular II: enfermedades neuromusculares, neurodegenerativas y neursensoriales. En: *Tratado de Medicina Interna Farreras/Rozman*. C. Rozman ed. 15<sup>a</sup> edición, 2004 pp. 1235-1251
- **Palau F.** Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth: diversidad fenotípica y heterogeneidad genética. En: *Genetic Diagnosis in Medicine*, J. García-Foncillas ed., Pamplona, 1998, pp. 29-36.
- **Palau F.**, **A. Cuesta**, **L. Pedrola**. Avances en la genética molecular de las neuropatías hereditarias. *Rev Neurol (Barc)* 2002;35:246-253.
- **Palau F.** Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth. Su etiología génica. *Investigación y Ciencia* 2003; mayo (nº 320): 38-39.

- Sevilla T., **S. Bort**, J.J. Vilchez, **F. Palau**. Genética molecular de las neuropatías hereditarias. En: *Avances en neuropatías periféricas*. A. Pou Serradell ed. J.R. Prous, S. A., 1994, pp. 3-24.

### **Tesis Doctorales**

- **Bases moleculares de las neuropatías periféricas desmielinizantes**

Sylvia Bort Martí

Universitat de València, Facultad de Farmacia, Departamento de Genética

Apto *cum laude* (PhD Europeo) y premio extraordinario de doctorado. Medalla García-Blanco 1997 de Investigación en Bioquímica y Medicina Experimental

- **Análisis genético y molecular de las neuropatías periféricas autonómicas recesivas**

Ana Cuesta Peredo

Universitat de València, Facultad de Farmacia, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

2003 Sobresaliente *cum laude*



# CAPÍTULO III

## TRASTORNOS DEL MOVIMIENTO

### **1. INTRODUCCIÓN**

Los trastornos del movimiento son enfermedades neurodegenerativas en cuya etiopatogenia están involucrados los ganglios basales y, en muchas ocasiones, afectan las funciones superiores. Entre estos trastornos se encuentra la enfermedad de Huntington y las distonías. Ambos trastornos han sido motivo de nuestro interés, especialmente desde la perspectiva del diagnóstico genético y de la genética poblacional.

### **2. HALLAZGOS Y CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS**

#### **2.1. Enfermedad de Huntington**

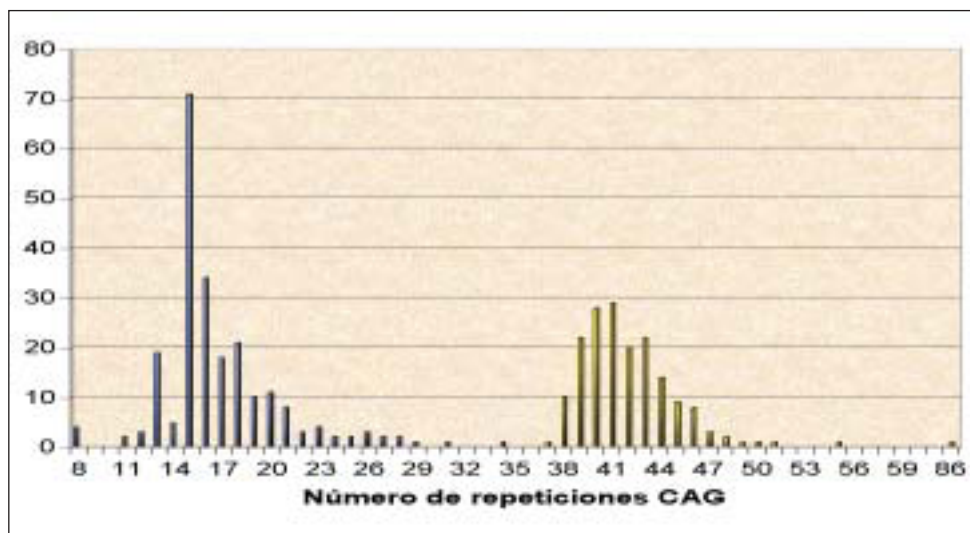
Una de las preocupaciones en el Servicio de Neurología del H. U. La Fe en los años noventa del pasado siglo era la genética clínica de la enfermedad de Huntington (HD) (MIM 143100), un trastorno devastador tanto en lo personal del propio paciente como en el ámbito familiar y social, que se caracteriza por movimientos motores anormales, trastorno de la conducta y deterioro cognitivo. La enfermedad se hereda con carácter autosómico dominante, lo que representa un riesgo de recurrencia del 50 por cien, y penetrancia completa dependiente de la edad. La mutación que se encuentra en todos los enfermos es la expansión del trinucleótido CAG localizado en el primer exón del gen *HD-IT15*. Los neurólogos Juan A. Burguera y Pilar Solís habían determinado una prevalencia de 5,3 por 100.000 habitantes en el País Valenciano, lo cual, junto al riesgo de recurrencia indicado anteriormente, hacían de la enfermedad de Huntington un trastorno sobre el que aplicar decididamente el consejo genético y establecer un programa de diagnóstico presintomático. Así, pues, este programa se inició en enero de 1994 colaborando en él los servicios de Neurología, Genética y Psiquiatría. No obstante, la primera tarea clínica era realizar el diagnóstico molecular de los enfermos que acudían al Servicio de Neurología y a otros servicios de los hospitales comarcales valencianos.

##### **2.1.1. Genética clínica**

Durante el período comprendido entre 1993 y 2000 realizamos el análisis molecular a 171 individuos con el diagnóstico clínico de enfermedad de Huntington. Al mismo tiem-

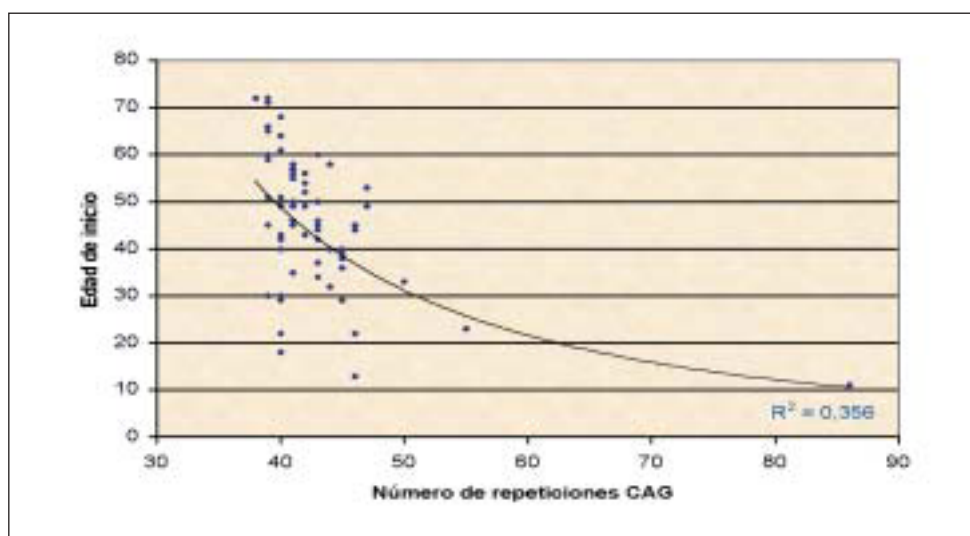


po estimamos la distribución alélica dentro del rango normal en la población valenciana. Observamos que este rango variaba entre 8 y 31 repeticiones CAG, con una moda en 15 repeticiones. En la serie de enfermos encontramos una expansión patológica en 134 de los 171 casos (78,3%), con un rango entre 37 y 86 repeticiones y una moda para el alelo de 41 repeticiones (Fig. 39).



**Figura 39.** Distribución del triplete CAG en nuestra población. Se representa el número de repeticiones frente al número de alelos observado. Con barras de color azul se representan los alelos normales, en color amarillo las correspondientes a los enfermos Huntington y en rojo los alelos intermedios.

La edad de inicio de la enfermedad está relacionada estadísticamente con el número de repeticiones. Nosotros realizamos el análisis en nuestra serie y encontramos correlación, originalmente en una primera serie corta de 18 enfermos (Solís Pérez et al. 1995) y en la serie global (García Planells, Tesis Doctoral 2003) (Fig. 40).



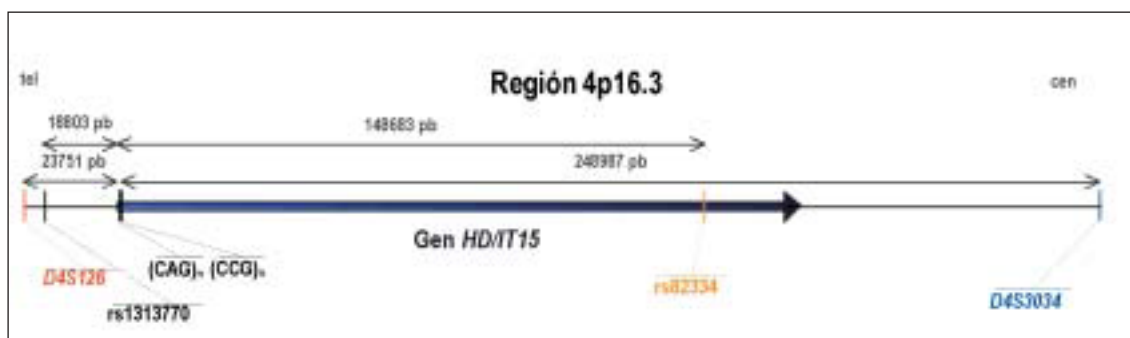
**Figura 40.** Relación entre la edad de inicio y el número de repeticiones en la enfermedad de Huntington. Se muestra la curva que mejor se ajusta a los resultados.

### **2.1.2. Diagnóstico presintomático**

Hemos participado y desarrollado el programa de diagnóstico presintomático desde 1994. En la actualidad este programa está bien asentado en la práctica clínica del H. U. La Fe. La valoración del primer período de seis años ha sido muy buena. En este tiempo solicitaron el análisis presintomático 87 individuos con antecedentes familiares y riesgo de recurrencia del 50 por cien. Por sexos la distribución fue de un 61 por cien de mujeres y un 39 por cien de varones. La edad media de los solicitantes fue de 28 años. El 31 por cien ya tenían hijos previamente a la solicitud. La tasa de solicitud fue del 13,4 por cien. Esta tasa variaba según el grado de información recibida por los individuos a riesgo, siendo significativamente mayor cuando las personas tenían un acceso directo a la información que cuando ésta les llegaba de una manera indirecta (Solís Pérez et al. 2001). Todas las personas que entraron en el programa siguieron el protocolo diseñado para el análisis presintomático según los criterios internacionalmente aceptados. Todas ellas recibieron información previa al análisis genético, tanto relativa a las características clínicas, psiquiátricas como al consejo genético; posteriormente se les tomó la muestra de sangre para extracción de DNA y, finalmente, información acerca de los resultados, apoyo psicológico continuado y clínico, según necesidades. En esta primera serie del programa no volvieron a la entrevista posresultado el 39,7 por cien, sin que influyera sobre ello el resultado positivo o negativo para la mutación (Solís Pérez et al. 2001).

### **2.1.3. Epidemiología genética y origen de la expansión CAG en la población valenciana**

La enfermedad de Huntington tiene una distribución mundial y, en general, se acepta que sólo unos pocos sucesos han dado lugar a la expansión patológica responsable de la misma en la mayoría de las poblaciones. Con el objetivo de determinar el origen de la mutación en la población valenciana investigamos la historia genética de la mutación CAG en los pacientes probandos de 83 familias no emparentadas, definidas como tales porque ambos progenitores habían nacido en el País Valenciano (García Planells, Tesis Doctoral 2003; García-Planells et al. 2004). Para ello definimos los haplotipos asociados a la mutación en los pacientes. Estos haplotipos se construyeron con dos marcadores microsatélites flanqueantes en 5' y 3' del gen HD-IT15, *D4S106* y *D4S3034*, dos marcadores SNP también flanqueantes, rs1313770 y rs82334, y la repetición CCG ubicada muy cerca del triplete CAG en el primer exón del gen (Fig. 41). Para cada uno de los marcadores determinamos la distribución de sus respectivas frecuencias alélicas en la población valenciana normal.



**Figura 41.** Distribución de los marcadores utilizados para la región 4p16.3. En la figura se muestra la distancia relativa entre los distintos marcadores utilizados en la elaboración de haplotipos que incluyan la repetición HD-CAG. La flecha gruesa indica la localización del gen HD/IT15 y su sentido de transcripción.

Para determinar qué haplotipos se asociaban a la mutación utilizamos dos aproximaciones, el análisis de segregación familiar y, cuando éste no era informativo, el programa PHASE v2.0 ([www.stat.washington.edu/stephens/software.html](http://www.stat.washington.edu/stephens/software.html)).

Con el objetivo de conocer el número de sucesos mutacionales, realizamos en primer lugar el análisis de haplotipos de la repetición CCG y los dos SNP, rs1313770-HD/CCG-rs82334. Para el marcador CCG construimos correctamente la fase de segregación en 79 de los 83 probandos. El análisis de la repetición CCG en familias informativas sugería que había al menos dos cromosomas principales asociados a la enfermedad en la población valenciana, uno principal o mayor asociado al alelo 7 (79 cromosomas mutantes) y uno raro asociado al alelo 10 (2 cromosomas mutantes). A continuación, pudimos establecer la fase exacta de segregación del haplotipo nuclear rs1313770-HD/CCG-rs82334 en 48 pacientes de los 79 probandos asociados con el alelo 7-CCG. Entre los cuatro posibles haplotipos en función de los SNP flanqueantes, sólo se pudo establecer dos sin ambigüedades: A-7-A (haplotipo H1) en 47 familias (56,6%) y A-7-C (haplotipo H2) en una familia (1,2%). Para obtener más información genética, procedimos a inferir los haplotipos en los 83 pacientes disponibles (166 cromosomas) empleando el programa PHASE ya mencionado. Se pudo diferenciar 8 haplotipos diferentes y los dos determinados por segregación también estaban incluidos. El haplotipo H1 fue con mucho la mejor opción pues se generó en 120 de los 166 cromosomas y el haplotipo H2 se generó en 2 de 166 cromosomas. Otros dos haplotipos merecieron también nuestra atención porque estaban representados en un número notable de cromosomas: G-7-A (H3) y G-7-C (H4) en 20 de 166 y 11 de 166 cromosomas, respectivamente. El número elevado de cromosomas, fase-conocidos o generados *in silico*, asociados con el haplotipo H1 sugiere que este es el más frecuente y que probablemente tenga un único origen. Los otros

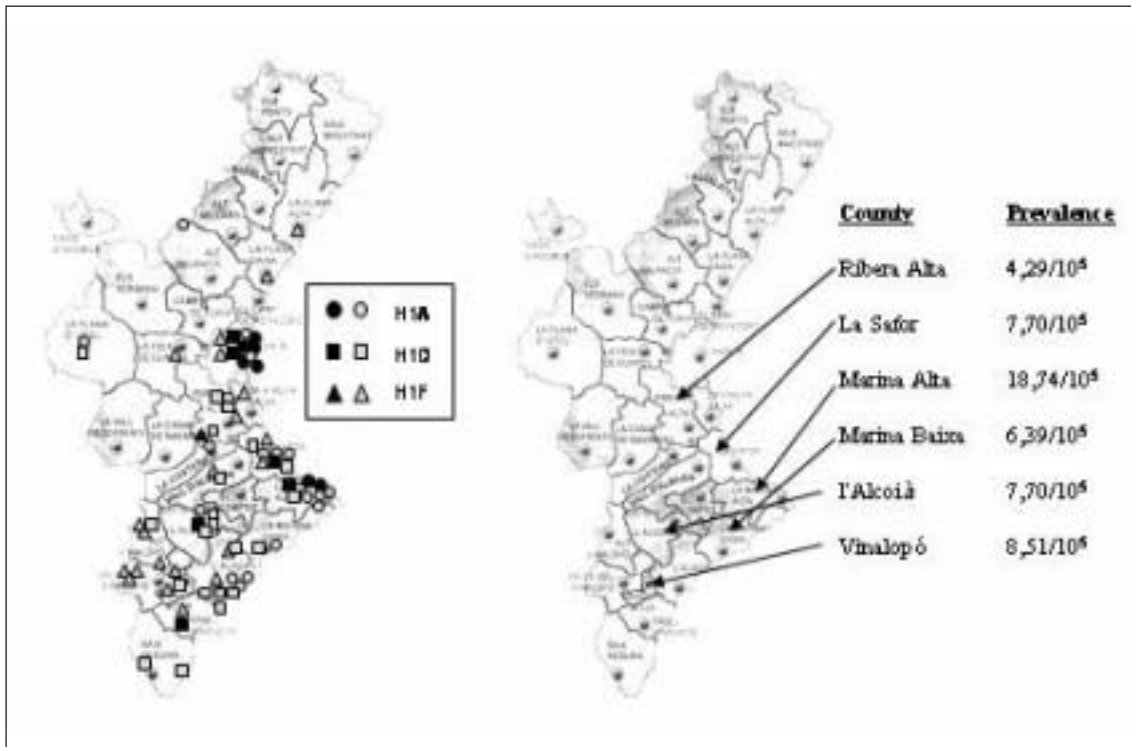
haplotipos bien pueden haberse producido a partir de H1, probablemente por recombinación meiótica, bien pueden representar distintos orígenes de la mutación.

En un intento de conocer más a fondo la historia genética de la mutación Huntington en nuestra población, procedimos a analizar el haplotipo H1 con los marcadores microsátelites flanqueantes *D4S126* y *D4S3034*. Volvimos a determinar los cromosomas fase-conocidos (17 de 47 cromosomas mutantes H1) y a realizar el análisis informático. Obtuvimos 5 haplotipos con fase establecida que estaban también presentes en el análisis del programa PHASE; además, éste generó un haplotipo relativamente frecuente que no habíamos observado en el análisis de segregación (Fig. 42).

Haplotipos	N.º de cromosomas	
	Fase conocida	Fase desconocida
H1A 6 A 7 A 2	7	(20)
H1B 5 A 7 A 2		(11)
H1C 4 A 7 A 2	1	(2)
H1D 3 A 7 A 2	7	(5)
H1E 3 A 7 A 3	1	(8)
H1F 4 A 7 A 3	1	(11)

**Figura 42.** Distribución de los haplotipos extendidos H1 asociados a los cromosomas mutantes, tanto los de fase conocida como los generados mediante análisis informático (entre paréntesis).

Cuando cruzamos los haplotipos variantes del haplotipo común H1 con los datos de la distribución geográfica de los pacientes nos dimos cuenta de que la distribución de los haplotipos H1 no era aleatoria. Al contrario, los haplotipos mostraban una tendencia a distribuirse por comarcas concretas, sobre todo por las comarcas del norte de la provincia de Alicante y del sur de la provincia de Valencia (las llamadas comarcas centrales del País Valenciano), que son las que presentan mayor prevalencia de la enfermedad (Fig. 43).



**Figura 43.** Mapa comarcal del País Valencià. (A) Distribución de los tres haplotipos extendidos H1 más frecuentes portadores de la mutación Huntington más común y antigua valenciana. Se aprecia una distribución no aleatoria. (B) Prevalencias estimadas de la enfermedad de Huntington en las comarcas centrales valencianas.

En su conjunto, los datos del análisis de marcadores y haplotipos asociados a la mutación dinámica CAG de la enfermedad de Huntington sugieren que la mutación está presente a partir de al menos dos sucesos mutacionales independientes, uno mayor asociado al alelo 7-CCG y otro menor y muy raro asociado al alelo 10-CCG. En la población valenciana habría un haplotipo H1 que representaría a la mayoría de cromosomas mutantes. Este haplotipo H1 se habría distribuido por las diversas comarcas en momentos históricos diferentes que quedarían representados por las variaciones observadas para los marcadores *D4S106* y *D4S3034*.

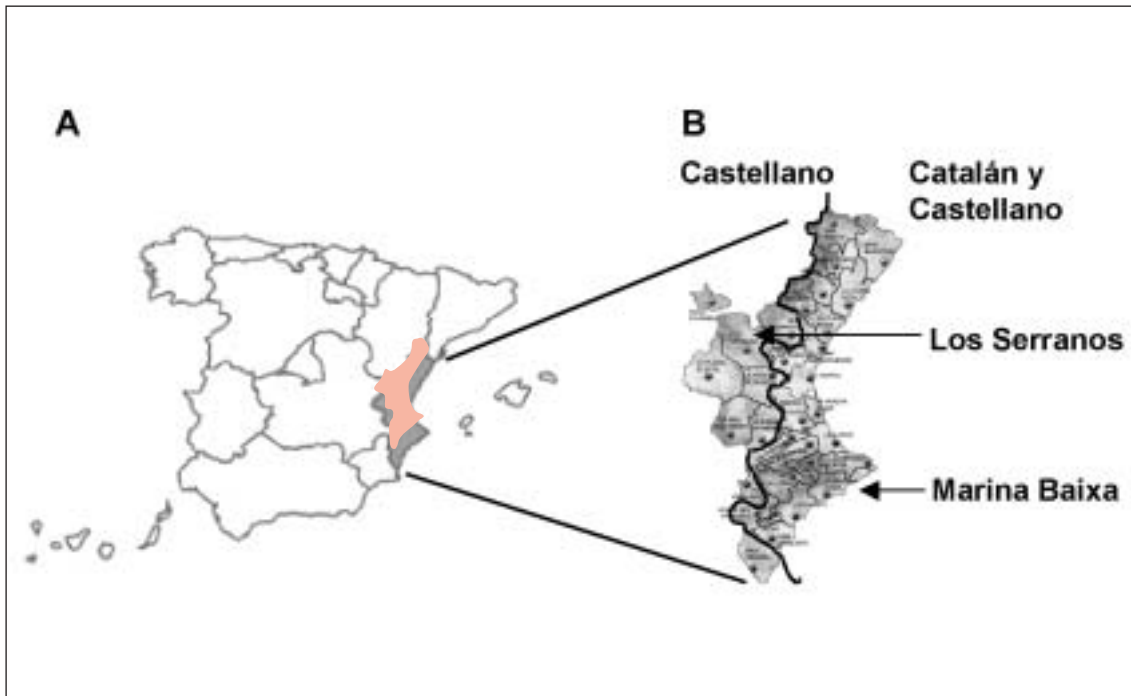
Siendo H1 el haplotipo más prevalente, nos interesamos por datar su origen. Para ello, utilizamos dos aproximaciones, una basada en la variación intraalélica de los marcadores flanqueantes y otra empleando el programa BDMC21 v2.1, fundamentado en el análisis de probabilidades de Monte Carlo ([www.rannala.org/labpages/software.html](http://www.rannala.org/labpages/software.html)). El análisis con los diversos marcadores mostró una variación entre 235 y 417 generaciones, según el método de variación intraalélica y dependiendo de los marcadores utilizados en la datación, y 500 generaciones según el método basado en Monte Carlo. La mutación tendría, pues, una antigüedad de 4.700 a 10.000 años (una generación equivalente a 20 años). Estos datos indican que la expansión más frecuente en la población valenciana,

asociada al haplotipo H1, es muy antigua y habría aparecido en la época de la expansión neolítica europea, cuando los humanos iniciaron y desarrollaron las técnicas agrícolas y se asentaron en zonas geográficas concretas.

## **2.2. Distonía de torsión DYT1**

Las distonías son trastornos que afectan a los movimientos por la contracción simultánea y no coordinada de los músculos agonistas y antagonistas, posturas anormales con ausencia de otros signos neurológicos y sin lesiones características en el sistema nervioso central. La gran mayoría tienen una causa genética, siendo la más frecuente la distonía de torsión idiopática. La causa más común de esta distonía es la mutación en el gen *DYT1* localizado en el cromosoma 9q34. La distonía DYT1 (MIM 607706) se transmite como un rasgo autosómico dominante y baja penetrancia, estimada en un 30-40 por cien de los portadores. La enfermedad se inicia normalmente en las dos primeras décadas de la vida. Los enfermos manifiestan una distonía generalizada que a menudo empieza en los miembros inferiores y se extiende progresivamente a los miembros superiores y al tronco. La mutación que se encuentra en la gran mayoría de pacientes DYT1 es la delección 946delGAG que condiciona la pérdida de un residuo de ácido glutámico en la proteína torsinaA. Esta mutación se ha encontrado en poblaciones de diverso origen, aunque es muy prevalente en la población judía ashkenazi. La mutación se origina como un suceso de novo en algunos casos esporádicos. Muy probablemente en cada población la mutación se originó como un suceso independiente.

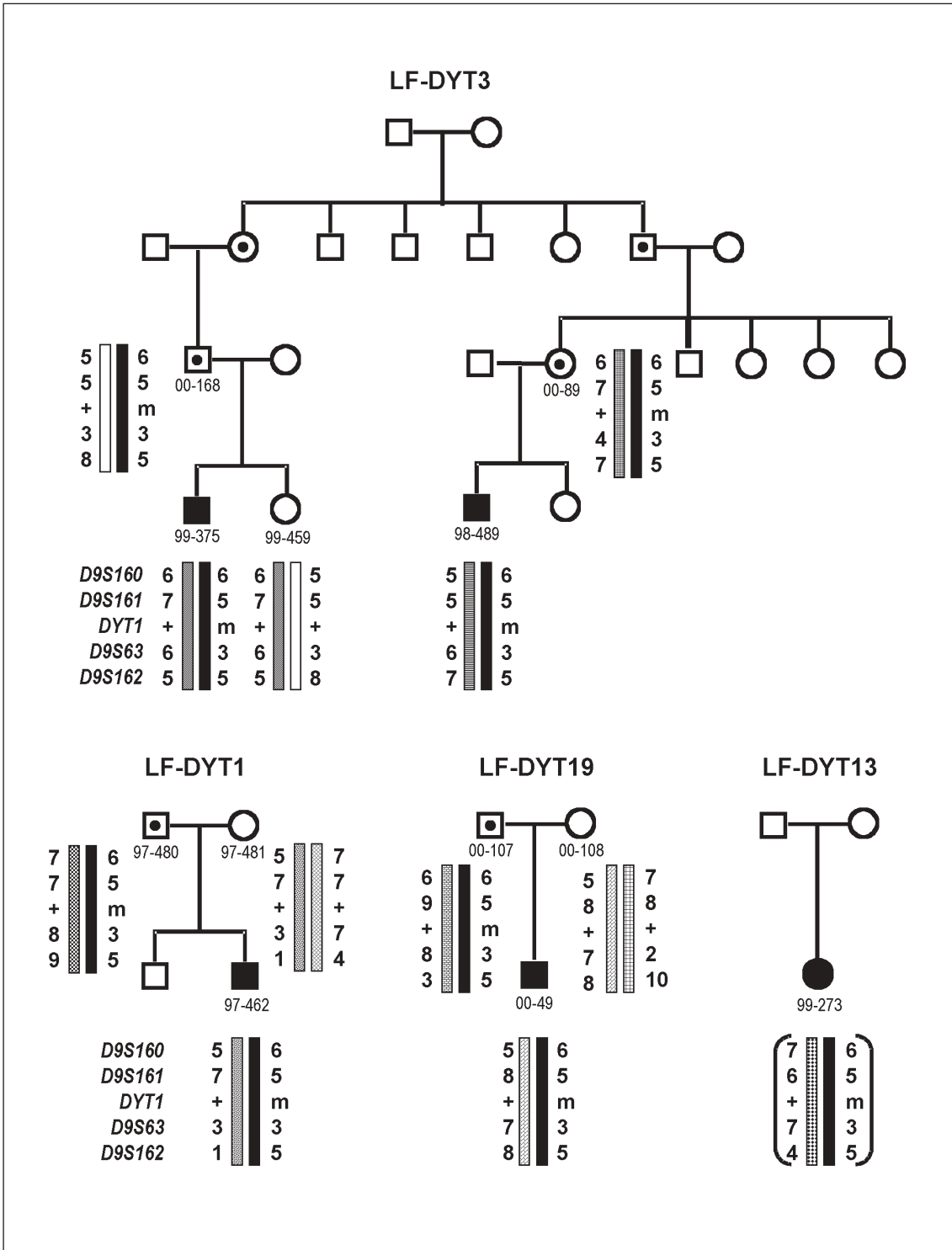
Nuestro grupo se interesó en el estudio de la distonía DYT1 en 1997. Los trabajos se centraron en dos aspectos: 1) apoyar el diagnóstico clínico y el consejo genético mediante el análisis de la mutación 946delGAG; 2) analizar el origen de la mutación en familias españolas. Para ello investigamos la mutación en una serie de 40 individuos procedentes de 22 familias valencianas no emparentadas con distonía de torsión que acudieron consecutivamente a la consulta de genética clínica (Carmona et al. 2003). Encontramos la mutación en 5 pacientes y 6 individuos no afectados de cuatro familias. Estos hallazgos indicaban que el 18 por cien de las familias podían diagnosticarse como DYT1 y que la penetrancia estaba reducida. Las familias procedían de dos áreas valencianas geográficamente y lingüísticamente diferenciadas: dos familias procedían de la comarca de Los Serranos, al noroeste de la provincia de Valencia, castellanoparlante y de carácter rural y relativamente aislada a lo largo de los siglos; las otras dos familias procedían de un mismo pueblo en la comarca catalanoparlante de la Marina Baixa, en la provincia de Alicante (Fig. 44).



**Figura 44.** Distribución de la mutación *DYT1* en Valencia. (A) Mapa de España donde se indica el País Valenciano en rojo. (B) Mapa comarcal y lingüístico del País Valenciano; las comarcas donde se habla tanto catalán como castellano se encuentran a la derecha de la línea negra, las comarcas castellanoparlantes se sitúan a la izquierda de la misma.

Ante estos datos epidemiológicos nos planteamos la siguiente hipótesis genético- poblacional: si la mutación 946delGAG tiene orígenes distintos en diferentes poblaciones y los dos grupos de familias provienen de comarcas lejanas, sin relación histórica, y pertenecientes a dominios lingüísticos distintos, la mutación debería ser consecuencia de dos sucesos no relacionados. Para demostrar nuestra hipótesis construimos haplotipos con los marcadores ligados a *DYT1* y flanqueantes del gen, *D9S160-D9S161-DYT1-D9S63-D9S162*. Para sorpresa nuestra, en todos los individuos portadores, enfermos y no enfermos, la mutación se asociaba al mismo haplotipo 6-5-3-5 (Fig. 45).

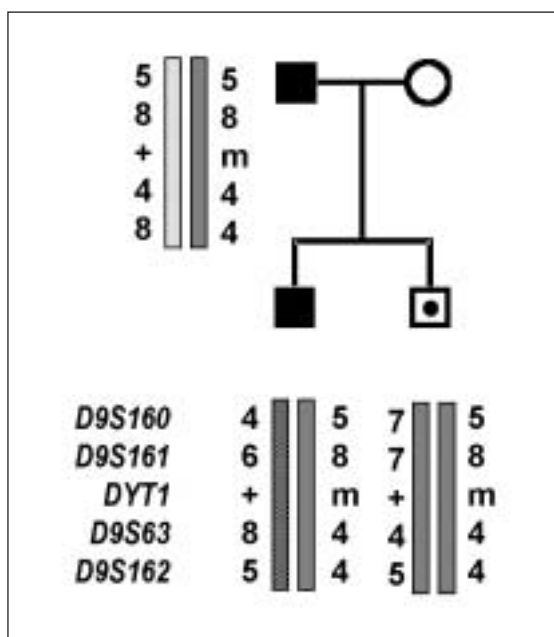
El Reino de Valencia fue creado cuando los cristianos procedentes de Aragón y Cataluña conquistaron los reinos musulmanes de Valencia y Denia en la primera mitad del siglo XIII. La distribución de los pobladores no fue homogénea a lo largo del territorio. Los asentadores castellanoparlantes, procedentes en su mayoría de Aragón, se ubicaron en comarcas interiores del país, mientras que los procedentes de Cataluña se asentaron en las comarcas costeras y gran parte de las del interior. El hecho de que en todas las familias *DYT1* valencianas la mutación 946delGAG se asociara al mismo haplotipo nos sugirió que la delección se produjo antes de la separación de ambas lenguas romances, castellano y catalán, del latín vulgar a principios del segundo milenio d.C.



**Figura 45.** Árboles genealógicos de las familias *DYT1* valencianas y análisis de haplotipos. Los cuadrados y círculos oscuros indican varones y mujeres enfermos. Los símbolos con un punto central indican individuos portadores sanos. El haplotipo común que segrega con la enfermedad se representa con una barra negra. +: alelo normal; m: mutación 946delGAG. Los cromosomas de la paciente 99-273 están entre paréntesis porque no se pudo establecer la segregación correcta.



Visto que la mutación 946delGAG tenía un único origen en las familias valencianas nos planteamos investigar familias de otras comunidades autónomas. Pudimos estudiar dos familias, una de ellas informativa para los marcadores ligados a DYT1. Esta familia procedía de un pueblo de Castilla-La Mancha. El análisis de los marcadores mostró que la mutación segregaba asociada a un haplotipo distinto al de las familias valencianas (Fig. 46). Este resultado indicaba que en la población española la mutación 946delGAG se habría producido al menos en dos sucesos independientes.



**Figura 46.** Árbol genealógico y análisis de haplotipos de la familia DYT1 procedente de Castilla-La Mancha. El haplotipo que segrega con la mutación se indica con una barra gris. Los cuadrados oscuros indican los varones enfermos. Los símbolos con un punto central indican individuos portadores sanos. +: alelo normal; m: mutación 946delGAG.

### 3. CONCLUSIONES

Los trastornos del movimiento son enfermedades graves tanto de la edad pediátrica como del adulto y, dado su componente etiológico hereditario, el diagnóstico molecular de la mutación y su utilización en el consejo genético son fundamentales en el manejo clínico de los enfermos y de sus familiares. El desarrollo y la disponibilidad de los análisis genéticos en la última década han sido básicos para ofrecer soluciones a los pacientes. Junto con la aplicación del análisis molecular y del asesoramiento genético, nuestro grupo se ha interesado por la epidemiología genética de la enfermedad de Huntington y de la distonía de torsión DYT1 en la población valenciana. Las conclusiones de estos trabajos más relevantes se resumen del siguiente modo:

- Las mutaciones expansión CAG del gen *HD-IT15* y 946delGAG son marcadores biológicos fundamentales para el diagnóstico y el consejo genético de la enfermedad de Huntington y de la distonía de torsión, respectivamente.
- Una de las aplicaciones fundamentales del análisis de la expansión CAG en la enfermedad de Huntington es el diagnóstico presintomático. Éste fue seguido por un 50 por cien de los individuos a riesgo de las familias con la enfermedad en las consultas de Neurología y de Genética; en términos generales, el programa de diagnóstico presintomático de Huntington está funcionando muy bien y ofrece una herramienta de primer orden para el manejo clínico y consejo genético de los pacientes y de las familias, así como una oportunidad de diseño vital personal a las personas a riesgo.
- La expansión CAG de la enfermedad de Huntington se originó en la población valenciana al menos en dos sucesos mutacionales independientes, uno principal o mayor que afecta a la gran mayoría los cromosomas mutantes, y un segundo muy raro.
- La mutación mayor se asocia al haplotipo que hemos denominado H1. El análisis de este haplotipo nos ha sugerido que la mutación asociada es muy antigua, habiéndose probablemente producido hace 4.700 a 10.000 años, cuando se produjo la expansión neolítica en Europa.
- La distribución geográfica de la mutación asociada al haplotipo mayor H1 no es aleatoria. Los haplotipos variantes se distribuyen por comarcas concretas. Estas asociaciones de haplotipos variantes H1 con comarcas específicas sugieren que la mutación fue distribuyéndose en distintos movimientos migratorios por las comarcas valencianas centrales.
- La mutación 946delGAG de la distonía de torsión DYT1 tiene un único origen en las familias valencianas y, probablemente, se originó hace aproximadamente 1.000 años antes de la divergencia del castellano y del catalán del latín.
- La deleción 946delGAG se ha producido en la población española al menos en dos sucesos independientes.

#### **4. PUBLICACIONES**

##### **Enfermedad de Huntington: genética clínica, diagnóstico presintomático y origen de la mutación**

- **García-Planells J**, J.A. Burguera, P. Solís, J.M. Millán, D. Ginestar, **F. Palau**, **C. Espinós**. Ancient origin of the CAG expansion causing Huntington disease in a Spanish population. *Hum Mutat* 2004 (en prensa).
- Solís P., **F. Palau**, J.A. Burguera, A. Salazar. Enfermedad de Huntington: estudio clínico y genético en una población española. *Neurología* 1995; 10: 362-366
- Solís-Pérez M.P., JA Burguera, **F. Palau**, L. Livianos, M. Vila, L. Rojo. Resultados de un programa de diagnóstico presintomático en la enfermedad de Huntington: evaluación de un período de 6 años. *Neurología* 2001;16:348-352.

##### **Distonía de torsión**

- **Carmona J.**, J.A. Burguera, **B. Mollà**, F. Mulas, P. Smeyers, F. Carratalà, J. García de Yébenes, J. Hoenicka, **F. Palau**. Unique origin and low penetrance of the 946delGAG mutation in Valencian DYT1 families. *Clin Genet* 2003;64:151-157.

##### **Tesis Doctorales**

##### **Genética y epidemiología de las mutaciones dinámicas producidas por la expansión del trinucleótido CAG**

Javier García Planells

Universitat de València, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Genética  
2003 Sobresaliente *cum laude*

# CAPÍTULO IV

## DISTROFIAS MUSCULARES

### **1. INTRODUCCIÓN**

El término distrofia muscular hace referencia a un grupo importante y amplio de miopatías hereditarias, clínicamente y genéticamente heterogéneas, que se caracterizan por debilidad y atrofia musculares progresivas. Entre las más frecuentes se encuentran las distrofinopatías, que incluyen las distrofias musculares de Duchenne y Becker con una incidencia de 1 caso cada 3.500 recién nacidos vivos para la forma grave de Duchenne, la distrofia miotónica con una prevalencia de 1 cada 8000 individuos y la distrofia facio-escapulohumeral que tiene una prevalencia de 1 cada 20.000 individuos. Otras distrofias musculares son las distrofias congénitas, las distrofias de cinturas y la distrofia de Emery-Dreyfus. Todas ellas se heredan con carácter mendeliano. En el seno de nuestro grupo el estudio de las distrofias musculares ha tenido una orientación fundamentalmente clínica y asistencial, abordándose globalmente el análisis molecular, el consejo genético y el diagnóstico prenatal. Nuestro grupo inició el estudio de las distrofinopatías en 1991 y la distrofia miotónica y la distrofia facioescapulohumeral en 1992.

### **2. HALLAZGOS Y CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS**

#### **2.1. Distrofinopatías**

Las distrofinopatías son trastornos neuromusculares causados por mutaciones en el gen de la distrofina o *DMD*. El espectro clínico incluye las formas clásicas y graves como la distrofia muscular de Duchenne (DMD; MIM 310200), la forma de inicio más tardío como es la distrofia muscular de Becker (BMD; MIM 300376) y las variantes más leves como son el síndrome de mialgias-calambres y la hiperckemia. El gen *DMD* se encuentra en el brazo corto del cromosoma X, por lo que estas enfermedades se heredan con carácter recesivo ligado al X.

La DMD tiene una de las tasas de mutación más altas conocidas en el hombre: 1 mutación cada 10.000 gametos por generación. En un tercio de los pacientes no hay historia familiar previa, considerándose, pues, que la enfermedad se produce por una mutación *de novo*, bien en la madre, bien en uno de los abuelos maternos. Generalmente, la debilidad muscular se inicia entre los dos y tres años de edad aunque su aparición puede

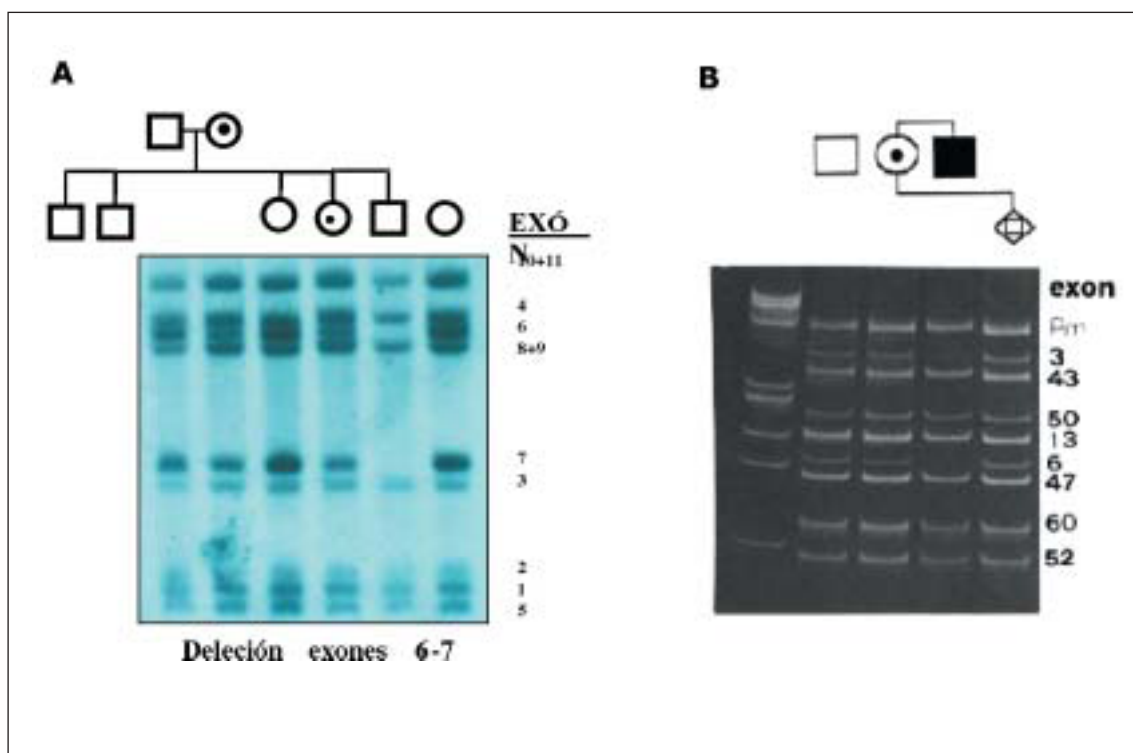
retrasarse. El niño tiene dificultad para correr, saltar, subir escaleras e incorporarse del suelo. Presenta una marcha patosa, lordosis lumbar e hipertrofia de las pantorrillas. La debilidad muscular afecta selectivamente a la musculatura proximal empezando por los miembros inferiores. El músculo cardíaco también está afectado y se ha descrito retraso mental en algunos pacientes. Los niños necesitan silla de ruedas antes de los 12 años y fallecen hacia el final de la segunda década o principio de la tercera de la vida. La DMB manifiesta un cuadro clínico similar pero con un curso natural mucho más leve, aunque variable, con un inicio más tardío, debilidad menos marcada y progresión más lenta. Estos pacientes típicamente mantienen la deambulación más allá de los 16 años y suelen sobrevivir después de los 30 años.

El gen de la distrofina fue uno de los primeros en aislarse en 1987 merced a la estrategia de la clonación posicional. La genética molecular del gen *DMD* se resume en los siguientes puntos: 1) localización en Xp21.2; 2) un tamaño de 2,3 Mb, con un total de 79 exones y 13,9 kb de ORF o pauta de lectura; 3) se expresa en músculo esquelético y cardíaco y, también en tejido nervioso, retina y otros tejidos aunque en menor medida; 4) se regula de un modo complejo teniendo secuencias promotoras específicas de tejido cerebral, muscular, célula de Purkinje, retina y otros; 5) en el 65 por cien de los casos la mutación es una delección de tamaño variable, mientras que en un 5 por cien la mutación es una duplicación y en el resto de pacientes la patología molecular es una mutación puntual; 6) la variabilidad clínica, especialmente la relativa a la forma Duchenne versus la forma Becker, se explica mayoritariamente por la hipótesis de la ruptura (*DMD*) o no (*DMB*) de la pauta de lectura del gen delecionado.

En el estudio de las primeras 40 familias que se remitieron al programa de Neurogenética para análisis del gen *DMD* encontramos una delección en el 42,5 por cien de ellas. Este resultado nos sugirió que algunos de los pacientes estudiados realmente no padecían una distrofinopatía sino algunas de las formas graves de distrofias de cinturas (Palau 1992; Navarrete et al. 1993). En relación con los fenotipos alélicos Duchenne y Becker, pudimos confirmar la hipótesis de la pauta de lectura. Únicamente hubo dos excepciones, dos hermanos con una delección del exón 5, delección en pauta y fenotipo Duchenne, y un paciente con delección de los exones 3-7 en los que hay pérdida de la pauta de lectura y sin embargo mostraba un fenotipo Becker. En ambos casos las delecciones involucraban los exones 3 al 7 de la región 5' en la que se han descrito más excepciones a la regla de la pauta de lectura del gen.

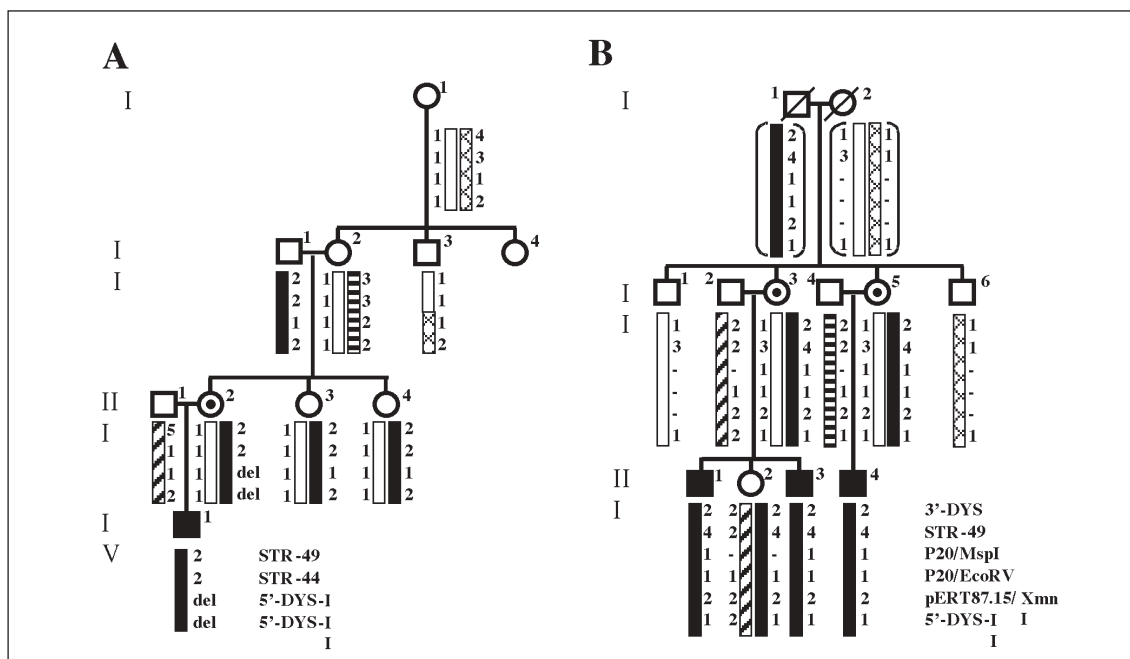
Durante la década de los noventa estudiamos aproximadamente 200 familias con alguna forma clínica de distrofinopatía, siendo la mayoría *DMD*. En esta enfermedad el conse-

jo genético es una herramienta fundamental para el manejo clínico de los pacientes y de sus familiares, especialmente de las mujeres -madres y hermanas- por el carácter de enfermedad muy grave con transmisión ligada al X. Las mujeres con hijos enfermos y antecedentes familiares son portadoras obligadas y su riesgo de transmisión de la enfermedad a los hijos varones y del rasgo de portadora a las hijas es del 50 por cien. Por el contrario, en el caso cada vez más frecuente de los casos aislados sin antecedentes en la familia, la madre del enfermo tiene un riesgo a priori de que sea portadora de un tercio. En este contexto clínico y genealógico, el diagnóstico molecular de los pacientes y de las mujeres de su familia se convierte en una técnica básica para establecer si son o no portadoras. Además, el diagnóstico prenatal es una herramienta de primer orden en el consejo genético que se ofrece a las familias. El análisis molecular se realiza, en primer lugar, buscando deleciones del gen DMD mediante técnicas de transferencia de Southern (Fig. 47A) y de PCR múltiple (Fig. 47B)



**Figura 47.** Análisis molecular del gen DMD. (A) Transferencia de Southern en una familia con un hijo afectado de distrofia muscular de Duchenne en que se detecta una deleción de los exones 6 y 7. El estudio de la dosis génica de estos dos exones demuestra que la madre (carrera 2) y de una hermana (carrera 5) son portadoras de la deleción, mientras que la otra hermana (carrera 4) no lo es. (B) PCR múltiple de nueve exones del gen DMD. El paciente es portador de una deleción de los exones 3 al 7 (en al imagen se aprecia la falta de amplificación de los exones 3 y 6 incluidos en el protocolo de análisis múltiple). La hermana se había diagnosticado previamente de portadora. El análisis del DNA del la vellosidad corial del feto varón se observa las bandas amplificadas de los exones 3 y 6, lo cual indica que el niño no es portador y no padecerá la enfermedad.

Cuando el diagnóstico directo de la mutación no es posible la segunda herramienta que se puede emplear es el análisis indirecto con marcadores ligados. Se establece el haplotipo asociado a la enfermedad en el paciente probando y se sigue su segregación en los miembros de la familia. El análisis de haplotipos es útil no sólo para diagnosticar las portadoras en los casos familiares sino también cuando se está ante un caso esporádico (Fig. 48A). Otros de los problemas que se presentan con cierta frecuencia y que requiere el análisis de haplotipos es el denominado mosaicismo germinal (Fig. 48B).

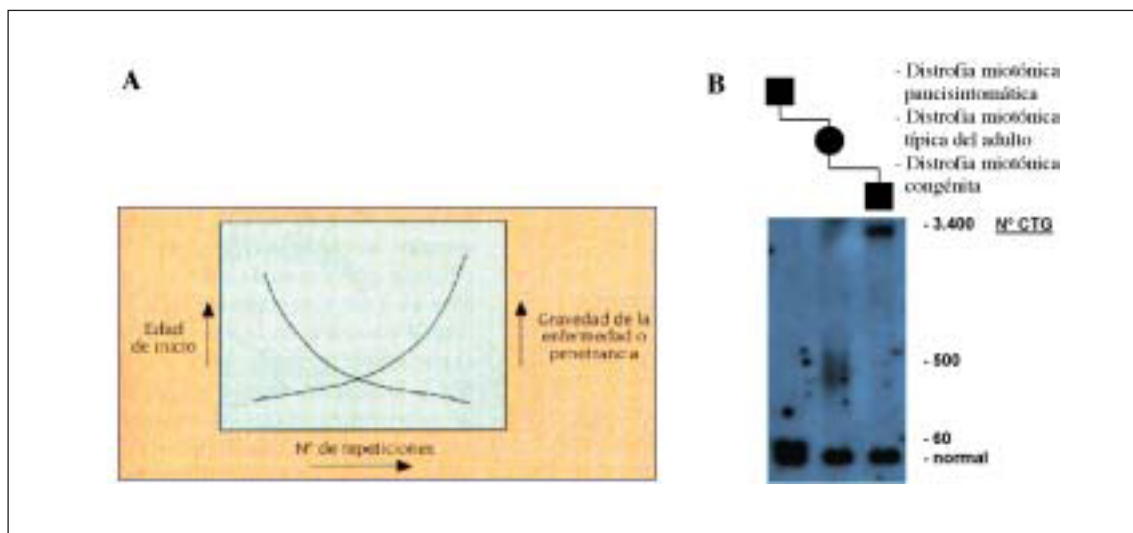


**Figura 48.** Aplicación de marcadores ligados al gen DMD y haplotipos construidos con ellos en dos ejemplos de análisis genético familiar de distrofia muscular de Duchenne. El análisis se hizo con marcadores microsatélites flanqueantes e intragénicos y marcadores RFLP intragénicos. (A) Análisis familiar de un caso esporádico portador de una deleción de los promotores cerebral (Pc) y muscular (Pm) en el gen DMD. La madre es portadora y se observa que la mutación se produjo en la células germinales del abuelo materno como mutación de novo; de ahí se infiere que las tías maternas del probando no son portadoras. (B) Se trata de una familia con dos hermanos y un primo hermano enfermos, de lo que se infiere que las respectivas madres son portadoras; al análisis de haplotipos muestra que la mutación se produjo en las células germinales del abuelo y que éste sería portador de un mosaicismo de grado variable y desconocido en sus espermatoцитos.

## 2.2. Distrofia miotónica

La distrofia miotónica (DM1; MIM 160900) es un trastorno muscular y sistémico genético que se caracteriza por debilidad muscular y se acompaña de miotonía y de anomalías específicas sistémicas tales como las cataratas oculares precoces, dismorfología facial, atrofia testicular, calvicie precoz en varones, fallo renal, hiperinsulinismo y anomalías de la conducción cardíaca. Originalmente se consideró como una alteración confinada a la vida adulta, sin embargo, se ha establecido claramente que también se presenta en la edad pediátrica, mereciendo especial atención la forma grave congénita que aparece ya en la época neonatal como un síndrome hipotónico.

Hasta hace poco se venía pensando que la DM presentaba homogeneidad genética. Recientemente, se ha descrito una segunda forma clínica, con mayor afectación de la musculatura proximal, que está causada por un segundo gen (DM2; MIM 602668). La mutación de la mayoría de familias y pacientes con distrofia miotónica, o DM1, es la expansión de un trinucleótido CTG en la región 3' no traducida (3'-UTR) del gen de una proteinquinasa, *DMPK*, localizado en el cromosoma 19q13 (el gen DM2 se encuentra en el cromosoma 3q). Los cromosomas normales DM1 muestran una variabilidad en el número de repeticiones entre 5 y 37 CTGs, mientras que los cromosomas DM1 mutantes son portadores de expansiones que varían entre 50 en casos adultos paucisintomáticos y más de 1.000 en formas congénitas. Aunque la longitud de la expansión CTG tiene una buena correlación con la gravedad de la enfermedad, los sucesos de mutaciones somáticas mitóticas y la variación en la propia línea germinal participan en la variabilidad fenotípica. Uno de los fenómenos genéticos y clínicos llamativos de las mutaciones dinámicas inestables, descrito por primera vez asociado con la distrofia miotónica, es la anticipación. La anticipación genética se define como el proceso biológico, genealógico y clínico por el cual los individuos de generaciones recientes de una familia desarrollan la enfermedad más precozmente y expresan un cuadro clínico más grave. La anticipación muestra una buena correlación inversa con el tamaño de la expansión: las formas más graves se asocian con un inicio más temprano de la enfermedad (Fig. 49).



**Figura 49.** Anticipación genética. (A) Gráfico representativo de la correlación entre la edad de inicio y gravedad de la enfermedad y el número de repeticiones (Palau 1999). (B) Análisis de Southern con la sonda p5B1.4 y digestión enzimática con *SacI* en tres miembros de una familia DM1, abuelo materno, madre y probando con formas paucisintomático, clásica del adulto y congénita, respectivamente. Se observa el tamaño mayor de la expansión en el cromosoma mutante del neonato y muy pequeña en el DNA del abuelo; también se aprecia el mosaicismo en el DNA de la sangre materna.



En nuestro grupo hemos aplicado el análisis molecular de la expansión CTG en más de 100 familias con distrofia miotónica (Navarrete Hervás, Tesis Doctoral 1995). Dada la gravedad de las formas congénitas, el consejo genético y el diagnóstico molecular han sido muy importantes en la práctica clínica genética. De hecho, junto con la distrofia muscular de Duchenne, la distrofia miotónica ha sido la solicitud mayor de diagnóstico prenatal en el programa de Neurogenética del H. U. La Fe llevado a cabo en el seno de nuestro grupo.

En el contexto de estos estudios observamos que la formas congénitas seguían un patrón sexual sesgado. En un primer estudio de 20 familias DM1, catorce de ellas con un caso o más de distrofia miotónica congénita, observamos que los recién nacidos con la enfermedad congénita eran siempre hijos de madres portadoras y, mayoritariamente, nietos de abuelos portadores. En el análisis de Southern observamos que los casos probando congénitos eran portadores de expansiones de más de 3 kb (1.000 repeticiones CTG), las madres tenían mutaciones con tamaños variables entre 150 y 1.000 repeticiones y frecuente mosaicismo somático, mientras que los abuelos son portadores de expansiones de menos de 150 repeticiones, denominadas premutaciones. Observamos en la serie, pues, una correlación entre el número de unidades CTG y el fenotipo clínico, así como un sesgo sexual (Navarrete Hervás et al. 1993). Este hallazgo sugería que la premutación debería transmitirse a través de un varón para poder alcanzar una inestabilidad meiótica que facilitaría la posterior expansión intergeneracional (López de Munain et al. 1995).

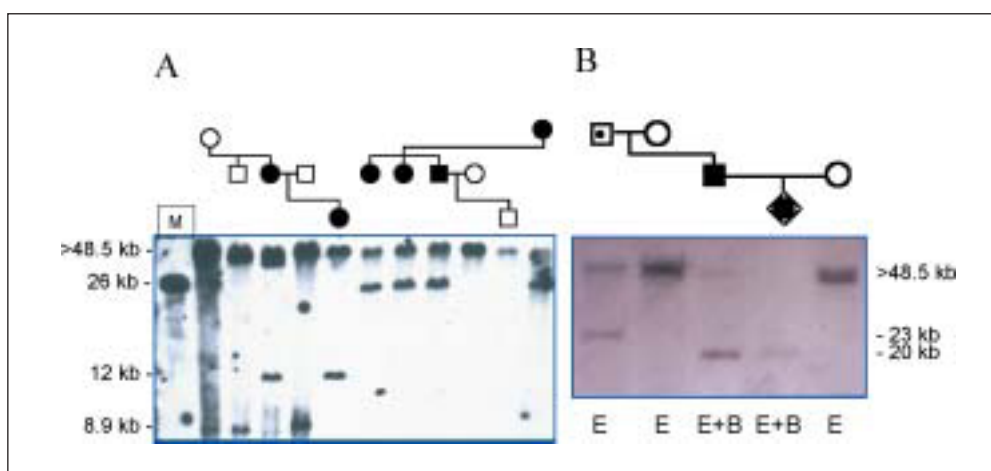
Como hemos comentado, la distrofia miotónica no es estrictamente un trastorno muscular sino una enfermedad sistémica. Nosotros hemos encontrado asociaciones poco frecuentes tales como disfunción mental, demencia subcortical y déficit de complejo III de la cadena respiratoria (Seijo-Martínez et al. 2003) o carcinoma basocelulares múltiples (Bañuls et al. 2004).

### **2.3. Distrofia facioescapulohumeral**

La distrofia facioescapulohumeral (FSH; MIM 158900) es un trastorno del músculo esquelético con herencia autosómica dominante y expresividad variable. Alrededor del 95 por cien de los pacientes muestran algún rasgo a la edad de 20 años. Una proporción de pacientes son casos esporádicos consecuencia de neomutaciones. El locus FSH se localizó en el año 1990 en el cromosoma 4q35. La mutación asociada a la FSH es el reordenamiento de una región telómerica que contiene elementos D4Z4 de 3,3 kb repetidos reconocibles por la sonda p13E-11 (locus *D4S104S1*) tras la digestión del DNA con la enzima *EcoRI*. El

número de estas repeticiones varía en la población general y se considera como mutación cuando el fragmento de DNA resultante tiene un tamaño menor de 35 kb, consecuencia de la delección de varios elementos repetitivos (Fig. 50A). Se postula que la delección acercaría algún gen al telómero con una función en el sistema muscular y ejercería sobre él un efecto posicional patogénico. La sonda p13E-11 no sólo reconoce el locus *D4S104S1* sino también otro locus en el cromosoma 10q26, no relacionado con la enfermedad. Esta región puede ser también polimórfica y plantear problemas de especificidad de la técnica de detección de la mutación. Sin embargo, la utilización de una doble digestión *EcoRI/BlnI* permite diferenciar entre los dos loci 4q35 y 10q26. En el caso de que el reordenamiento por delección se haya producido en el cromosoma 4q35, relacionado con la enfermedad, la doble digestión reduce en 3 kb el tamaño la banda anormal que aparece con la digestión simple con *EcoRI* (Fig. 50B) (Baiget et al. 2004).

Nuestro grupo fue el primero en implementar y desarrollar el diagnóstico molecular de la distrofia facioescapulohumeral en España, dentro del programa de Neurogenética. Durante diez años fuimos centro de referencia para todo el país, estudiándose 120 familias. El análisis estaba orientado a apoyar el diagnóstico clínico y el diagnóstico de portadores y consejo genético. Además, aunque las solicitudes no eran frecuentes, en gran medida por tratarse de una enfermedad mayoritariamente del adulto (Palau 1998), se realizó el diagnóstico prenatal en tres ocasiones (Fig. 50B)



**Figura 50.** Análisis molecular del reordenamiento del locus *D4S104S1*. (A) Análisis de Southern tras digestión con *EcoRI* e hibridación con la sonda p13E-11 en dos familias con FSH. En la primera familia la enfermedad se asocia a un fragmento de 12 kb y en la segunda familia con un fragmento de 26 kb, ambos por debajo de límite normal de 35 kb. (B) Diagnóstico prenatal en una familia con un reordenamiento de 23 kb. El abuelo paterno es portador asintomático de la mutación. En la carrera 3 se muestra una banda de 20 kb tras la doble digestión *EcoRI* y *BlnI*, que reduce la banda de 23 kb en tres kb indicando que corresponde al locus del cromosoma 4q35. En la carrera 4 se analiza la muestra de DNA fetal obtenida por biopsia de vellosidad corial, observándose la banda *EcoRI* + *BlnI* de 20 kb lo que confirma que el feto es portador de la mutación.

### 3. CONCLUSIONES

- La mutación más frecuente de las distrofias musculares de Duchenne y de Becker es la delección del gen *DMD*.
- Las delecciones que condicionan la pérdida de lectura del gen *DMD* se suelen expresar con fenotipo grave Duchenne. Por el contrario, aquellas que no alteran la pauta de lectura se expresan con fenotipo Becker y también otros fenotipos leves como el síndrome de mialgias-calambres.
- La genética y, por ende, el análisis molecular de la distrofinopatías es compleja. Combina el diagnóstico directo de delecciones y duplicaciones (mutaciones puntuales en centros especializados) mediante PCR múltiple y transferencia de Southern y el diagnóstico indirecto empleando marcadores intragénicos e flanqueantes ligados. En el estudio hay que tener en cuenta si se trata de un caso familiar o esporádico y fenómenos como la recombinación intragénica y el mosaicismo germinal.
- La distrofia miotónica DM1 está causada por la expansión del triplete CTG en el gen *DMPK*, cuyo tamaño se correlaciona con el fenotipo clínico y el fenómeno de anticipación.
- La distrofia miotónica congénita muestra un patrón genealógico sexual sesgado cuya causa no está bien definida. Podría deberse a que la expansión del triplete CTG por inestabilidad meiótica requiere el paso por espermatogénesis y ovogénesis para alcanzar los tamaños asociados con la forma congénita.
- La distrofia facioescapulohumeral se debe a reordenamientos de elementos D4Z4 en el locus D4S104S1 del cromosoma 4q35. En el diagnóstico es fundamental distinguir este locus del locus en el cromosoma 10q26.
- Las solicitudes de diagnóstico molecular y consejo genético de estas distrofias musculares son frecuentes y, dada sus características clínicas (en muchas ocasiones son enfermedades graves), su genética mendeliana y molecular y la asociación con fenómenos genéticos particularmente frecuentes como la recombinaciones intragénicas o el mosaicismo germinal en el gen *DMD* o la anticipación en la distrofia miotónica, el diagnóstico prenatal y el diagnóstico preimplantarorio son herramientas de primer orden en su manejo clínico.

#### **4. PUBLICACIONES**

- Baiget M., **F. Palau**, V. Volpini, Ayuso C. Patología Molecular II: enfermedades neuromusculares, neurodegenerativas y neursensoriales. En: *Tratado de Medicina Interna Farreras/Rozman*. C. Rozman ed. 15ª edición, 2004 pp. 1235-1251
- Bañuls J., R. Botella, **F. Palau**, R. Ramón, C. Díaz, A. Payá, L. Carnero, G. Vergara. Tissue and tumor mosaicism of the myotonin protein kinase gene trinucleotide repeat in a patient with multiple basal cell carcinomas associated with myotonic dystrophy. *J Am Acad Dermatol* 2004;50 (suppl. 2):1-3.
- López de Munain A., A.M. Cobo, J.J. Poza, D. Navarrete, L. Martorell, **F. Palau**, J. Emparanza, M. Baiget. Influence of the sex of transmitting grandparent in congenital myotonic dystrophy. *J Med Genet* 1995; 32: 689-691.
- **Navarrete D., J. García Tena, F. Palau**. Patología molecular de la distrofia muscular de Duchenne/Becker y de la distrofia miotónica congénita. Premios Ordesa 1993 a la Investigación Pediátrica, Laboratorios Ordesa, pp. 89-121, 1993.
- **Palau F**. Análisis molecular y genético de las distrofias musculares de Duchenne y Becker: aplicación al diagnóstico y pronóstico, y a la detección de portadoras. *Bol Soc Val Pediatr* 1992;12:89-96.
- **Palau F**. Diagnóstico prenatal de enfermedades neurodegenerativas del adulto. *Prog Diagn Pren* 1998;10:109-116.
- Seijo-Martínez M., M. Castro del Río, Y. Campos, **F. Palau**, J. Arenas, S. Tejeira, R. Fernández Hojas, C. Navarro. Unusual clinical findings and complex III deficiency in a family with myotonic dystrophy. *J Neurol Sci* 2003;208:87-91.

#### **Tesis Doctorales**

##### **Genética y Patología Molecular de la Distrofia Miotónica**

Dolores Navarrete Hervás

Universitat de Valencia, Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica y Biología molecular

1995 Apto *cum laude*





MINISTERIO  
DE TRABAJO  
Y ASUNTOS SOCIALES

REAL PATRONATO  
SOBRE DISCAPACIDAD

