

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.

ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS HEREDITARIAS

GENES, MUTACIONES, CLÍNICA Y EPIDEMIOLOGÍA GENÉTICA(I)

Francesc Palau Martínez, Ana Cuesta Peredo, Javier García Planells, Pilar González Cabo, Laia Pedrola Vidal, Reyes Claramunt Alonso, Carmen Espinós Armero ⁽²⁾

Hasta los años 50 del pasado siglo la genética humana se basó en el análisis generalógico 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.

(1) Síntesis de los trabajos galardonados con la dotación para España de los Premios Reina Sofía 2004, de Prevención de Deficiencias. Una versión más amplia de estos trabajos ha sido publicada por el Real Patronato en su serie Documentos (67/2005).

(2) Unidad de Genética y Medicina Molecular, Instituto de Biomedicina de Valencia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

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 las monogénicas con herencia mendeliana, como las enfermedades comunes con herencia multifactorial o compleja.

El número de enfermedades monogénicas es mayor de seis mil. 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. La mayoría de ellas se encuadran hoy en día bajo el concepto de enfermedades raras, de manera que tanto el conjunto como cada una de ellas adquieran mayor visibilidad social. Un grupo importante de estos trastornos monogénicos afecta al sistema nervioso. Las enfermedades neurológicas hereditarias, bien neurodegenerativas, bien neuromusculares, 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, esperanzadoramente, conseguir tratamientos eficaces en un plazo de tiempo relativamente corto.

Con la memoria presentada al Premio Reina Sofía 2004, de Prevención de Deficiencias, se ha querido mostrar de un modo resumido los estudios y hallazgos de laboratorio y las publicaciones científicas de la Unidad de Genética y Medicina Molecular del Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV) del Consejo Superior de Investigaciones

Científicas (CSIC), en el campo de la genética molecular de las enfermedades neurológicas, 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 el director del mismo, Francesc Palau, se incorporó 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 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. 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.

La memoria refleja la labor científica y clínica de los 15 años de trayectoria del grupo en relación con tres grandes áreas de investigación de las enfermedades neurológicas; éstas son: 1) aislamiento y caracterización de genes mediante la estrategia de la clonación posicional, destacando la participación directa en el seno del grupo colaborativo internacional que aisló el gen *FRDA* de la ataxia de Friedreich en 1996 y el descubrimiento en 2002 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, especialmente, en la población valenciana. El trabajo se ha estructurado 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 las siguientes páginas se pretende mostrar un extracto de los trabajos científicos más relevantes e indicar cuáles han sido las conclusiones más significativas. Al mismo tiempo, se citan algunos de los artículos donde se han publicado estos hallazgos.

ATAXIAS HEREDITARIAS

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 espinocerebelosas 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.

Ataxia de Friedreich

La forma más frecuente de ataxia hereditaria es la ataxia de Friedreich (FRDA) con una prevalencia de 4,7 por cada 100.000 habitantes, 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.

El gen *FRDA* se localizó en 1988 en el cromosoma 9 por el grupo de Sue Chamberlain de la Escuela de Medicina del Hospital St. Mary's de Londres. A lo largo de los siguientes años varios grupos trabajamos intensamente con el objetivo de aislar y caracterizar el gen y sus mutaciones. En nuestro laboratorio pudimos encontrar dos familias en las que detectamos dos recombinantes genéticos que orientaron la dirección hacia la que había que buscar genes: si el locus del gen *FRDA* estaba en una región del cromosoma 9, concretamente 9q13, los esfuerzos se debían dirigir hacia

el centrómero del cromosoma. Posteriormente, con el análisis de nuevas familias y aplicando la estrategia de cartografiado por homocigosidad, pudimos acotar la región crítica candidata a 150 kilobases (kb). Mientras tanto otros investigadores habían descartado una serie de genes; sin embargo, en esta región había un transcrito, X25, que resultó ser el gen *FRDA*. Este descubrimiento fue realizado por el grupo colaborativo internacional, al que nosotros estábamos incorporados, liderado por los doctores Michel Koenig en Estrasburgo, Francia, y Massimo Pandolfo en Houston, Texas. Era 1996 y habían pasado ocho años desde que se había definido la localización del gen en el genoma humano. Pero no sólo se descubrió el gen sino también un nuevo tipo de mutación, la expansión del trinucleótido GAA (guanina-adenina-adenina), como la mutación más frecuente asociada a la enfermedad. Esta mutación se encuentra en el 98 por cien de los cromosomas mutantes y se caracteriza por ser una mutación dinámica, con inestabilidad meiótica, la primera descrita en un trastorno con herencia autosómica recesiva. Los enfermos eran y son en su mayoría homocigotos para la expansión del triplete GAA, es decir, portadores de dos alelos expandidos, uno procedente de su padre y otro de su madre, siendo ambos progenitores portadores heterocigotos sanos.

Durante el período comprendido entre 1994 y 2000 procedimos a estudiar los aspectos genéticos de la enfermedad, su distribución poblacional, las características de la expansión GAA y la caracterización de otras mutaciones menos frecuentes. Nuestros trabajos nos permitieron definir el comportamiento de la expansión GAA durante la meiosis paterna y materna, esto es, cómo se modifica en la transmisión intergeneracional de progenitores a hijos enfermos e hijos sanos portadores, y caracterizamos una serie de mutaciones puntuales en el otro cromosoma mutante de los pacientes que eran portadores de una única expansión.

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 de los miembros inferiores es uno de los signos principales para el diag-

nóstico clínico. Nos propusimos, pues, averiguar si las formas clínicas con reflejos conservados eran consecuencia de mutaciones en un segundo gen. Para ello 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). El estudio de la mutación en enfermos con este fenotipo FARR y otros fenotipos variantes como el inicio tardío (LOFA en la siglas inglesas) nos permitió demostrar que la ataxia de Friedreich es una enfermedad genéticamente homogénea pero con gran variabilidad en sus manifestaciones clínicas.

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 y prenatal.

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.

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

ATAXIAS

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.

Ataxia de Friedreich

La forma más frecuente de ataxia hereditaria es la ataxia de Friedreich (FRDA) con una prevalencia de 4,7 por cada 100.000 habitantes, 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.

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.

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. Una de las aplicaciones clínicas más importantes es el diagnóstico prenatal a parejas con un hijo enfermo. Hoy en día el diagnóstico prenatal se puede combinar con el diagnóstico preimplantatorio.

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, que son 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, un gran heterogeneidad genética. Hasta el momento actual se han descrito hasta 25 loci genéticos asociados con las ataxias espinocerebelosas autosómicas dominantes del adulto, algunos de ellos en una única familia. Estos loci y sus genes se han denominado globalmente como genes SCA y un dígitos asociado. En un número importante de ellas se han caracterizado el gen y la mutación. En la mayoría de los casos se trata de una mutación dinámica por expansión del trinucleótido CAG (citosa-adenina-guanina) en la pauta abierta de lectura o región codificante del gen que se traduce en un tracto de poliglutaminas tanto en la proteína salvaje como en la mutante.

Genética de la ataxia espinocerebelosa SCA6

Esta forma de ataxia merece una mención especial en nuestro trabajo. 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. 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. Observamos también que, al contrario de otras expansiones CAG, la repetición SCA6 se transmitía estable durante la meiosis.

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-palidoluisiana, un trastorno degenerativo que se confunde frecuentemente con una ataxia tardía. 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. 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 de 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.

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 las 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. En este contexto, las conclusiones de las investigaciones genéticas y aplicaciones clínicas de las ataxias hereditarias que 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.

NEUROPATÍAS PERIFÉRICAS HEREDITARIAS

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 distinguen 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 heterogeneidad 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. 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.

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 las sucesivas generaciones con carácter dominante. El mecanismo genético que se había postulado era el entrecruzamiento desigual entre cromátides durante la meiosis. En 1993 se demostró que el producto recíproco del entrecruzamiento, esto es, una delección, era la causa de

otro tipo de neuropatía desmielinizante, la neuropatía hereditaria con susceptibilidad a la parálisis por presión. Nosotros nos propusimos estudiar el origen de la duplicación en las células germinales de los progenitores de pacientes que mostraban la duplicación como una mutación *de novo*. El análisis de una serie de pacientes españoles y belgas demostró que la duplicación se produce mayoritariamente en la espermatogénesis paterna.

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 baja. 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. 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, CMT1B y CMTX, respectivamente. Encontramos que la duplicación era la mutación más frecuente afectando al 68% de las familias, una cifra muy similar a la obtenida en el conjunto de familias europeas. Investigamos la presencia de mutaciones en los genes reseñados obteniendo los siguientes resultados: las mutaciones en el gen *GJB1*, que codifica la proteína Cx32, se encontraban en 10 familias (7,5%), en el gen *MPZ* se encontró 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%). 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 estas formas mendelianas son más frecuentes como consecuencia de una mayor tasa de consanguinidad.

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

En 1997 iniciamos un proyecto de cartografiado genómico con el objetivo de localizar e identificar el gen causante de una forma grave de neuropatía CMT que nuestros colegas del Servicio de Neurología del H. U. La Fe habían descrito en dos familias. La enfermedad se caracterizaba por el inicio muy precoz en la infancia, neuropatía axonal, disfonía por parálisis de cuerdas vocales y herencia autosómica recesiva.

La aproximación experimental que aplicamos fue la clonación posicional, esto es, aislar el gen mutante tras determinar su localización en una región cromosómica. Mediante análisis de ligamiento en estas dos primeras familias y una tercera familia con diez miembros afectados, todas ellas con patrón de herencia autonómico recesivo, posicionamos el locus de la enfermedad en la región 8q21.1. En esta región se había localizado años atrás el locus de una forma desmielizante de neuropatía periférica denominada CMT4A. Procedimos al refinamiento del intervalo crítico mediante cartografiado por homocigosidad empleando para ello 15 marcadores microsatélites. Tras reducir el tamaño de la región candidata, pudimos determinar que el gen responsable era *GDAP1*. Encontramos las mutaciones en los enfermos de las tres familias. El gen *GDAP1* se caracteriza por

presentar 6 exones y expresarse principalmente en cerebro, médula espinal y ganglios dorsales. En estudios posteriores hemos encontrado más pacientes y familias con enfermedad de Charcot-Marie-Tooth causada por mutaciones en *GDAP1*. La mutación más frecuente es Q163X, la cual tiene un único origen en la población española; además, hemos podido demostrar que esta mutación encontrada en enfermos hispanoamericanos tiene también su origen ancestral en la península ibérica.

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 de técnicas moleculares basadas en el análisis de polimorfismos del DNA para la duplicación CMT1A y la delección HNPP o el análisis de cribado de mutaciones y secuenciación posterior del DNA.

En el laboratorio, nuestro grupo ha tenido la oportunidad de estudiar y diagnosticar más de 500

NEUROPATÍAS PERIFÉRICAS HEREDITARIAS

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 distinguen 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.

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.

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 delección 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 glutathione S-transferases (GST). Los estudios recientes en el laboratorio nos ha 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.

TRASTORNOS DEL MOVIMIENTO

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. El trabajo que hemos realizado se ha orientado principalmente al diagnóstico molecular y consejo genético de estas enfermedades, incluyendo la participación en el programa de diagnóstico presintomático de la enfermedad de Huntington del Hospital La Fe de Valencia. El diagnóstico molecular se ha basado en el análisis de la expansión de trinucleótido CAG (citosa-adenina-guanina) en el gen de la enfermedad de Huntington y de la delección GAG del codón 946 (946delGAG) de la distonía DYT1. También caben reseñar los estudios genéticos en la población valenciana de la propia enfermedad de Huntington y de la distonía de torsión DYT1. De los trabajos publicados destacan las siguientes conclusiones:

- 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 de 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 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 delección 946delGAG se ha producido en la población española al menos en dos sucesos independientes.

DISTROFIAS MUSCULARES

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 frecuen-

TRASTORNOS DEL MOVIMIENTO

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 encuentran la enfermedad de Huntington y las distonías.

DISTROFIAS MUSCULARES

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 8.000 individuos y la distrofia facioescapulohumeral 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.

tes se encuentran las distrofinopatías, que incluye 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 facioescapulohumeral 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 (gen *DMD*) en 1991 y la distrofia miotónica (gen *DM1*) y la distrofia facioescapulohumeral (locus *D4S104S1* en la región cromosómica 4q35) en 1992. Las conclusiones más importantes han sido:

- 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 las distrofinopatías es compleja. Combina el diagnóstico directo de delecciones y duplicaciones (mutaciones puntuales en centros es-

pecializados) mediante PCR múltiple y transferencia de Southern y el diagnóstico indirecto empleando marcadores intragénicos e flaqueantes 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 las 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.