



## ORIGINALES

# Diagnóstico molecular de las enfermedades renales hereditarias

E. Ars, R. Torra y A. Oliver

Servicio de Laboratorio y Servicio de Nefrología de la Fundació Puigvert. Barcelona.

### INTRODUCCIÓN

Desde la década de los 80, la investigación en el campo de la genética ha permitido un gran avance en el conocimiento de las bases moleculares de muchas nefropatías hereditarias. En 1985, la localización del gen de la poliquistosis renal autosómica dominante (PQRAD) en el brazo corto del cromosoma 16<sup>1</sup> anunció una nueva era en la nefrología. Desde entonces, la localización e identificación de genes responsables de enfermedades renales hereditarias ha ofrecido nuevas herramientas para su clasificación y ha permitido situar la genética molecular en la línea central del estudio y diagnóstico de las nefropatías hereditarias. Muchos de estos avances se han logrado gracias al Proyecto Genoma Humano, un esfuerzo científico internacional que ha culminado con un mapa genético de alta resolución y con un borrador de la secuencia de nucleótidos del genoma humano<sup>2,3</sup>, que se prevé finalizado en el año 2003.

Además de las nuevas posibilidades en el diagnóstico y clasificación de las nefropatías hereditarias, la caracterización de genes implicados en la etiología de las enfermedades renales, así como de las proteínas codificadas por éstos, supone el punto de partida de estudios fisiopatológicos y posibilita el diseño de modelos de experimentación animal, además de propiciar el desarrollo de estrategias terapéuticas para estas enfermedades. Otro importante reto es establecer correlaciones entre los aspectos clínicos y genéticos de pacientes afectados por la misma nefropatía hereditaria.

El diagnóstico molecular difiere del diagnóstico clínico por ser permanente para un individuo y por tener implicaciones directas para los miembros de la familia y en las decisiones reproductivas. Las principales aplicaciones del diagnóstico molecular son la confirmación diagnóstica, el diagnóstico presintomático, el diagnóstico prenatal, el estudio de portadores y el diagnóstico preimplantacional.

### ENFERMEDADES RENALES HEREDITARIAS Y PATRONES DE HERENCIA

Actualmente el catálogo de genes y enfermedades genéticas humanas *OMIM*, *Online Mendelian Inheritance in Man* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim)), incluye más de 50 enfermedades renales hereditarias en las que se ha identificado el defecto genético (tabla I). Estas enfermedades son causadas por alteraciones producidas en genes (mutaciones genéticas) o en cromosomas (mutaciones cromosómicas). Pueden considerarse defectos congénitos, por estar generalmente presentes en el momento del nacimiento, aun cuando las manifestaciones fenotípicas puedan aparecer mucho más tarde.

Las enfermedades genéticas que se tratan en este número monográfico son causadas fundamentalmente por mutaciones en un solo gen (herencia monogénica) y su patrón de herencia es explicable con modelos mendelianos. No obstante, las enfermedades renales más comunes, como las nefropatías asociadas a la hipertensión, a la diabetes o a las enfermedades autoinmunes, aunque tienen un componente genético no resultan de un único gen defectivo. Estas enfermedades se consideran multifactoriales o complejas, en las que heredar varios alelos de genes diferentes proporciona un riesgo genético o predisposición individual al desarrollo de la enfermedad, que sólo se manifiesta en ciertas condiciones ambientales.

**Correspondencia:** Dra. Elisabet Ars  
Enfermedades Renales Hereditarias  
Servicio de Laboratorio  
Fundació Puigvert  
Cartagena, 340-350  
08025 Barcelona  
E-mail: ears@fundacio-puigvert.es

**Tabla I.** Principales enfermedades renales hereditarias con defecto molecular identificado

Enfermedad	Nº OMIM	Herencia	Localización	Gen	Proteína
Acidosis renal tubular distal	179800	AD	17q21-22	<i>SLC4A1</i>	Intercambiador cloruro-bicarbonato AE1
Acidosis renal tubular distal con sordera	267300	AR	2cen-q13	<i>ATP6B1</i>	Subunidad B1 de la H(+)-ATPasa
Cáncer papilar renal	164860	AD	7q31	<i>MET</i>	
Cistinosis	219800	AR	17p13	<i>CTNS</i>	Cistinosisina
Cistinuria tipo 1	220100	AR	2p16.3	<i>SLC3A1</i>	rBAT
Cistinuria tipo no 1	604144	AR	19q13.1	<i>SLC7A9</i>	b(0,+)-AT
Déficit de adenina fosforibosil-transferasa	102600	AR	16q24	<i>APR5</i>	Adenina fosforibosil-transferasa
Diabetes insípida nefrogénica tipo I	304800	LX	Xq28	<i>AVPR2</i>	Receptor de la vasopresina VR-2
Diabetes insípida nefrogénica tipo II	125800	AD	12q13	<i>AQP2</i>	Aquaporina-2
	222000	AR	12q13	<i>AQP2</i>	Aquaporina-2
Enf. de Fabry	301500	LX	Xq22.1	<i>GLA</i>	α-Galactosidasa A
Enf. de von Hippel-Lindau	193300	AD	3p25-26	<i>VHL</i>	pVHL
Enf. quística medular	174000	AD	1q21	<i>MCKD1</i>	
	603860	AD	16p12	<i>MCKD2</i>	
Enuresis nocturna	600631	AD	13q13-q14.3	<i>ENUR1</i>	
	600808	AD	12q13-q21	<i>ENUR2</i>	
Esclerosis segmentaria focal	603278	AD	19q13	<i>FSGS-1</i>	
	603965	AD	11q21-22	<i>FSGS-2</i>	
Esclerosis tuberosa	191100	AD	9q34	<i>TSC1</i>	Hamartina
	191092	AD	16p13.3	<i>TSC2</i>	Tuberina
Hematuria Familiar Benigna	141200	AD	2q35-q36	<i>COL4A3/A4</i>	Colágeno IV cadenas α3 y α4
Hiperoxaluria primaria tipo I	259900	AR	2q36-q37	<i>AGXT</i>	Alanina-glioxilato-amino-transferasa
Hiperoxaluria primaria tipo II	260000	AR	9cen	<i>GRHPR</i>	
Hipomagnesemia primaria	248250	AR	3q27	<i>PCLN1</i>	Paracelina-1
Nefrolitiasis cromosoma X tipo I	310468	LX	Xp11.22	<i>NPHL1</i>	Canal renal de Cl (CLCN5)
Nefrolitiasis cromosoma X tipo II	300009	LX	Xp11.22	<i>NPHL2</i>	Canal renal de Cl (CLCN5)
Nefronoptisis juvenil	256100	AR	2q12-q13	<i>NPHP1</i>	Nefrocistina
	606966	AR	1p36	<i>NPHP4</i>	Nefroretina
Nefronoptisis infantil	602088	AR	9q22-q31	<i>NPHP2</i>	
Nefronoptisis adolescente	604387	AR	3q21-q22	<i>NPHP3</i>	
Nefropatía por IgA	161950	AD	6q22-q23	<i>IGAN</i>	
Osteopetrosis con acidosis renal tubular	259730	AR	8q22	<i>CA2</i>	Carboanhidrasa 2
Poliquistosis Renal Autosómica Dominante	601313	AD	16p13.3	<i>PKD1</i>	Poliquistina-1
	173910	AD	4q21-q23	<i>PKD2</i>	Poliquistina-2
Poliquistosis Renal Autosómica Recesiva	263200	AR	6p21.1-p12	<i>PKHD1</i>	Fibroquistina
Reflujo vesicoureteral	193000	AD	1p13	<i>VUR1</i>	
Sd. Branquio-oto-renal (BOR)	113650	AD	8q13.3	<i>EYA 1</i>	
Sd. de Alport	301050	LX	Xq22.3	<i>COL4A5</i>	Colágeno IV cadena α5
	203780	AR	2q36-q37	<i>COL4A3/A4</i>	Colágeno IV cadenas α3 y α4
	104200	AD	2q36-q37	<i>COL4A3/A4</i>	Colágeno IV cadenas α3 y α4
Sd. de Alport con leiomiomatosis	308940	LX	Xq22.3	<i>COL4A5/A6</i>	Colágeno IV cadenas α5 y α6
Sd. de Bardet-Biedl 1	209901	AR	11q13	<i>BBS1</i>	BBS1
Sd. de Bardet-Biedl 2	606151	AR	16q21	<i>BBS2</i>	BBS2
Sd. de Bardet-Biedl 3	600151	AR	3q13-p12	<i>BBS3</i>	BBS3
Sd. de Bardet-Biedl 4	600374	AR	15q22.3-q23	<i>BBS4</i>	BBS4
Sd. de Bardet-Biedl 4	603650	AR	2q31	<i>BBS5</i>	BBS5
Sd. de Bartter tipo 1	600839	AR	15q15-q21.1	<i>SLC12A1</i>	Cotransportador Na-K-2Cl
Sd. de Bartter tipo 2	600359	AR	11q24	<i>KCNJ1</i>	Canal de potasio renal ROM-K
Sd. de Gitelman	263800	AR	16q13	<i>SLC12A3</i>	Cotransportador Na-Cl tiazida-sensible
Sd. de Kallmann	308700	LX	Xp22.3	<i>KAL1</i>	Anosmia
Sd. de Lowe	309000	LX	Xp26.1	<i>ORL1</i>	Inositolpolifosfato-5-fosfatasa
Sd. de Meckel	249000	AR	17q21-q24	<i>MKS1</i>	
	603194	AR	11q13	<i>MKS2</i>	
Sd. de WAGR	194072	AD	11p13	<i>WT1</i>	Supresor WT
Sd. Hemolítico urémico	235400	AR	1q32	<i>HF1</i>	Factor H
Sd. Nail-patella	161200	AD	9q34	<i>LMX1B</i>	Proteína homeodominio-LIM
Sd. nefrótico (tipo finlandés)	256300	AR	19q13.1	<i>NPHS1</i>	Nefrina
Sd. nefrótico resistente a esteroides	600995	AR	1q25-q31	<i>NPHS2</i>	Podocina
Tumor de Wilms y pseudohermafroditismo	194080	AD	11p13	<i>WT1</i>	Supresor WT

Enf: enfermedad; Sd: síndrome; LX: herencia ligada al cromosoma X; AD: herencia autosómica dominante; AR: herencia autosómica recesiva.

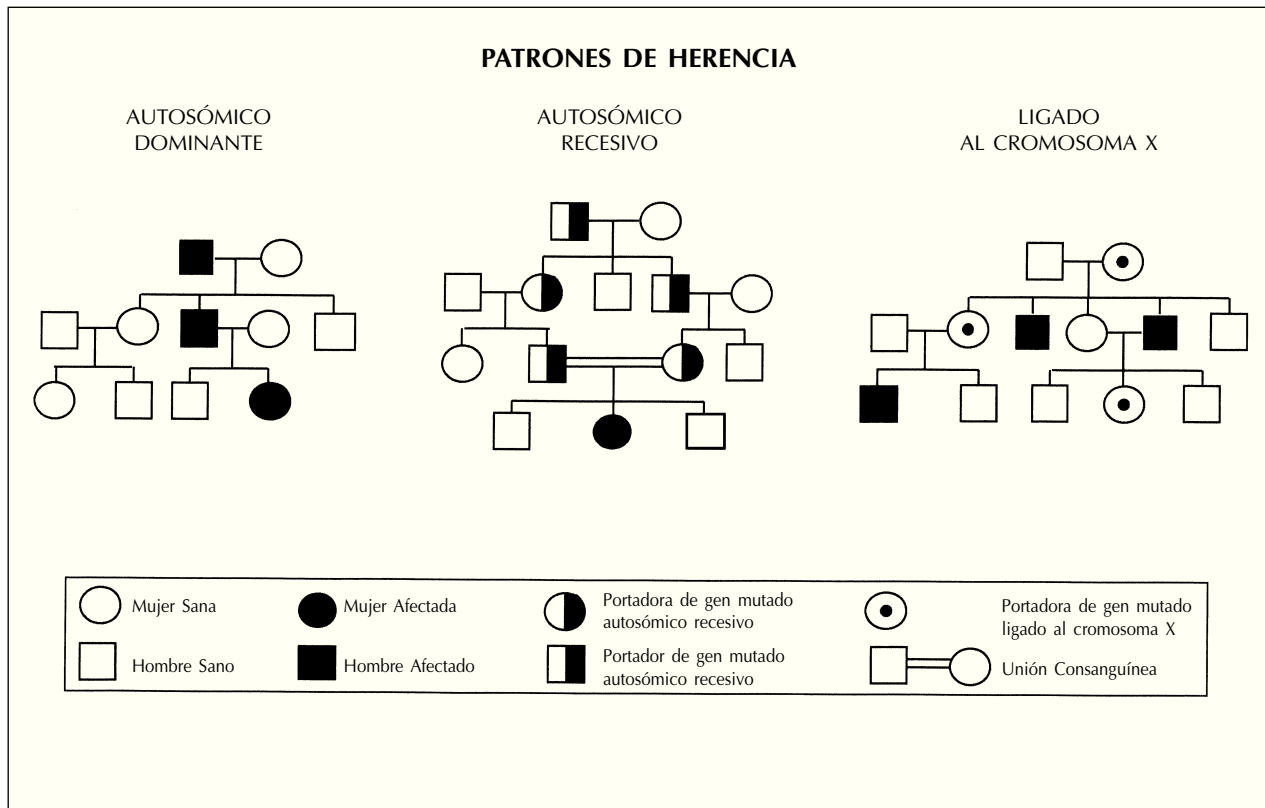


Fig. 1.—Representación de los árboles genealógicos de los patrones de herencia que siguen la mayoría de las enfermedades renales hereditarias.

Centrándonos en las enfermedades renales de herencia mendeliana, éstas pueden seguir un patrón de herencia autosómico dominante, autosómico recesivo o ligado al sexo (fig. 1). Los genes implicados en las enfermedades autosómicas están localizados en uno de los 22 pares de autosomas, mientras que los ligados al sexo se encuentran en el cromosoma X o Y. Es importante destacar que el término dominante o recesivo se refiere a la herencia del fenotipo y no a la expresión del gen mutante.

En las enfermedades con herencia autosómica dominante, como la poliquistosis renal del adulto o la hematuria familiar benigna, la presencia de una sola copia del gen mutado es suficiente para que la enfermedad se manifieste, de manera que los individuos afectados pueden ser heterocigotos u homocigotos. Las principales características de este patrón de herencia son la transmisión vertical, en la que cada paciente tiene el padre o la madre también afectado por la enfermedad, el mismo riesgo para ambos sexos a padecer o transmitir la enfermedad y una probabilidad del 50% de que los descendientes sean enfermos.

En las enfermedades de herencia autosómica recesiva, como la cistinuria, la cistinosis o la nefropoptosis, únicamente los individuos homocigotos manifiestan la enfermedad y los padres de los enfermos son portadores (heterocigotos), pero generalmente asintomáticos, por lo que se habla de transmisión horizontal. Afectan a ambos sexos por igual y la probabilidad de tener un hijo enfermo es del 25%. En las familias con enfermedades autosómicas recesivas es frecuente la existencia de consanguinidad.

Las enfermedades de herencia ligada al cromosoma X (LX) históricamente también han sido consideradas dominantes (LXD) o recesivas (LXR). En muchos textos se ha sugerido que las LXR son mucho más comunes que las LXD. Las LXD han sido definidas como aquellas que presentan transmisión vertical y en las que las hijas de hombres enfermos están siempre afectadas y transmiten la enfermedad a ambos sexos con la misma probabilidad. Las LXR han sido generalmente definidas como aquellas que presentan transmisión horizontal y en las que las mujeres son portadoras asintomáticas que transmiten la enfermedad a la mitad de sus hijos varones. No obs-

tante, en muchas de las enfermedades consideradas LXR las mujeres presentan un cierto grado de afectación que puede ser muy variable, de muy leves a graves, lo que ha conllevado una gran dificultad a la hora de determinar el patrón de herencia que presentan estas enfermedades en ciertas familias. Recientemente, Dobyns y cols.<sup>4</sup> han propuesto el desuso de los términos LXD y LXR puesto que no reflejan la extraordinaria variabilidad en la expresividad de las enfermedades con herencia ligada al cromosoma X, ni tampoco tienen en cuenta los múltiples mecanismos que pueden producir que la enfermedad se manifieste en las mujeres, tales como la inactivación sesgada del cromosoma X y el mosaicismo somático. Por todo ello, estos autores consideran más adecuada la descripción de estas enfermedades como simplemente con herencia ligada al cromosoma X, obviando los términos dominante y recesivo. Algunos ejemplos de enfermedades renales con este patrón de herencia son el síndrome de Alport y la enfermedad de Fabry.

Finalmente mencionar que no se ha descrito ninguna enfermedad renal con herencia ligada al cromosoma Y. Las enfermedades con este patrón de herencia sólo afectan a los hombres y tienen una incidencia muy baja.

## APROXIMACIONES PARA EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Para las enfermedades genéticas con un patrón de herencia mendeliano el diagnóstico molecular se puede realizar de dos formas: 1) análisis indirecto, el cuál generalmente implica un estudio de ligamiento, o 2) análisis directo, que requiere la identificación de la mutación responsable de la enfermedad.

### Análisis indirecto

El diagnóstico indirecto estudia cómo se han heredado en una familia variantes genéticas comunes (polimorfismos) localizadas en las proximidades o en el interior del gen responsable de la enfermedad. Dicho estudio se denomina análisis de ligamiento e identifica cuál es el haplotipo de riesgo asociado a la enfermedad en una determinada familia (fig. 2).

Un polimorfismo se define como la presencia en un *locus* de dos o más alelos, cada uno de los cuáles tiene una frecuencia en la población general de al menos el 1%. Los polimorfismos más utilizados en el análisis de ligamiento son los denominados microsátélites, que consisten en repeticiones situadas

en tándem de un número de nucleótidos inferior a 6, por ejemplo (CA)<sub>N</sub>. El número de repeticiones (N) varía de un individuo a otro, constituyendo distintos alelos. Estos marcadores son altamente informativos, ya que presentan gran número de alelos, siendo muy elevada la probabilidad de encontrar dos alelos diferentes (heterocigosidad) en el mismo individuo. El análisis de microsátélites se realiza mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región polimórfica y posterior separación de los fragmentos amplificados mediante electroforesis en un gel de acrilamida.

Para aplicar el diagnóstico indirecto deben tenerse en cuenta los siguientes puntos: 1) el gen responsable de la enfermedad debe estar localizado; 2) se requieren marcadores polimórficos informativos, intragénicos o adyacentes a dicho gen; 3) son necesarias muestras de varios familiares (tanto sanos como afectados) y no puede realizarse si sólo se dispone del caso índice; 4) es imprescindible un diagnóstico clínico preciso de los familiares del caso índice; 5) la recombinación genética entre el marcador y el gen puede disminuir la probabilidad del resultado, y 6) en caso de existir heterogeneidad genética debe analizarse el ligamiento a todos los posibles *loci*.

Técnicamente, el análisis indirecto se puede considerar rápido, sencillo e independiente de la complejidad y del tamaño del gen. Estas características permiten su aplicación tanto en enfermedades causadas por genes grandes y complejos, cuyo análisis directo sería inviable para fines diagnósticos, como en el caso de genes que puedan presentar una gran variedad de mutaciones (heterogeneidad alélica), algunas de las cuáles pueden ser indetectables. También es útil cuando el gen responsable de la enfermedad todavía no ha sido identificado, aunque es imprescindible conocer su localización.

### Análisis directo

El análisis directo tiene por objetivo identificar la mutación responsable de la enfermedad. Se puede aplicar tanto a los casos familiares como a los casos esporádicos (*de novo*) de la enfermedad, lo que representa una ventaja respecto al análisis indirecto que sólo es útil para los casos familiares. Otro punto a favor del estudio mutacional es que permite analizar posibles correlaciones genotipo-fenotipo. El requisito indispensable para este estudio es que el gen haya sido identificado.

Existen distintos métodos para analizar la presencia de mutaciones en un gen. La aplicación de un método u otro dependerá del tipo de mutación y

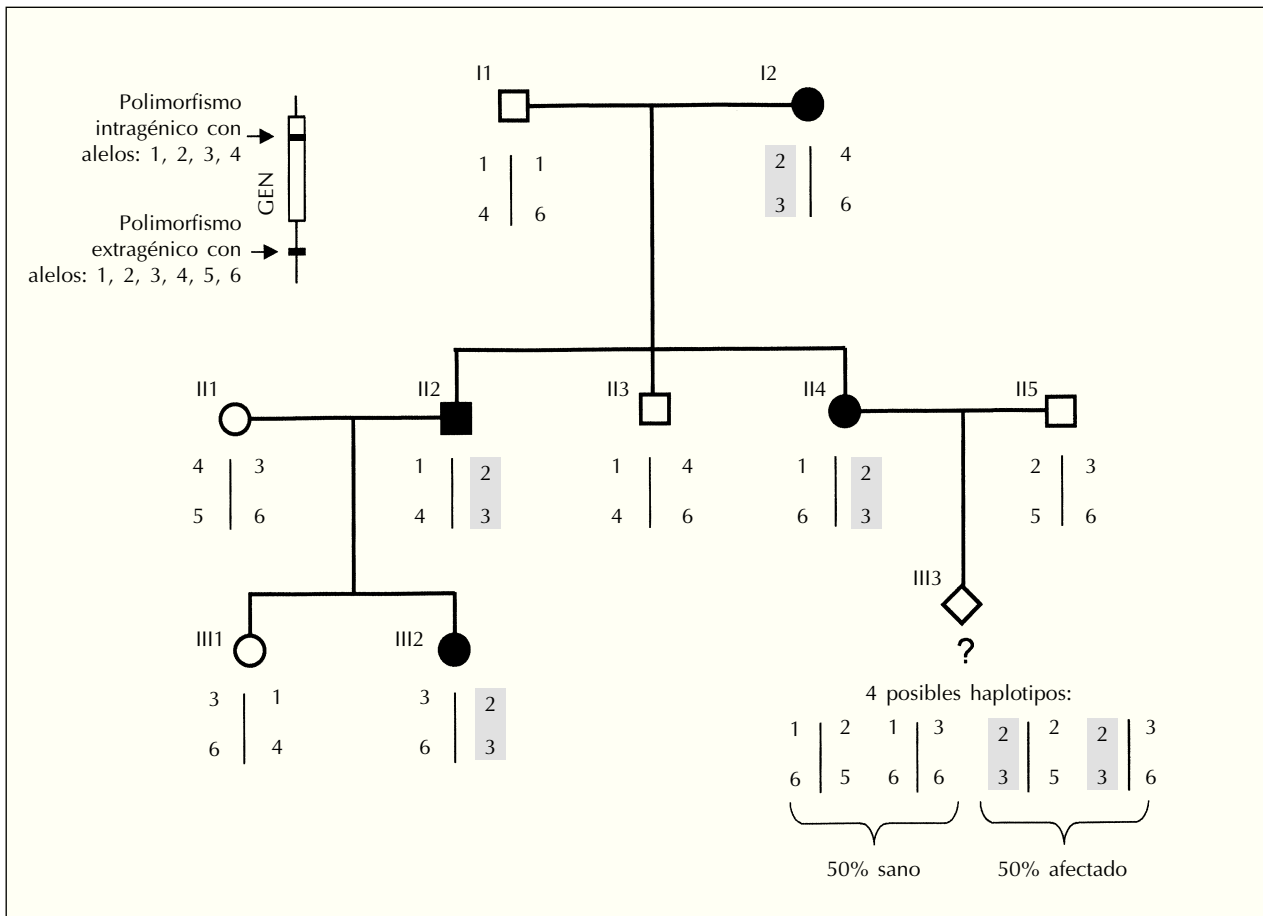


Fig. 2.—Principio del análisis de ligamiento. En esta familia de 3 generaciones con una enfermedad autosómica dominante se analizaron 2 polimorfismos tipo microsatélite, uno de ellos intragénico y el otro adyacente al gen, y se obtuvieron los haplotipos representados debajo de cada uno de los miembros de la familia. El diagnóstico clínico de la enfermedad se realizó en I2, que transmitió la enfermedad a su hijo II2 y a su hija II4, pero no a su hijo II3. A partir de esta información clínica y genética se dedujo que el haplotipo de riesgo asociado a la enfermedad es el que se representa sombreado. Para la pareja formada por II4 y II5 es posible la realización de un diagnóstico prenatal. El feto (III3) puede haber heredado cualquiera de los 4 haplotipos representados, de manera que existe una probabilidad del 50% de que sea sano y una probabilidad del 50% de que esté afectado por la enfermedad. Con el diagnóstico prenatal se puede discernir cuál de los 4 posibles haplotipos ha heredado y, por lo tanto, determinar su estado respecto a la enfermedad.

de las características del gen en estudio. Para identificar reordenamientos del material genético, tales como deleciones e inserciones grandes (de 40 kb a varias Mb) se utilizan electroforesis en campos pulsantes (PFGE) e hibridación *in situ* fluorescente (FISH), así como *Southern blot* para deleciones e inserciones de tamaño medio (0,1-20 kb). El análisis de deleciones también se realiza mediante estudios de pérdidas de heterocigosidad (LOH). Para la búsqueda de mutaciones puntuales existen muchas técnicas distintas, la mayoría de las cuáles implican una amplificación inicial mediante PCR de la región alrededor de la mutación, seguida del análisis mutacional utilizando alguno de los siguientes métodos:

digestión del DNA con enzimas de restricción, *dot-blot*, análisis de conformación de la cadena simple (SSCP), análisis del heterodúplex (HD), electroforesis en gradientes de geles desnaturalizantes (DGGE) o cromatografía líquida de alta resolución desnaturalizante (DHPLC), entre otros. Por último, se confirma la posible mutación mediante secuenciación. Actualmente, para genes de gran tamaño la tendencia es utilizar técnicas en las que se parte de RNA, tales como el test de la proteína truncada (PTT) o cDNA-SSCP/HD, ya que estos métodos evitan el estudio de las regiones no codificadoras y permiten un análisis más rápido de la región codificadora.

Así, una vez aislado el gen responsable de una enfermedad, en principio, se puede abordar la búsqueda de mutaciones en éste. No obstante, este tipo de análisis no siempre es factible para fines diagnósticos. Este sería el caso de genes como *PKD1*, responsable de aproximadamente el 85% de los casos de poliquistosis renal autosómica dominante (PQRAD), constituido por 46 exones repartidos en 52 kb de DNA genómico, con regiones duplicadas diversas veces en el cromosoma 16 y en el que no existen mutaciones mayoritarias o puntos calientes (*hot spots*) de mutación, de manera que las mutaciones son distintas en cada familia (mutaciones privadas). Todas estas características hacen que sea muy laboriosa la búsqueda de mutaciones en el gen *PKD1*. De este modo, el análisis de ligamiento sigue siendo la mejor estrategia molecular en la PQRAD, ya que se dispone de un gran número de marcadores polimórficos adyacentes al gen e incluso intragénicos. Las principales limitaciones del análisis directo son la imposibilidad de detectar todas las mutaciones existentes, la dificultad de distinguir una mutación patogénica de un polimorfismo y la existencia de heterogeneidad genética, aspectos que se tratan en el siguiente apartado.

## INTERPRETACIÓN DE LOS ANÁLISIS

### Heterogeneidad

Se pueden distinguir dos tipos de heterogeneidad genética (o de *locus*) y alélica (o molecular).

Existe heterogeneidad genética cuando una enfermedad hereditaria puede ser causada por alteraciones de distintos genes de forma independiente. Cada uno de los genes será el responsable del trastorno en una proporción determinada de familias.

La heterogeneidad genética dificulta tanto el análisis de ligamiento como el análisis mutacional. En el análisis de ligamiento la asunción de un *locus* genético erróneo puede llevar a conclusiones falsas, por lo que siempre se debe analizar el ligamiento a todos los posibles *loci*. En el análisis directo la búsqueda de la mutación es mucho más laboriosa si se deben analizar varios genes.

En las enfermedades renales hereditarias existen varios ejemplos de heterogeneidad genética, como la PQRAD en la que el 85% de los casos son debidos a mutaciones en *PKD1*, localizado en cromosoma 16, y el 15% a mutaciones en *PKD2*, en el cromosoma 4, pudiendo existir un tercer *locus*; o el síndrome de Alport con el 80-85% de los casos causados por mutaciones en *COL4A5*, localizado en el cromosoma X, y el 15-20% restante, con una he-

rencia autosómica, debido a mutaciones en los genes *COL4A3* y *COL4A4*, situados en el cromosoma 2.

Para explicar la heterogeneidad genética existen distintas posibilidades como que los distintos genes que pueden producir la enfermedad cuando están mutados codifiquen para proteínas que interactúan entre sí y/o que pertenezcan a la misma vía de transducción de señal (como la poliquistina-1 y la poliquistina-2, codificadas respectivamente por *PKD1* y *PKD2*) o bien que codifiquen para distintas subunidades de un complejo proteico [como las subunidades del transportador renal de aminoácidos básicos b(0,+), con una subunidad pesada, rBAT, codificada por el gen *SLC3A1* responsable de la cistinuria de tipo I y una subunidad ligera, b(0,+)-AT, codificada por el gen *SLC7A9*, mutaciones en el cuál causan la cistinuria tipo no I].

La heterogeneidad alélica se refiere a las distintas mutaciones de un mismo gen (alelos), que pueden dar lugar a la misma o a distintas enfermedades. La heterogeneidad alélica complica enormemente el análisis mutacional directo e implica que la eficiencia en la búsqueda de mutaciones sea inferior al 100%. Una consecuencia de este hecho es la dificultad de interpretar un análisis en el que no se ha identificado ninguna mutación, ya que no permite un diagnóstico negativo de la enfermedad puesto que cabe la posibilidad de que la mutación no haya sido detectada pero que esté presente en el gen. Una posibilidad sería la secuenciación directa de toda la región codificadora, de las secuencias de *splicing* (mecanismo por el que se eliminan las secuencias no codificadoras denominadas intrones) y de las regiones reguladoras, que debería detectar todas las mutaciones existentes en el gen. No obstante, para genes de gran tamaño (*PKD1*, *COL4A3*, *COL4A4*,...) esta opción no es viable actualmente para fines diagnósticos ya que resultaría muy costosa y laboriosa, además de no ser conocidas las secuencias reguladoras de muchos de estos genes.

### Penetrancia y expresividad

La penetrancia y la expresividad son características de la expresión génica que también deben tenerse en cuenta en la interpretación de los resultados de un test.

La penetrancia se define como la probabilidad de manifestar un fenotipo cuando se porta un genotipo determinado. Si el genotipo siempre se expresa la penetrancia es completa, en cambio, si se puede poseer la mutación y no estar afectado por la enfermedad es incompleta (inferior al 100%). Debe te-

nerse en cuenta que la penetrancia depende de la edad, así por ejemplo un individuo portador de una mutación en *PKD1*, a los 15 años puede no manifestar ningún problema renal mientras que a los 70 años puede estar en diálisis. Para *PKD1* la penetrancia se considera completa a partir de los 20 años. En general, para enfermedades dominantes la penetrancia es incompleta (al menos hasta cierta edad) mientras que para la mayoría de enfermedades recesivas es completa.

La expresividad es el grado de expresión de un fenotipo. Se considera que la expresividad es variable cuando la manifestación de un fenotipo varía entre individuos poseedores del mismo genotipo. Esta variabilidad fenotípica puede ser tanto interfamiliar, entre individuos no relacionados, como intrafamiliar, miembros afectados de una misma familia y, por tanto, portadores de la misma mutación pueden presentar fenotipos muy distintos. Siguiendo con la PQRAD como ejemplo, en *PKD1* fue identificada una mutación de terminación de la traducción Tyr3818Stop en un hombre con inicio adulto de la enfermedad y que transmitió la mutación a dos gemelos dizigóticos. Uno de ellos gravemente afectado desde el nacimiento, mientras que el otro no presentaba ninguna evidencia de la enfermedad a los 5 años<sup>5</sup>. Cabe destacar que muchas enfermedades presentan una expresividad variable con la edad, de manera que un fenotipo muy leve en la infancia no excluye un desarrollo moderado o grave de la enfermedad.

La penetrancia incompleta y la expresividad variable pueden explicarse sobre la base de la existencia de genes modificadores de la severidad de la enfermedad y por la influencia de factores ambientales, que modulan el efecto del gen mayor, principal responsable de la enfermedad.

### Polimorfismos

No todos los cambios en la secuencia de DNA causan alteraciones en un producto génico dando lugar a una enfermedad. Los polimorfismos son variantes no patogénicas de la secuencia del DNA muy útiles para el análisis de ligamiento pero, en cambio, que dificultan el análisis mutacional. Esto se debe a que algunas de estas variantes polimórficas son muy poco frecuentes y pueden ser malinterpretadas como mutaciones. No siempre es fácil distinguir una mutación de un polimorfismo. En general, cualquier cambio en la secuencia codificadora que dé lugar a la creación de un codón de terminación de la traducción prematuro o que se prevé que dará lugar a una proteína no funcional puede ser consi-

derado una mutación, mientras que alteraciones de la secuencia no codificadora que no impliquen ninguna alteración del mecanismo de *splicing* serían polimorfismos. En este último caso puede ser útil un análisis del RNA del paciente para confirmar que el cambio no produce ninguna alteración en el procesamiento del mRNA (RNA mensajero).

En cambio, cuando se identifican sustituciones de nucleótidos en la región codificadora (exones) que modifican o no el aminoácido resultante deben analizarse con precaución. Se tratará de una mutación, si el cambio segrega con la enfermedad y si después de analizar un mínimo de 100 cromosomas de individuos controles no relacionados se comprueba que en ninguno de éstos se encuentra el cambio. En caso contrario se trataría de un polimorfismo. La prueba definitiva para confirmar que el cambio es una mutación se obtendría con un ensayo funcional que confirmara que la proteína mutante no desarrolla su papel normal en la célula, aunque en el ámbito diagnóstico esta prueba no es muy factible.

### Tasa de mutación

La tasa de mutación media en el genoma es de  $1 \times 10^{-6}$  por *locus* por generación, pero esta cifra puede variar desde  $10^{-4}$  a  $10^{-7}$  mutaciones por *locus* por generación. Estas diferencias pueden estar relacionadas con el tamaño del gen y con la existencia de *hot spots* mutacionales en el genoma. En la PQRAD se ha descrito una tasa de mutación *de novo* de  $0,6-1,2 \times 10^{-4}$  por *locus* por generación<sup>6</sup>, unas 100 veces más elevada que en la media del genoma, lo que explicaría que la mayoría de familias con PQRAD presenten una mutación privada.

La tasa de mutación de un gen responsable de una enfermedad debe tenerse en cuenta en el momento de considerar el patrón de herencia de la enfermedad, puesto que se podría malinterpretar, por ejemplo, un caso *de novo* de una enfermedad con un individuo con una enfermedad autosómica recesiva, ya que en ambos casos los padres del individuo afecto serían fenotípicamente normales.

### Sensibilidad y especificidad

La sensibilidad de un test directo es la probabilidad de que el test detecte una mutación cuando está presente en la muestra en estudio. La especificidad es la probabilidad de que el test sea negativo cuando la mutación no está presente. Estas características del test deben ser consideradas tanto al escoger el método con el que se va a realizar el análisis

como al interpretar los resultados obtenidos, llegando a un compromiso entre una máxima sensibilidad y especificidad con una complejidad técnica y un coste económico razonables.

## APLICACIONES DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR

El estudio molecular en las enfermedades renales hereditarias puede ser aplicado en la confirmación diagnóstica de casos dudosos de la enfermedad, en el diagnóstico presintomático, en el estudio de portadores y en el diagnóstico prenatal. En cualquiera de estos casos el análisis molecular debe ir acompañado de un asesoramiento genético apropiado, tanto antes como después del estudio, en el cuál se tratarán los aspectos médicos, genéticos y psicológicos asociados a la enfermedad renal hereditaria. La información obtenida del estudio molecular permitirá aplicar medidas médicas que prevengan, mejoren o reviertan parcialmente las manifestaciones de la enfermedad.

Para el diagnóstico molecular de una enfermedad renal hereditaria, un nefrólogo con formación en genética informa a la familia y valora la indicación de este estudio. En caso de que la familia solicite dicho diagnóstico y éste esté indicado, se obtiene el consentimiento informado por parte de cada miembro de la familia. A continuación se extrae DNA/RNA de una muestra de sangre de cada uno de los familiares necesarios y se procede a la realización del estudio molecular directo o indirecto por parte de un biólogo molecular. Los resultados son valorados conjuntamente por el nefrólogo y el biólogo emitiendo un informe personalizado para cada miembro de la familia a diagnosticar.

Brevemente las aplicaciones del diagnóstico molecular son:

El *diagnóstico prenatal* que constituye una de las principales utilidades de los estudios moleculares. Requiere un estudio previo de los familiares y se realiza a partir de una muestra del feto, que generalmente consiste en una biopsia de vellosidad coriónica o bien líquido amniótico. El diagnóstico prenatal normalmente se solicita en enfermedades muy graves con un patrón de herencia autosómico recesivo o ligado al cromosoma X como la poliquistosis renal autosómica recesiva. En cambio, para enfermedades autosómicas dominantes con inicio en el adulto generalmente la demanda es muy baja. Una cuestión que el especialista debe explicar con claridad a los familiares, es que la solicitud de un estudio prenatal implica una determinación clara de interrupción voluntaria del embarazo en caso de que el feto esté afectado por la enfermedad.

El *estudio de portadores* que determina el riesgo de tener un hijo afectado por una enfermedad autosómica recesiva o ligada al cromosoma X. Es aplicable en familias en las que se haya identificado la mutación responsable de la enfermedad o en las que se conozca cuál es el haplotipo de riesgo ligado a la enfermedad. También se puede realizar en el caso de tratarse de enfermedades causadas por genes con poca variabilidad mutacional o con un número limitado de mutaciones recurrentes. El resultado de un estudio de portadores puede conllevar un futuro diagnóstico prenatal y, por tanto, tiene importantes implicaciones en las decisiones reproductivas.

El *diagnóstico presintomático* que ofrece también gran interés como diagnóstico precoz en aquellas situaciones susceptibles de la aplicación de tratamientos preventivos, disminución de riesgos, modificación de hábitos de vida, etc.

La *confirmación diagnóstica* que generalmente se solicita en los casos en que existe una sospecha clínica a pesar de no cumplirse los criterios diagnósticos de ésta.

Finalmente, una de las aplicaciones del diagnóstico molecular que todavía no se ha desarrollado en las nefropatías hereditarias es el *diagnóstico preimplantacional*. Este diagnóstico consiste en el análisis genético de una o dos células del embrión en estadio 6-8 células, mientras éste continúa su desarrollo *in vitro*. Una vez realizado el estudio se seleccionan los embriones que no son portadores de la anomalía genética y sólo éstos son transferidos al útero materno, asegurando una descendencia sana. Nuestro grupo está desarrollando esta metodología para aplicarla a las enfermedades renales hereditarias en un futuro próximo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Reeders ST, Breuning MH, Davies KE, Nicholls RD, Jarman AP, Higgs DR, Pearson PL, Weatherall DJ: A highly polymorphic DNA marker linked to adult polycystic kidney disease on chromosome 16. *Nature* 317: 542-544, 1985.
2. McPherson JD, Marra M, Hillier L, Waterston RH, Chinwalla A, Wallis J, Sekhon M, Wylie K, Mardis ER, Wilson RK, Fulton R, Kucaba TA, Wagner-McPherson C, Barbazuk WB, Gregory SG, Humphray SJ, French L, Scherer RS, Bethel G, Whitaker A, Holden JL, McCann OT, Dunham A, Soderlund C, Scott CE, Bentley DR, Schuler G, Chen HC, Jang W, Green ED, Idol JR, Maduro VV, Montgomery KT, Lee E, Miller A, Emerling S, Kucherlapati, Gibbs R, Scherer S, Gorrell JH, Sodergren E, Clerc-Blankenburg K, Tabor P, Naylor S, García D, De Jong PJ, Catanese JJ, Nowak N, Osoegawa K, Qin S, Rowen L, Madan A, Dors M, Hood L, Trask B, Friedman C, Massa H, Cheung VG, Kirsch IR, Reid T, Yonescu R, Weissenbach J, Bruls T, Heilig R, Branscomb E, Olsen A, Doggett N, Cheng JF, Hawkins T, Myers RM, Shang J, Ramírez L, Schmutz J, Velásquez O, Dixon K, Stone NE, Cox DR, Haussler



## E. ARS y cols.

- D, Kent WJ, Furey T, Rogic S, Kennedy S, Jones S, Rosenthal A, Wen G, Schilhabel M, Gloeckner G, Nyakatura G, Siebert R, Schlegelberger B, Korenberg J, Chen XN, Fujiyama A, Hattori M, Toyoda A, Yada T, Park HS, Sakaki Y, Shimizu N, Asakawa S, Kawasaki K, Sasaki T, Shintani A, Shimizu A, Shibuya K, Kudoh J, Minoshima S, Ramser J, Seranski P, Hoff C, Poustka A, Reinhardt R, Lehrach H: A physical map of the human genome. *Nature* 409: 934-941, 2001.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di F, V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooshep S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, López J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M: The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351, 2001.
  - Dobyns WB, Filauro A, Chan AS, Ho A, Ting NTOC: The pattern of inheritance of X-linked traits: not dominant, not recessive, just X-linked. *Am J Hum Genet Abstracts Book (Abstract 45) ASHG* 2002.
  - Peral B, Ong AC, San Millán JL, Gamble V, Rees L, Harris PC: A stable, nonsense mutation associated with a case of infantile onset polycystic kidney disease 1 (PKD1). *Hum Mol Genet* 5: 539-542, 1996.
  - Vogel F, Motulsky AG: Human Genetics, 2<sup>nd</sup> edn. Berlin, Springer-Verlag, 1986.