

**ATAXIAS Y PARAPLEJIAS
HEREDITARIAS
ASPECTOS CLINICOS Y GENETICOS**

José Berciano

ERGON

7.

Análisis genético de la ataxia de Friedreich en la población española

F. Palau, E. Monrós

Unidad de Genética, Hospital Universitario «La Fe», Valencia.

La ataxia de Friedreich (AF) es un trastorno neurodegenerativo autosómico recesivo, caracterizado por la pérdida selectiva de las fibras mielínicas largas de las raíces dorsales y por la degeneración de los tractos espinocerebelosos. Los criterios clínicos diagnósticos incluyen la edad de inicio precoz (antes de los 25 años), ataxia progresiva de la marcha y de los miembros, arreflexia osteotendinosa, respuesta plantar flexora y disartria. El estudio neurofisiológico de estos pacientes muestra una ausencia de los potenciales de acción sensitivos, lo cual es un hecho importante en el diagnóstico. Por otra parte, un porcentaje de pacientes, que podría ser mayor del 90 por cien, presenta una miocardiopatía, que si bien no es específica tan sólo se ha encontrado en la AF⁽¹⁾. La AF tiene una prevalencia variable. En España se ha determinado en 4,7/100.000 en Cantabria⁽²⁾, y 3,97/100.000 en el País Valenciano⁽³⁾. Se desconoce el defecto bioquímico subyacente, así como la naturaleza de las mutaciones genéticas causales.

El gen de la AF se localizó en el cromosoma 9 en 1988 por el grupo de la Dra. Sue Chamberlain del Hospital St. Mary's de Londres⁽⁴⁾. Se han descrito los loci marcadores -D9S5 y D9S15- estrechamente ligados al locus AF en 9q13-21.1⁽⁴⁻⁷⁾. En cada uno de estos loci se han descrito varios polimorfismos de la molécula de ADN^(8,9). Por otra parte, se ha demostrado que la AF es genéticamente homogénea en varias poblaciones (británica, francesa, italiana, española, franco-canadiense)⁽⁹⁻¹³⁾, por lo que el gen AF del cromosoma 9 es el único causante de la enfermedad. Hasta el momento se han estudiado unas 200 familias con más de un hijo afecto de AF mediante los marcadores polimórficos disponibles en el grupo de ligamiento D9S5-D9S15, y tan sólo se han encontrado 5 recombinantes genéticos. El análisis de ligamiento global de todas estas familias sugiere que el locus AF se encuentra a menos de 1 megabase (1.000.000 de pares de bases nucleotídicas) de los marcadores D9S5 y D9S15. Ello implica que estos marcadores se puedan utilizar para el diagnóstico molecular con una

certeza mayor del 99 por cien. A continuación presentamos de un modo resumido los resultados genéticos obtenidos en nuestro laboratorio en familias españolas con AF, así como la aplicación del análisis de ligamiento al diagnóstico diferencial de las ataxias espinocerebelosas de inicio precoz.

ANÁLISIS GENÉTICO DE LA POBLACIÓN ESPAÑOLA

La población española presenta homogeneidad genética para la AF

Actualmente, para demostrar que el gen causante de una enfermedad está ligado genéticamente cercano— a unos determinados marcadores polimórficos, se emplea el análisis de ligamiento. En este análisis, se calcula una serie de cocientes de probabilidad para diferentes fracciones de recombinación Θ , que van desde $\Theta = 0,0$ (no recombinación entre el locus de la enfermedad y los loci marcadores) hasta $\Theta = 0,5$ (no ligamiento). La probabilidad para un determinado valor de Θ es

$$\frac{\text{probabilidad de que los loci estén ligados para } \Theta}{\text{probabilidad de que los loci no estén ligados}}$$

Las probabilidades computadas se expresan normalmente como el logaritmo de este cociente que se denomina en inglés «lod score» (Z). Convencionalmente, se considera que un valor positivo de 3 indica ligamiento (una probabilidad de 1000:1 a favor del ligamiento), mientras que un valor de -2 rechaza totalmente el ligamiento. En la tabla 1 se muestra los resultados obtenidos en 12 familias españolas con más de un afecto que hemos podido estudiar. Los valores de $Z = 3,72$ ($\Theta = 0,05$) para D9S15 y de $Z = 8,62$ ($\Theta = 0,00$) para D9S5, indican que la AF está ligada a ambos marcadores en la muestra estudiada, corroborando la homogeneidad genética en la población española, a pesar de la variabilidad clínica que caracteriza a la AF.

Importancia del hallazgo de recombinantes genéticos para la localización del gen AF

Un recombinante genético viene definido por la presencia de distintos alelos de un marcador ligado a un locus en dos o más individuos afectados de la misma mutación en la misma familia en dicho locus. La importancia que tiene el descubrimiento de estos recombinantes es que nos permiten orientar la situación del locus, en este caso del gen de la AF, con respecto al marcador. Nosotros hemos encontrado dos de los cinco recombinantes descritos hasta el momento en la AF en dos familias españolas, una de ellas procedente de la ciudad de Valencia (LF1) y la otra originaria de Minglanilla, en la provincia de Cuenca (LF2) (Fig. 1). El análisis de marcadores del grupo de ligamiento D9S5-D9S15 nos ha permitido descartar la región intermedia entre ambos marcadores como candidata a contener el gen AF. Sin embargo, dado que la ligazón entre los marcadores y el gen AF es menor de 1 megabase, éste debe estar flanqueando el grupo de ligamiento.

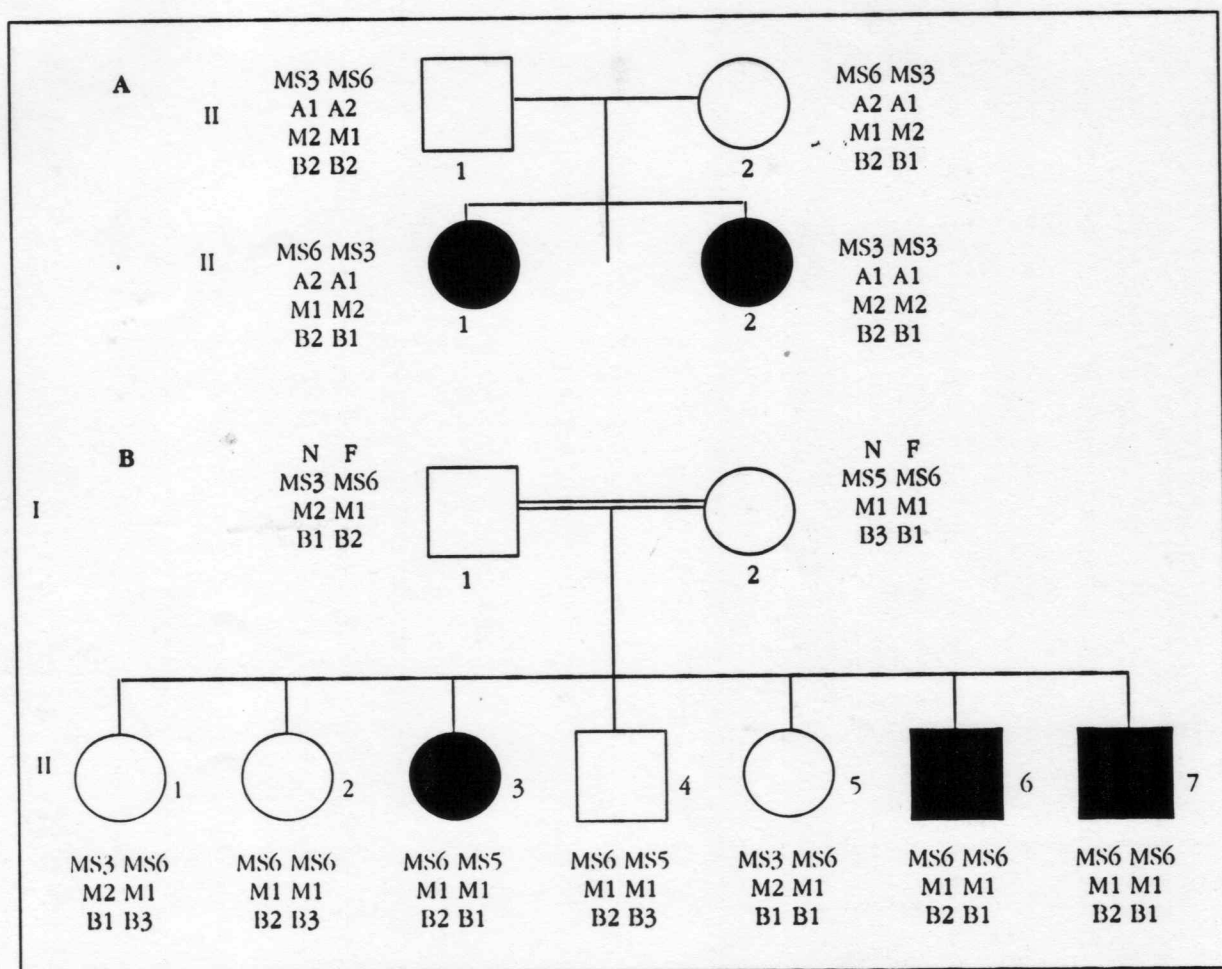


Figura 1. Árboles genealógicos de las dos familias recombinantes con los haplotipos cromosómicos construidos con los marcadores ligados a la AF. A) Familia LF1: se observa que el cromosoma portador de la mutación en el padre es distinto entre ambas hermanas afectas. B) Familia LF2: la hija II-3 muestra un haplotipo materno distinto a sus hermanos II-6 y II-7, objetivado por un alelo distinto MS. MS= MCT112/microsatélite; A= MCT112/AccI; M= MCT112/MspI; B= 26P/BstXI.

Desequilibrio de ligamiento

El desequilibrio de ligamiento se define como la tendencia de que determinadas combinaciones de alelos de dos o más loci ligados entre sí se produzcan con mayor frecuencia de la que cabría esperar por el azar (Fig. 2). La importancia del análisis de este fenómeno genético radica en que la existencia del mismo sugiere dos posibilidades: bien son pocas las mutaciones que han originado la enfermedad en la población estudiada, bien el marcador no sólo está ligado genéticamente al gen de la enfermedad, sino que además está físicamente muy cercano a él en el genoma.

En la AF se ha descrito tal desequilibrio de ligamiento en las poblaciones francesa, italiana y franco-canadiense. Nosotros, en un primer estudio de 22 familias, 15 de ellas valencianas, encontramos desequilibrio de ligamiento principalmente con el marcador 26P

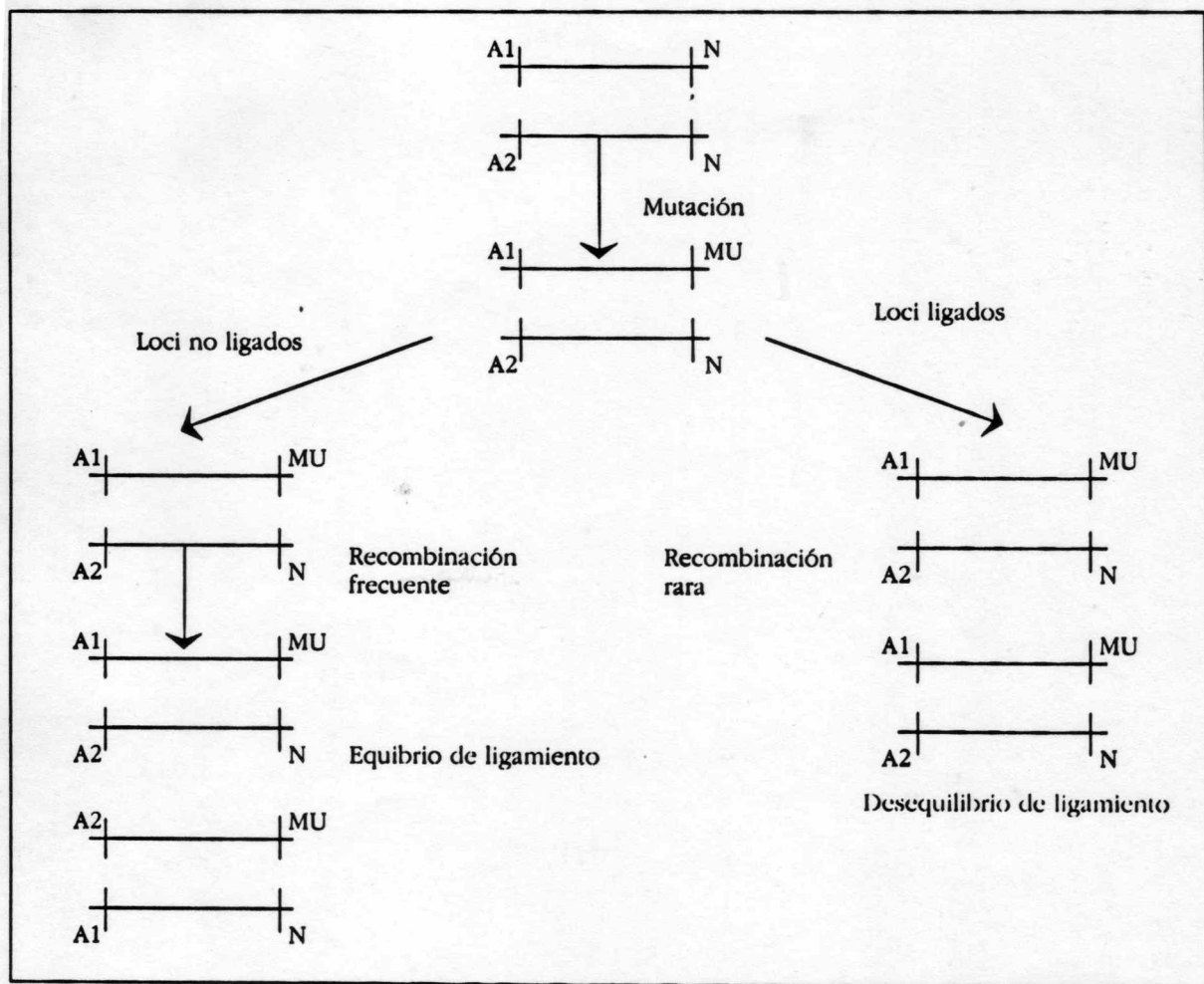


Figura 2. Esquema explicativo del desequilibrio de ligamiento entre el locus de una enfermedad y un locus marcador estrechamente ligado. Las frecuencias de los alelos alcanzan el equilibrio si el locus marcador está suficientemente alejado del locus de la enfermedad, de modo que se hayan podido producir muchos recombinantes a lo largo de la evolución. En cambio, para los marcadores que están muy cercanos se producen con poca frecuencia estos fenómenos de recombinación, con lo que la distribución de alelos que se observa en la población que aporta cromosomas con la mutación patológica difiere de la observada en la población que tan sólo lleva cromosomas normales.

del locus D9S5. Sin embargo, la ampliación del número de familias hasta 31 ha hecho que se haya perdido la significación estadística, aunque aún se aprecia cierta tendencia hacia el desequilibrio. Con todo, esta aparente falta de desequilibrio de ligamiento en la población española general sugiere que el número de distintas mutaciones causales de la AF en España es elevado.

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DE LAS ATAXIAS CEREBELOSAS DE INICIO PRECOZ MEDIANTE ANALISIS DE LIGAMIENTO

En 1983 y 1984, Anita Harding propuso una clasificación de las ataxias hereditarias con

TABLA 1 «Lod scores» (Z) para pares de loci.

Pares de loci	Fracciones de recombinación θ						
	0,00	0,01	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40
D9S5-AF	8,62	8,60	7,66	6,54	4,31	2,24	0,63
D9S15-AF	- ∞	3,02	3,72	3,45	2,36	1,22	0,35

D9S5 $Z_{max} = 8,62$ ($\theta = 0,00$)D9S15 $Z_{max} = 3,72$ ($\theta = 0,05$)**TABLA 2** Características clínicas y neurofisiológicas de los pacientes de las familias RS y CV

	Familia RS				Familia CV	
	II-1	II-2	II-3	II-4	II-2	II-3
Sexo	M	M	M	M	M	M
Edad	42	38	34	26	28	24
Edad inicio	26	?	?	?	5	?
Marcha atáxica	+	+	+	- (!)	+	+
Ataxia MMSS	+	+	+	+	+	+
Ataxia MMII	+	+	+	+	+	+
Disartria	+	+	+	+	+	+
MMII:						
Reflejos	↑	↓	↓	↓	↓	
Sensibilidad vib y/o pos	↓	N	↓	↓	↓	N
Respuesta plantar	↑	↑	↑	↑	↑	N
Temblor	+	?	?	?	+	?
Escoliosis	-	-	-	-	+	+
Pes cavus	-	-	-	-	+	+
ECG	A*	N	N	N	N	N
EcoCG	ND	ND	ND	ND	N	
ENG:						N
VCM	N	ND	N	N	N	
Potenciales acción sensiti.						N
TAC	A*	ND	ND	ND	N	N
RMN	N	ND	ND	ND	ND	ND
Otros		ND			A(θ)	A(θ)

Hipocinesia
Expresión en máscara
Distonías

+: presente; -: ausente; N: normal; A: anormal; ?: no disponible; ND: no determinado; *: repolarización anómala; *: leve atrofia cerebelosa; (θ): marcada atrofia cerebelosa; ↑ aumentado; ↓ disminuido

la intención de identificar subgrupos de enfermedades en base a sus características clínicas, genéticas y patológicas. La autora distinguía dos subgrupos principales entre los síndromes atáxicos de etiología desconocida: 1) ataxias de inicio precoz (< 20 años), que se suelen

TABLA 3 «Lod scores» de la familia RS

<i>Loci marcadores</i>	<i>Fracciones de recombinación Θ</i>				
	0,00	0,05	0,10	0,20	0,30
MCT112/MspI (D9S15)	0,90	0,81	0,72	0,51	0,29
26P/BstXI (D9S5)	1,82	1,62	1,44	1,03	0,59

TABLA 4 «Lod scores» de la familia CV

<i>Loci marcadores</i>	<i>Fracciones de recombinación Θ</i>				
	0,00	0,05	0,10	0,20	0,30
MCT112/MspI (9S15)	- ∞	-0,76	-0,47	-0,21	-0,08
26P/BstXI (D9S5)	- ∞	-1,49	-0,93	-0,41	-0,16

segregar con patrón autosómico recesivo, y 2) ataxias de inicio tardío (> 20 años), que, por el contrario, se suelen segregar con patrón autosómico dominante. En el grupo de las ataxias de inicio precoz destaca por su frecuencia la ataxia de Friedreich. Además, el grupo está constituido por un gran número de trastornos más bien raros cada uno de ellos. Sin embargo, los criterios diagnósticos son fundamentalmente clínicos y neurofisiológicos y no hay ningún marcador biológico que los diferencie. A pesar de ello, la gran mayoría tienen un carácter genético y las bases moleculares tienen que ser diferentes. Por tanto, la investigación y el análisis genético de estos procesos puede aportar marcadores genéticos que permitan una mejor clasificación y diagnóstico. El primer paso en este sentido ha sido la localización del gen AF en 9q, como ya se ha mencionado anteriormente. La descripción de un gran número de marcadores estrechamente ligados al gen AF permite realizar diagnósticos moleculares de confirmación o de exclusión en relación a uno o varios pacientes que pertenezcan a la misma familia nuclear (padres e hijos afectados y sanos). El hecho de que la AF sea la ataxia de inicio precoz más frecuente nos permite utilizar estos marcadores ligados al locus AF para el diagnóstico de dos situaciones clínicas: 1) ataxias de Friedreich con variabilidad clínica intrafamiliar debido a que algún hermano presenta una sintomatología atípica y cuestiona el diagnóstico de AF, y 2) ataxias cerebelares que presentan un fenotipo Friedreich pero que no cumplen estrictamente los criterios diagnósticos de AF o presentan síntomas que son raros en la AF clásica.

La metodología a emplear se basa en un modelo restringido: se puede aplicar el análisis de los marcadores AF a familias con dos o más afectados de la enfermedad. El hallazgo de idénticos genotipos (alelos de un marcador iguales) o haplotipos (conjunto de alelos de varios marcadores) en dos hermanos afectados sugiere que el cuadro es una AF con variaciones clínicas intrafamiliares. Dado que se ha demostrado que la AF se debe a un solo gen en 9q, el cálculo de un «lod score» de 1 o mayor corroboraría el diagnóstico. Por contra,

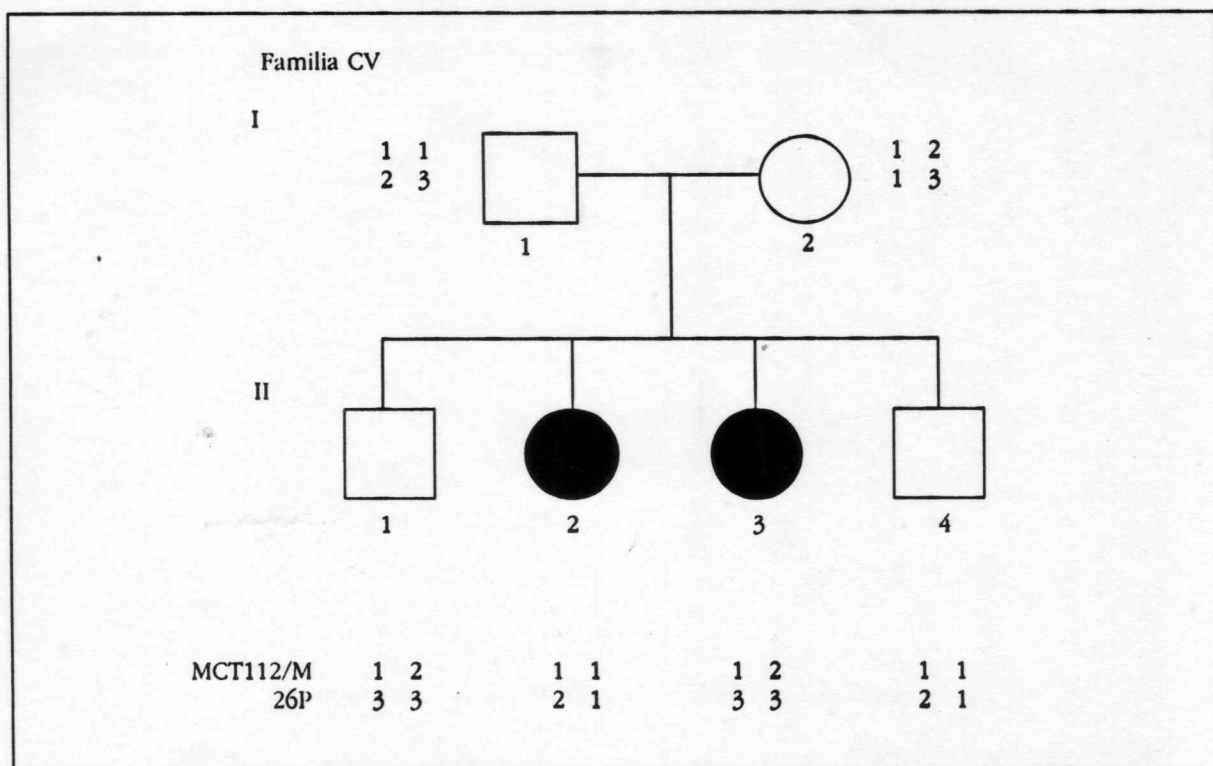


Figura 3. Se muestra el árbol genealógico de la familia CV con los haplotipos construidos con los marcadores MCT112/MspI y 26P/BstXI. Ambas hermanas afectas han heredado los dos haplotipos, paterno y materno, completamente distintos, lo que aboga porque el gen causante de su ataxia cerebelosa no es el gen AF.

la diferencia de genotipos o haplotipos sugeriría la presencia de uno o varios recombinantes genéticos entre los marcadores y el locus de la enfermedad en cuestión, debido, a priori, a la distancia genética entre ambos, por lo que se inferiría un diagnóstico distinto a AF.

Nosotros hemos podido estudiar 9 familias en las que se planteaba dudas diagnósticas en los sentidos expresados arriba. A continuación se presentan los resultados de dos de ellas los cuales demuestran las posibilidades de esta estrategia metodológica.

Familia RS: Se trata de una familia de Irún, originaria de la provincia de Cáceres, estudiada en colaboración con el Dr. M. Urtasun del Hospital «Nuestra Señora de Aránzazu» de San Sebastián. La familia está constituida por 4 hermanas afectas de un síndrome espinocerebeloso similar a la AF. En la tabla 2 se resumen los datos clínicos más relevantes. Destaca entre ellos, la edad de inicio tardía -en el límite de lo que se considera inicio precoz-, la heterogeneidad en la respuesta refleja profunda, las diferencias electrocardiográficas y las diferencias sensitivas vibratoria y posicional. La hermana mayor cumple los criterios clínicos y neurofisiológicos de AF excepto que presenta hiperreflexia osteotendinosa.

El estudio de ligamiento mostró que no había ningún recombinante entre las cuatro hermanas para ningún marcador analizado. El marcador 26P era totalmente informativo en ambos padres. Para dicho marcador se obtuvo un «lod score» de 1,82 (Tabla 3), con lo que se infería que el gen causante de la enfermedad era el gen AF.

Familia CV: Se trataba de una familia, estudiada en colaboración con el Dr. J. Vilchez de nuestro hospital, con dos hijas afectas de un síndrome espinocerebeloso y dos hijos sanos (patrón recesivo) sin consanguinidad paterna. En la tabla 2 se exponen las características clínicas y neurofisiológicas. Destaca la facies progresivamente poco expresiva y la marcada atrofia cerebelosa revelada por la RMN, muy notable en la hermana mayor.

El análisis de ligamiento mostró un número de 3 recombinantes genéticos con los marcadores ligados al locus AF (Fig. 3). El cálculo de los «lod scores» dio valores negativos (Tabla 4) por lo que se descartó definitivamente el diagnóstico de AF.

BIBLIOGRAFIA

- Harding AE. Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain* 1981;104:589-620.
- Polo JM, Calleja J, Combarros O, Berciano J. Hereditary ataxias and paraplegias in Cantabria, Spain. An epidemiological and clinical study. *Brain* 1991;114:855-866.
- López Arlandis JM. *Análisis clínico y genético de los síndromes espinocerebelosos* (Tesis Doctoral). Valencia. Universitat de València, 1991.
- Chamberlain S, Shaw J, Rowland S, Wallis J, South S, Nakamura Y, Gabain A von, Farrall M, Williamson R. Mapping of the mutation causing Friedreich's ataxia to chromosome 9. *Nature* 1988;334:248-250.
- Fujita R, Agid Y, Trouillas P, Seck A, Tommasi-Davenas C, Driesel AJ, Olek K, Grzeschik K-H, Nakamura Y, Mandel JL. Confirmation of linkage of Friedreich's to chromosome 9 and identification of a new closely linked marker. *Genomics* 1989;4:110-111.
- Shaw J, Litcher P, Driesel AJ, Williamson, Chamberlain S. Regional localisation of the Friedrich's ataxia locus to human chromosome 9q13-q21.1. *Cytogenet Cell Genet* 1991;53:221-224.
- Hanauer A, Chery M, Fujita R, Driesel AJ, Gilgenkrantz S, Mandel JL. The Friedreich's ataxia gene is assigned to chromosome 9q13-21 by mapping tightly linked markers and shows linkage disequilibrium with D9S15. *Am J Hum Genet* 1990;46:133-137.
- Wallis J, Williamson R, Chamberlain S. Identification of a hypervariable microsatellite polymorphism within D9S15 tightly linked to Friedreich's ataxia. *Hum Genet* 1990;85:98-100.
- Fujita R, Hanauer A, Sirugo G, Heilig R, Mandel JL. Additional polymorphisms at marker loci D9S5 and D9S15 generate extended haplotypes in linkage disequilibrium with Friedreich's ataxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:1800-1976.
- Chamberlain S, Shaw J, Wallis J, Rowland A, Chow L, Farrall M, Keats B, Ritcher A, Roy M, Melancon S, Deufel T, Berciano J, Williamson R. Genetic homogeneity at the Friedreich's ataxia locus on chromosome 9. *Am J Hum Genet* 1989;44:518-521.
- Pandolfo M, Sirugo G, Antonelli A, Weitnauer L, Ferretti L, Leone M, Dones I, Cerino A, Fujita R, Hanauer A, Mandel JL, Di Donato S. Friedreich's ataxia in Italian families: Genetic homogeneity and linkage disequilibrium with the marker loci D9S5 and D9S15. *Am J Hum Genet* 1990;47:228-235.
- Richter A, Melançon S, Farrall M, Chamberlain S. Friedreich's ataxia: Confirmation of gene localization to chromosome 9 in the Quebec French Canadian population. HGM10. *Cytogenet Cell Genet* 1989;51:1066.
- Palau F, López-Arlandis J, Vilchez J, Prieto F. Genetic studies of Friedreich's ataxia in a Spanish population: epidemiological and molecular linkage analysis (Abstract). *Am J Hum Genet* 1991;49:1989a.