

Diagnóstico Molecular del Pseudohipoparatiroidismo

Luis Castaño, Gustavo Pérez de Nanclares, Aníbal Aguayo, Idoia Martínez de la Piscina
Hospital Universitario Cruces, BioCruces, UPV/EHU CIBERDEM, CIBERER. Barakaldo, Bizkaia

Introducción

El término pseudohipoparatiroidismo (PHP) engloba un grupo de enfermedades endocrinas raras caracterizadas por hipocalcemia, hiperfosfatemia y elevación de los valores de la hormona paratiroidea (PTH), debido a una resistencia variable a esta hormona en sus tejidos diana, principalmente el túbulo renal proximal. Su prevalencia exacta es desconocida, estimándose en 0,79 por 100.000 habitantes (Orphanet, <http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>).

Los primeros casos fueron descritos por Albright en 1942, siendo la primera descripción de un síndrome de resistencia hormonal. La administración de PTH exógena a los pacientes afectados no demostraba un aumento del AMPc urinario, por lo que se sugirió que el defecto se encontraba a nivel del receptor de la PTH o post-receptor. Posteriormente, se ha sabido que esta resistencia hormonal está habitualmente causada por defectos en la subunidad α de la proteína G estimuladora ($G_{s\alpha}$), una proteína de señalización esencial que actúa en la vía de la PTH y de otras hormonas (TSH, glucagón, gonadotropinas...). La proteína $G_{s\alpha}$ está codificada por el gen *GNAS* (*Guanine Nucleotide binding protein Alpha Stimulating*; OMIM#139320), situado en 20q13.2-13.3. Esa región genómica (*locus* *GNAS*) es altamente compleja, ya que genera diferentes transcritos (codificantes y no codificantes) mediante el uso de diferentes promotores y primeros exones, que se empalman a un grupo común de exones posteriores. La complejidad del *locus* *GNAS* aumenta al estar sometido al mecanismo de impronta, lo que provoca que los transcritos resultantes se puedan expresar a partir del alelo materno, del paterno, o de ambos, en función del tejido del que se trate.

Estructura del *locus* *GNAS*

Como se ha comentado, el *locus* *GNAS* (20q13) genera diferentes transcritos, que tienen en común los exones 2-13, y que se diferencian en distintos primeros exones alternativos, pudiéndose traducir a proteínas (proteínas $G_{s\alpha}$, XL_{α} , *NESP55*) o no (el transcrito iniciado a partir del exón A/B). Los diferentes transcritos son expresados a partir del alelo materno, del paterno, o de ambos (Figura 1).

Estructuralmente, la proteína $G_{s\alpha}$ está codificada por el gen *GNAS*, formado por 13 exones, de los cuales el primer exón es específico para la proteína $G_{s\alpha}$ y los otros 12 exones (exón 2 a exón 13) son comunes a varios transcritos.

Una segunda proteína generada en este *locus* es XL_{α} (*eXtra Large Gsa*). Está formada por otro exón 1 alternativo, situado unas 35 kb antes del exón 1 de $G_{s\alpha}$, que se une a los exones comunes 2-13, dando un transcrito y una proteína con similares funciones que $G_{s\alpha}$, pero más larga, y que se expresa fundamentalmente en tejido neuroendocrino.

Una tercera proteína de este *locus* es *NESP55* (*Neuroendocrine Secretory Protein 55*), codificada por otro primer exón alternativo más alejado (a 49 kb del exón 1 de $G_{s\alpha}$) y que incluye asimismo los exones comunes 2-13. Esta proteína es similar a la cromogranina que se expresa en los tejidos neuroendocrinos.

Otro primer exón alternativo, llamado exón A/B o exón 1A, y situado próximo al exón 1 de $G_{s\alpha}$ (a 2,5 kb), se une con el resto de los exones comunes 2-13. En ese caso, debido a que no hay un comienzo consenso de traducción AUG en el exón A/B, se piensa que el transcrito resultante no es traducido.

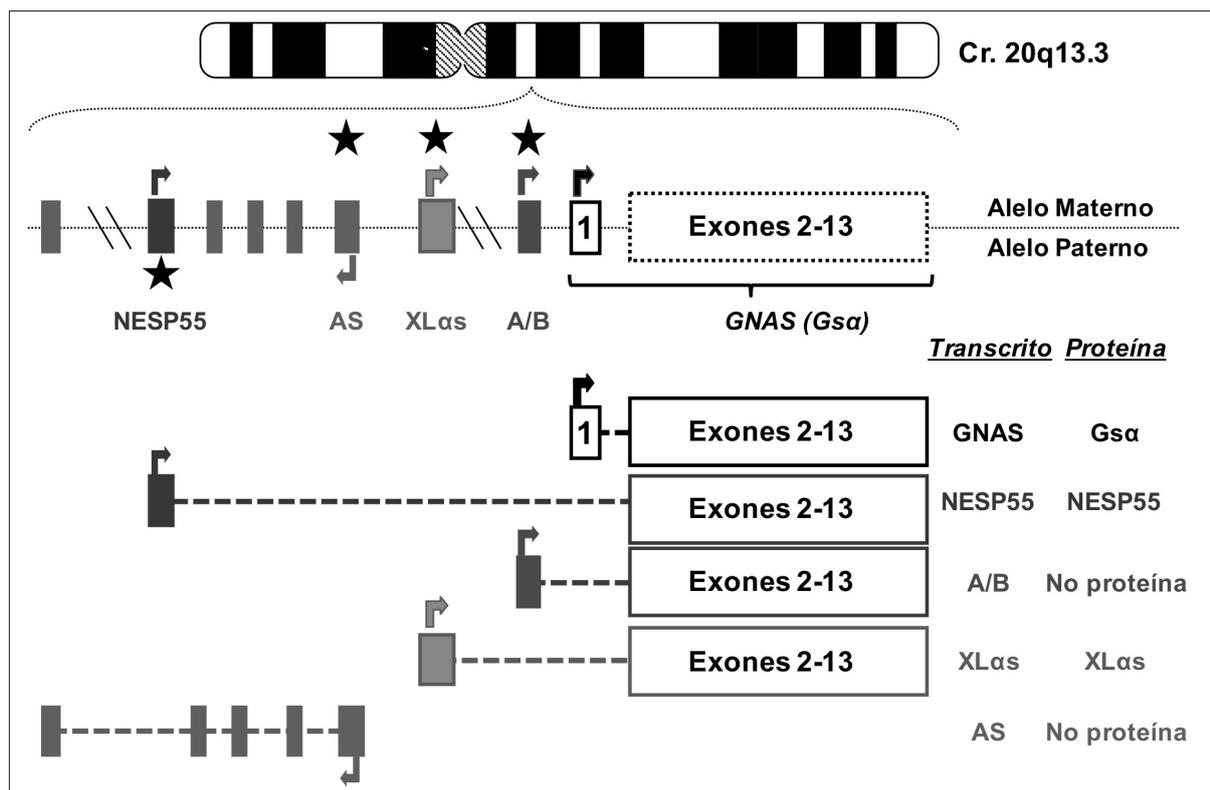


Figura 1. **Estructura del locus GNAS.** Las cajas y las líneas verticales representan los exones. Entre los exones están los intrones (línea horizontal). Las flechas indican el punto de comienzo y el sentido de lectura de los principales transcritos. Cuatro de los transcritos (GNAS, NESP55, A/B, XLas) sólo difieren en el primer exón 1 alternativo, mientras que los exones 2-13 son comunes. En blanco, el exón 1 que al unirse a los exones comunes 2-13, codifica para la propia proteína *Gsa*; en azul, el exón A/B, que al unirse al resto de exones comunes genera un transcrito que no codifica para ninguna proteína; en gris, el exón XLas, que al unirse a los exones 2-13 codifica para una forma larga de proteína *Gsa* (XLas); en verde, el exón codificante de NESP55. En rojo los cinco exones (antisentido) de AS. Las estrellas negras indican el tipo de *imprinting* (materno, en la parte superior; o paterno, en la parte inferior). El gen *GNAS* (proteína *Gsa*) es de expresión bialélica en la mayor parte de los tejidos.

Por último, en este *locus* también se produce el transcrito antisentido AS, GNAS-AS1 o NESPas, cuyo primer exón está antes de XLas y tiene 5 exones que atraviesan NESP55 (en dirección contraria o antisentido). El transcrito AS no se traduce a proteína.

Imprinting del locus GNAS

La mayoría de los genes del organismo funcionan a través de la expresión de sus dos alelos (materno y paterno). Sin embargo, algunos genes tienen uno de sus dos alelos inactivados o con fenómeno de *imprinting*; en este caso, el individuo hereda de sus progenitores los dos alelos, pero uno de ellos no se expresa (o está inactivo). Generalmente, está inactivación se produce mediante metilación de islas CpG de dicho alelo. Si la metilación afecta al alelo heredado de la madre hablamos de que ese gen sufre *imprinting* materno (en este caso, el individuo es normal solamente con la expresión génica del alelo paterno, ya que el alelo materno está inactivo), y viceversa, si el inactivo o metilado es el hereda-

do del padre hablaríamos de *imprinting* paterno (en este caso, el individuo es normal solamente con la expresión génica del alelo materno).

Los diferentes genes del *locus* GNAS tienen diferentes patrones de metilación o *imprinting* (existen tres DMR, o *differentially methylated regions*) y los diferentes transcritos resultantes (proteínas *Gsa*, XLas, NESP55 y transcritos A/B y AS) están sometidos al menos en algún tejido a *imprinting* genético, según lo cual normalmente sólo se expresa un alelo (Figura 2).

Así, el transcrito que procede de la unión del exón 1 con el resto de los exones comunes (2-13), que codifica para la propia proteína *Gsa* (gen *GNAS*), tiene expresión bialélica en la mayoría de los tejidos, pero en algunos tejidos (hipófisis, tiroides, gónadas y túbulo renal), tienen expresión monoalélica (la expresión del alelo paterno está silenciada y solo se expresa el alelo materno). También el transcrito NESP55 tiene metilado el alelo paterno, por lo que NESP55 sólo se expresa a partir del alelo materno.

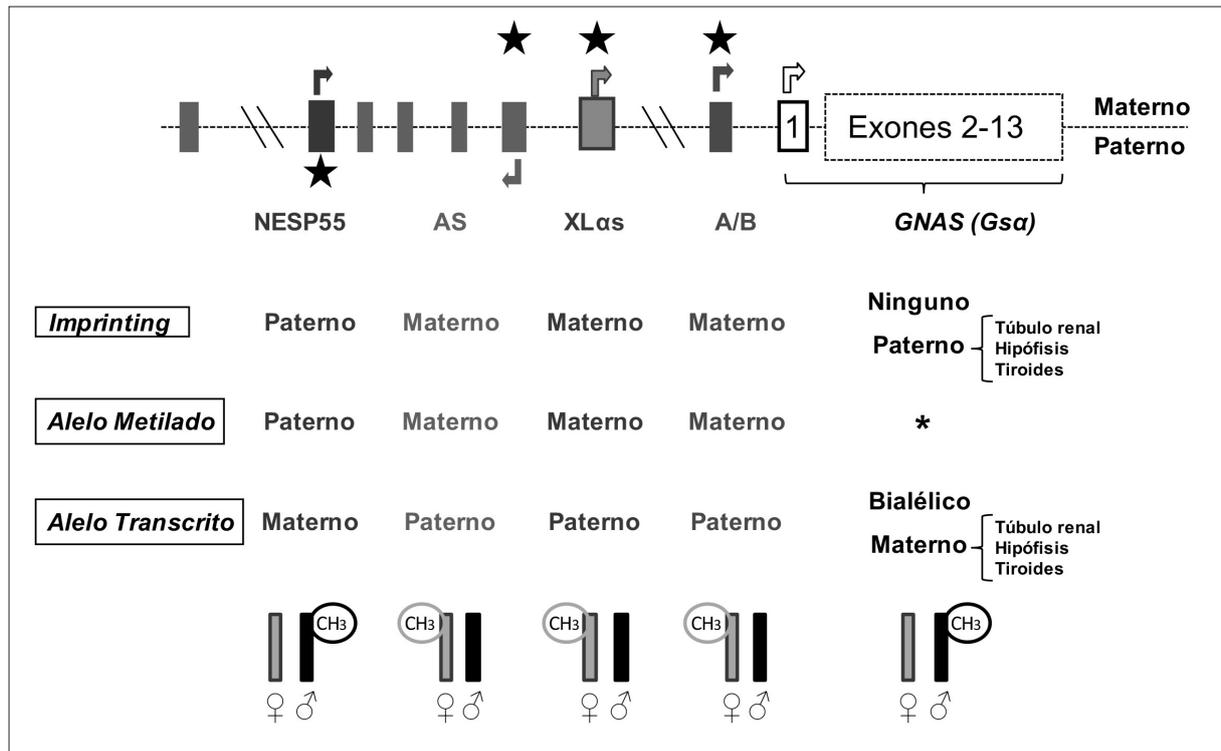


Figura 2. **Patrones de imprinting del locus GNAS.** El transcrito NESP55 tiene *imprinting* paterno, mientras que XLas, A/B y AS presentan *imprinting* materno en todos los tejidos. Los transcritos de G α se expresan bialélicamente en la mayoría de los tejidos, presentando *imprinting* paterno (se expresa sólo el alelo materno) algunos tejidos como el túbulo renal proximal, tiroides, gónadas e hipófisis. * Se desconoce el mecanismo de *imprinting* del gen GNAS.

Por el contrario, los transcritos A/B y AS y la proteína XLas tienen *imprinting* materno (está metilado el alelo heredado de la madre) y sólo se transcribe el alelo paterno.

La impronta de estos genes está controlada al menos por dos regiones controladoras de impronta (*imprinting control regions*, ICRs); una localizada en el gen *syntaxina-16* (*syntaxin-16*, *STX16*), que controla el *imprinting* de A/B, y otra localizada en una región que abarca los exones 3 y 4 de AS y que controla el *imprinting* de todo el locus GNAS.

Según esto, el trastorno molecular, el cuadro clínico, y el patrón de herencia del PHP cuando es debido a trastornos de la proteína G α estará regido por este fenómeno de silenciamiento alélico o *imprinting*.

Clasificación clínica del Pseudohipoparatiroidismo (PHP) y alteraciones genéticas en el locus GNAS

Hay dos tipos de pseudohipoparatiroidismo, PHP tipo 1 y tipo 2, clasificados en base a la excreción urinaria de AMP cíclico (AMPc) y de fosfato tras una administración exógena de PTH. Normalmente, la PTH en el túbulo renal proximal inhibe la reabsorción de fósforo mediado por la vía del AMPc. En el

PHP tipo 1 (PHP1) los niveles de AMPc y de fosfato urinarios no responden a la PTH y se mantienen bajos, mientras que en el PHP tipo 2 los niveles de fosfato urinarios son bajos, pero el AMPc responde a la PTH de forma normal. Se han descrito varios subtipos de PHP tipo 1 [(PHP1A, OMIM#103580), (PHP1B, OMIM#603233) y (PHP1C, OMIM#612462)] (Tabla 1).

1.- Mutaciones inactivantes en el gen GNAS (proteína G α) y PHP1A y pseudo-pseudohipoparatiroidismo (PPHP)

Los pacientes con PHP tipo 1A (PHP1A) se caracterizan por una resistencia multihormonal acompañada del fenotipo de "Osteodistrofia Hereditaria de Albright" (AHO), caracterizado por cara redondeada, cuello corto, obesidad, calcificaciones subcutáneas e intracraneales, braquidactilia bilateral en manos y pies y/o retraso mental. La resistencia hormonal incluye diferentes ejes hormonales, reflejo de la alteración a nivel de diferentes hormonas cuyas acciones están mediadas a través de receptores acoplados a proteína G α . Así, hay resistencia a la PTH con hipocalcemia, hiperfosfatemia y niveles elevados de PTH en sangre, así como una respuesta disminuida en la producción de AMPc a la administración de PTH exógena. Presentan además

Tabla 1. Tipos/Subtipos de pseudohipoparatiroidismo (PHP)

	Fenotipo AHO*	Resistencia hormonal	AMPc en orina	Ca en sangre	P en sangre	Infusión de PTH		Actividad Gs α	Defecto genético en el locus GNAS
						AMPc	P orina		
PHP1A	SI	Múltiple	↓	↓	↑	↓	↓	↓	Mutación inactivante en alelo materno del gen GNAS
PHP1B	NO	PTH (TSH)	↓	↓	↑	↓	↓	N	Pérdida de metilación en locus GNAS
PHP1C	SI	Múltiple	↓	↓	↑	↓	↓	N	Mutación inactivante en alelo materno del gen GNAS
PHP2	NO	PTH	↓	↓	↑	↑	↓	N	¿?
PPHP#	SI	NO	N	N	N	↑	↑	N/↓	Mutación inactivante en alelo paterno del gen GNAS

* AHO: Osteodistrofia hereditaria de Albright
PPHP: Pseudo-pseudohipoparatiroidismo N: normal

resistencia variable a otras hormonas, como son la TSH, con leve hipotiroidismo, hipogonadismo o deficiencia de hormona de crecimiento, reflejo de la resistencia a la acción de las gonadotropinas o de la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH). La actividad eritrocitaria de Gs α está reducida aproximadamente a la mitad (50%). En ocasiones el hipotiroidismo es la primera manifestación.

A nivel molecular, el PHP1A (resistencia hormonal y fenotipo AHO) es debido a mutaciones inactivantes en heterocigosis que afectan a los exones codificantes del gen GNAS (del exón 1 al exón 13), en el alelo materno. Si la mutación se hereda del padre se presenta solamente un fenotipo AHO sin resistencia hormonal, es decir, un pseudo-pseudohipoparatiroidismo (PPHP, OMIM#612463). En ambos casos la mutación puede ser heredada o *de novo*. Es decir, si la madre (ya sea ésta PHP1A o PPHP) transmite la mutación o ésta se produce *de novo* en el alelo materno se obtendrá un PHP1A. Si el padre (ya sea éste PHP1A o PPHP) transmite la mutación o ésta se produce *de novo* en el alelo paterno se obtendrá un PPHP.

Esto es debido a que en condiciones normales el gen GNAS es expresado en todos los tejidos de forma bialélica (actividad 100%), excepto en algunos tejidos (túbulos renales, tiroides, hipófisis, gónadas, etc.), que tienen fisiológicamente silenciado el alelo paterno y solo se expresa el alelo materno (actividad 50%) (Figura 3). Cuando hay una mutación en

el alelo materno, como es el caso del PHP1A, en aquellos tejidos que tienen expresión bialélica se expresa solamente el 50%, correspondiente al alelo paterno, de ahí el fenotipo AHO, y en aquellos tejidos con silenciamiento fisiológico paterno (p. e.: túbulo renal o tiroides, etc.), la actividad es 0% por la mutación en el alelo materno (dando la resistencia hormonal característica del PHP1A). En contraste, en el caso de que la mutación esté en el alelo heredado del padre, en los tejidos de expresión bialélica existe solo el 50% (dando fenotipo AHO), pero en los de expresión fisiológica monoalélica materna se mantiene la actividad al 50% (ya que el alelo mutado paterno es el que fisiológicamente ya está silenciado), por lo que no hay resistencia hormonal (este es el caso del pseudo-pseudohipoparatiroidismo) (Figura 3).

Los fenotipos PPHP y PHP1A pueden aparecer en la misma familia en diferentes generaciones (en función de que la mutación proceda en esa generación del alelo materno o paterno), pero nunca se presentan juntos en la misma generación (entre hermanos).

Con respecto al consejo genético, el riesgo de transmitir PHP1A a partir de una madre con mutación responsable de PHP1A o de PPHP será del 50%; si la madre transmite PHP1A a una hija, el riesgo será igual en la generación siguiente; si transmite PHP1A a un hijo varón, éste en la generación siguiente no transmite PHP1A (pero puede transmitir en el 50% de los casos la mutación inactivada que dará lugar a

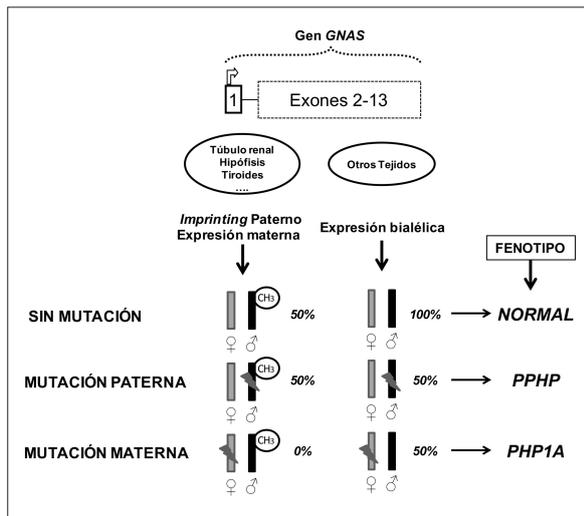


Figura 3. En condiciones normales el gen *GNAS* es expresado en todos los tejidos de forma bialélica (actividad 100%), excepto en algunos tejidos (túbulos renales, tiroides, hipófisis, gónadas, etc.), que tienen fisiológicamente silenciado el alelo paterno y sólo se expresa el alelo materno (actividad 50%). Cuando hay una mutación en el alelo materno, como es el caso del PHP1A, en aquellos tejidos que tienen expresión bialélica se expresa solamente el 50% correspondiente al alelo paterno (de ahí el fenotipo AHO) y en aquellos tejidos con silenciamiento fisiológico paterno (p. e.: túbulo renal, tiroides, etc.), la actividad es 0% por la mutación en el alelo materno (dando la resistencia hormonal característica del PHP1A). En contraste, en el caso de la mutación heredada del alelo paterno, en los tejidos de expresión bialélica existe solo el 50% (dando fenotipo AHO), pero en los de expresión fisiológica monoalélica materna se mantiene la actividad al 50% (ya que el alelo mutado paterno es el que fisiológicamente ya está silenciado), por lo que no hay resistencia hormonal (este es el caso del Pseudo-Pseudohipoparatiroidismo)

un PPHP). Sin embargo, un padre PHP1A o PPHP nunca transmitirá un PHP1A, pero sí transmitirá en el 50% de los casos la mutación inactiva (PPHP); en la generación siguiente, si es un varón el que ha heredado la mutación inactiva tendrá de nuevo un PPHP; por el contrario, si es una hija la que ha heredado la mutación inactiva tendrá un PPHP y en la generación siguiente ella a su vez la puede transmitir en el 50% de los casos activa (o sea, resultando en un PHP1A).

2.- Alteraciones en la impronta o en la metilación: PHP tipo 1B

El PHP tipo 1B (PHP1B) se caracteriza por resistencia renal a la PTH con ausencia de fenotipo AHO y resistencia multihormonal más limitada que el PHP1A (hay casos descritos de moderada resistencia a TSH). Como en el PHP1A, tiene también una menor respuesta en la producción de AMPc tras la

administración exógena de PTH, pero la actividad eritrocitaria de $Gs\alpha$ es normal o levemente baja.

Si bien el PHP1A y el PPHP se asocian con mutaciones inactivantes en el gen *GNAS*, el PHP1B se asocia con alteraciones en la metilación en el locus *GNAS*. Esta alteración supone una pérdida de metilación del locus A/B o de una región más amplia del locus *GNAS* (A/B, AS o XLas) o una ganancia de metilación en NESP55. Estos cambios en la metilación pueden ser completos o parciales. Recientemente, se ha descrito alguna familia con alteraciones en la metilación del locus *GNAS* (característico del PHP1B), asociada a fenotipo AHO y resistencia hormonal (característico de PHP1A), por lo que hoy en día se clasifican los pacientes como PHP1A o PHP1B utilizando el criterio del trastorno genético asociado, más que por el fenotipo (mutaciones inactivantes en gen *GNAS* para el PHP1A o alteraciones en la metilación en el locus *GNAS* para el PHP1B).

El PHP1B puede ocurrir en casos esporádicos (spor-PHP1B) o casos familiares con herencia autosómica dominante (AD-PHP1B). No hay diferencias clínicas claras entre ambas formas.

Frecuentemente, el AD-PHP1B se caracteriza por una pérdida aislada de la metilación del exón A/B materno, que se asocia con microdeleciones en heterocigosis del gen *STX16*, también en el alelo materno. Se han descrito también microdeleciones en los cercanos genes *NESP55* y *AS*, que provocan una pérdida de metilación que afecta a todo el locus *GNAS*, incluido A/B. En estos casos familiares, la resistencia hormonal aparece sólo si el trastorno se hereda por vía materna.

La causa de los trastornos en la metilación en casos esporádicos (spor-PHP1B) es más incierta. En algún caso se han detectado disomías parentales [UPD(20)pat], pero en la mayoría no se han descrito elementos (en cis o en trans) que expliquen estas alteraciones, suponiéndose entonces como errores al azar en el mantenimiento de la impronta durante la etapa embrionaria.

Hay un grupo pequeño de casos familiares y esporádicos de PHP1B en los que el trastorno asociado incluye una duplicación de regiones del locus *GNAS*, siempre asociado a transmisión materna de dicho trastorno.

De cara al consejo genético, la enfermedad se presenta sólo cuando la microdelección (bien en *STX16*, bien en *NESP55* o *AS*) o la duplicación son heredadas por línea materna. En este caso, al heredarse ese trastorno en el alelo materno, la descendencia presenta pérdida en la metilación, que es la causa de la aparición de la enfermedad. El cuadro clínico

es más leve, no presentándose fenotipo de Albright (o si existe es muy leve), y sólo se han encontrado alteraciones hormonales a nivel de PTH y TSH. Si la alteración estructural es heredada del padre, no tendrá consecuencias en esa generación, y sólo aparecerá pérdida en la metilación (y, por tanto, cuadro de pseudohipoparatiroidismo) cuando sea transmitida por una mujer en cualquiera de las generaciones posteriores. En algunos casos en los que hay pérdida de metilación del exón A/B o de la forma combinada exón A/B más XL α s y no se detectan microdeleciones o duplicaciones asociadas, no se puede precisar el riesgo de transmisión de la enfermedad, por lo cual sólo podemos decir que la enfermedad, en el individuo estudiado, es causada por la pérdida de metilación, pero el riesgo en las generaciones siguientes es incierto.

3.- Pseudohipoparatiroidismo tipo 1C

El PHP1C es una entidad clínica parecida al PHP1A (los pacientes presentan resistencia multihormonal, fenotipo AHO y respuesta baja en la producción de AMPc tras la administración exógena de PTH). A nivel molecular, el PHP1C se debe también a mutaciones inactivantes en el alelo materno del gen *GNAS*. El PHP1C se diferencia del PHP1A en que la actividad eritrocitaria de Gs α se mantiene normal. Podría explicarse por el lugar que ocupa la mutación en el gen *GNAS* [mutación en la región carboxi-terminal (a menudo en el exón 13), implicada en la interacción de la proteína Gs α con el receptor]. Sin embargo, también se hipotetiza con que estas diferencias en la actividad eritrocitaria son provocadas de manera artificial durante su determinación analítica, lo que sumado al escaso número de casos descritos y a su semejanza con el PHP1A hacen dudar que sea una entidad propia.

4.- Pseudohipoparatiroidismo tipo 2

Los pacientes con PHP2 (OMIM#203330) también tienen hipocalcemia, hiperfosfatemia y resistencia a la PTH, pero no presentan fenotipo AHO ni hay otras afectaciones hormonales. Hasta la actualidad sólo se han descrito unos pocos casos de PHP2 y la naturaleza del defecto molecular responsable de esta variante de PHP se desconoce (no se ha detectado alteración genética en la región del *locus* *GNAS*), pero se piensa que se encuentra distal a la generación de AMPc ya que los niveles de producción de AMPc son normales tras la administración exógena de PTH, aunque la respuesta fosfática está alterada. Se ha asociado a mutaciones en los genes *PRKAR1A* o *PDE4D*.

5.- Otras alteraciones asociadas al gen *GNAS*

La **heteroplasia ósea progresiva o POH** (OMIM#166350) es una enfermedad rara que se

caracteriza por la osificación progresiva de tejidos blandos (dermis y tejido conectivo, músculo, fascias, etc.). El comienzo suele ser en la infancia, produciéndose una formación ósea heterotópica de manera progresiva en tejidos internos. La distribución de la osificación suele limitarse a dermatomas y de un solo lado. Como el PPHP, la POH está causada por mutaciones inactivantes del alelo de origen paterno en el gen *GNAS*, tanto en los casos esporádicos como en los familiares. Sin embargo, generalmente, no hay el fenotipo AHO característico del PPHP, por lo que no se conoce por qué unas mutaciones inactivantes del alelo paterno del gen *GNAS* se asocian a PPHP y otras a POH. Estudios recientes plantean que la gravedad del tipo de mutación (*missense vs nonsense o frameshift*) podría ser la explicación. También se ha postulado que para que haya POH se necesita que haya una alteración en línea germinal y una segunda mutación en línea somática (*two hit*).

En el caso del **Osteoma Cutis** (OC) aislado, también asociado a mutaciones inactivantes en *GNAS* de origen paterno, se produce asimismo una osificación heterotópica sin alteración hormonal ni AHO, pero la formación de nódulos o placas se limita a la dermis y a tejidos subcutáneos, por lo que se considera la manifestación inicial de POH, o una forma limitada de la misma.

Diversas **mutaciones activantes** en el gen *GNAS*, de tipo dominante, producen proteínas denominadas oncogén *gsp*, que se asocian con tumores endocrinos y no endocrinos al producirse en línea somática: adenomas hipofisarios secretores de GH o ACTH, tumores en el tiroides, carcinomas renales, etc. Por otra parte, el **síndrome de McCune Albright** (MAS, OMIM#174800), que cursa con una triada clásica de displasia fibrosa poliostótica, pubertad precoz periférica y manchas cutáneas "de café con leche", está causado por mutaciones somáticas activantes en mosaico en la posición Arg201 o Gln227 del gen *GNAS*.

6.- Alteraciones con fenotipos similares a PHP

El **síndrome AHO-like** (OMIM #600430) es una enfermedad rara (incidencia de 1:10.000) que cursa con un fenotipo similar al del PHP: braquidactilia, afectando a metacarpos y metatarsos, estatura baja, facies dismórfica y, en ocasiones, una discapacidad intelectual moderada. Sin embargo, existe presencia de grandes malformaciones en un 30% de los pacientes: anomalías cardíacas, genitourinarias, gastrointestinales, del sistema nervioso central, etc., y ausencia de alteraciones en el metabolismo calcio/fósforo. El síndrome está causado por deleciones terminales en 2q37, de diferentes tamaños y afectando a diversos genes, lo que provoca la clínica variable que lo caracteriza.

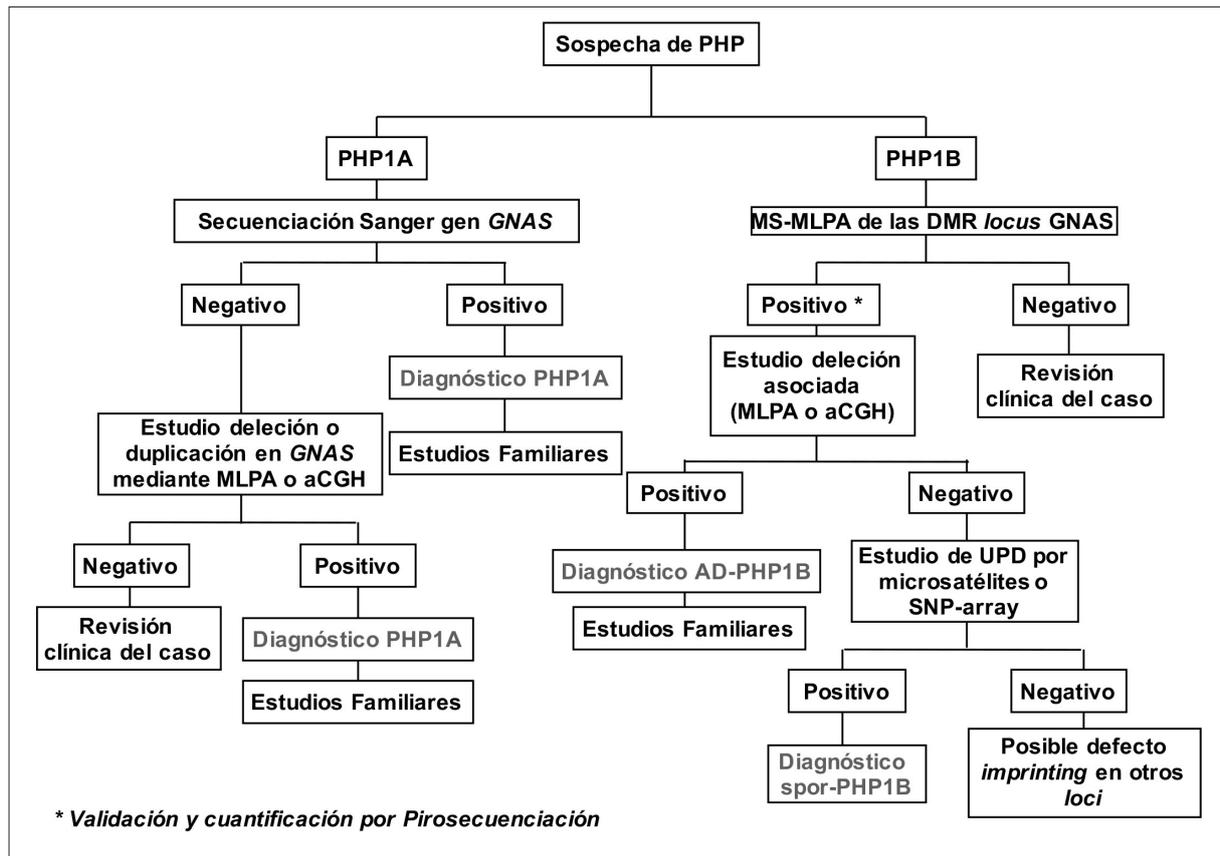


Figura 4. Métodos de estudio molecular del locus GNAS.

MLPA: multiplex ligation-dependant probe amplification. **MS-MLPA:** methylation specific-multiplex ligation-dependant probe amplification. **aCGH:** comparative genomic hybridization array. **SNP-array:** single nucleotide polymorphism array. **DMR:** Regiones diferencialmente metiladas. **UPD:** disomía uniparental.

Las **acrodiosostosis tipo 1** (OMIM#101800, ACRDYS1) y **tipo 2** (OMIM#614613, ACRDYS2) son displasias óseas raras caracterizadas por braquidactilia severa, disostosis facial, estenosis espinal, estatura moderadamente baja y presencia o no de resistencia hormonal en ambos casos. El fenotipo, además de la ocasional resistencia multihormonal, asemeja ambas acrodiosostosis con el PHP, lo que hace difícil su diagnóstico diferencial. En general, las acrodiosostosis no cursan con calcificaciones subcutáneas o intracraneales, lo que puede orientar el diagnóstico. Asimismo, las acrodiosostosis 1 y 2 son prácticamente indistinguibles entre sí a nivel clínico, por lo que se necesita un diagnóstico molecular. Así, la ACRDYS1 está causada por mutaciones heterocigotas inactivantes en el gen *PRKAR1A* (17q24.2), mientras que la ACRDYS2 está causada por mutaciones en el gen *PDE4D* (5q11.2-q12.1).

Métodos moleculares empleados en el estudio del locus GNAS

En función de la sospecha clínica, se puede proponer un algoritmo de diagnóstico genético (Figura 4). El estudio en ambas hebras de ADN de los exo-

nes 1-13 y regiones intrónicas flanqueantes del gen *GNAS* mediante **secuenciación directa por tecnología Sanger** se realizará para la detección de mutaciones puntuales o deleciones o inserciones pequeñas en pacientes con sospecha de PHP1A. Si no se detectara ninguna alteración, es necesario confirmar la presencia de grandes deleciones o duplicaciones en la región mediante el uso de las técnica de **MLPA** (*multiplex ligation-dependant probe amplification*) o **arrays-CGH**. En caso de existir alguna de estas alteraciones, es necesario realizar el estudio en los familiares directos disponibles, con el fin de poder facilitarles un seguimiento clínico y un consejo genético adecuado.

Los pacientes con sospecha clínica de PHP1B serán estudiados por **MS-MLPA** (*methylation specific-multiplex ligation-dependant probe amplification*) para detectar defectos en la metilación de la región y, simultáneamente, las deleciones o duplicaciones descritas asociadas a dichos defectos en la impronta. Es posible que sea necesario el uso de **arrays-CGH** o **long-PCR** para determinar el alcance de dichos defectos estructurales. En caso de disponer de la tecnología necesaria, es recomendable validar

esa alteración en la impronta y cuantificar el estado de la metilación en las DMR de la región mediante **pirosecuenciación** con *primers* específicos tras tratamiento con bisulfito del ADN genómico.

Si existe pérdida de metilación en el *locus* GNAS sin alteraciones estructurales asociadas, es necesario descartar la disomía uniparental [UPD(20)pat] mediante **PCR fluorescente de microsatélites** de la región 20q, o **arrays-SNP**, siendo imprescindible en estos casos el análisis del trío familiar (caso índice y ambos progenitores).

Resumen

- El pseudohipoparatiroidismo (PHP) se asocia con alteraciones en el *locus* GNAS en 20q13.
- GNAS es un complejo *locus* improntado, cuyo producto principal es la proteína Gs α .
- Mutaciones inactivantes en el gen GNAS provocan PHP1A o PHP1C cuando son transmitidas por la madre; cuando son transmitidas por el alelo paterno producen PPHP o, en algunos casos, heteroplasia ósea progresiva (POH).
- Mutaciones activantes en el gen GNAS producen síndrome de McCune Albright (MAS), o tumores endocrinos.
- El gen GNAS esta improntado y se expresa principalmente a partir del alelo materno en algunos tejidos diana, por lo que el heredar mutaciones vía materna implica también una resistencia multihormonal (PHP1A).
- Un segundo tipo de alteraciones que a veces se observan en los PHP, en aquellos pacientes que no tienen mutaciones en el gen GNAS, son las alteraciones en el patrón de metilación en el *locus* GNAS que se asocian a PHP1B. Éstas puede ser:
 - Pérdida de metilación del exón 1A (exón A/B). Estos pacientes tienen resistencia a PTH y no desarrollan AHO, ya que los defectos en el *imprinting* no tienen efectos en la expresión de Gs α en la mayoría de los tejidos, debido a que Gs α se expresa de forma bialélica (excepto en algunos tejidos: túbulo renal, hipófisis, gónadas, etc.). En la mayoría de las familias la pérdida de metilación en este exón se ve acompañada de una delección en la región del gen STX16 que es heredada de la madre (situada antes del extremo 5' del gen).
 - Pérdida en la metilación combinada de otros genes del *locus* GNAS. Algunos ca-

sos con pérdida de metilación combinada han presentado una delección (también heredada de la madre) en la región de NESP55 y el promotor antisentido. Unos pocos casos presentan pérdida de metilación combinada asociada a duplicaciones de origen materno en la región GNAS.

- La pérdida de metilación completa (incluyendo el exón A/B y XL α s) también puede deberse a la isodisomía paterna, es decir, al hecho de haber recibido los dos cromosomas 20q de origen paterno y ninguno materno.
- El PHP1B se presenta sólo cuando la delección (bien en STX16, bien en NESP55) o la duplicación es heredada de una mujer. Al ocurrir este trastorno y ser transmitido por una mujer, se acompañará de una pérdida en la metilación en la descendencia, que es la causa de la aparición de la enfermedad.
- La pérdida de metilación en sí no se hereda. Sin embargo, en un 50% de los casos, la alteración estructural portada por la madre puede ser heredada y entonces, los pacientes presentarán pérdida de metilación. Si la alteración es heredada del padre, no tendrá consecuencias en esa generación, y sólo aparecerá pérdida en la metilación (y por tanto cuadro de pseudohipoparatiroidismo) cuando sea transmitida por una mujer en cualquiera de las generaciones posteriores.
- En algunos casos con pérdida de metilación del exón 1A o de la forma combinada exón 1A más XL α s, no se detectan delecciones o duplicaciones asociadas. En este caso no podemos precisar el riesgo de transmisión de la enfermedad. Solo se puede decir que la enfermedad, en el individuo estudiado, es causada por la pérdida de metilación, pero el riesgo a generaciones siguientes es incierto.

Referencias bibliográficas

- 1- Turan S, Bastepe M. GNAS Spectrum of Disorders. Curr Osteoporos Rep. 2015 Jun;13(3):146-58. doi: 10.1007/s11914-015-0268-x.
- 2- Lemos MC, Thakker RV. GNAS mutations in Pseudohypoparathyroidism type 1a and related disorders. Hum Mutat. 2015 Jan;36(1):11-9. doi: 10.1002/humu.22696. Epub 2014 Nov 28.
- 3- Turan S, Bastepe M. The GNAS complex locus and human diseases associated with loss-of-function mutations or epimutations within this imprint-

ted gene. *Horm Res Paediatr.* 2013;80(4):229-41. doi: 10.1159/000355384. Epub 2013 Oct 3.

4- Mantovani G, Linglart A, et al. Clinical utility gene card for: pseudohypoparathyroidism. *Eur J Hum Genet.* 2013 Jun;21(6). doi: 10.1038/ejhg.2012.211. Epub 2012 Sep 12.

5.- Bréhin AC, Colson C, et al. Loss of Methylation at GNAS Exon A/B Is Associated With Increased Intrauterine Growth. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015 Apr; 100(4): E623–E631. Epub 2015 Jan 20. doi: 10.1210/jc.2014-4047.

6.- Linglart A, Maupetit-Mehouas S, Silve C. GNAS-Related Loss-of-Function Disorders and the Role of Imprinting. *Horm Res Paediatr* 2013;79:119–129 DOI: 10.1159/000348516

7.- Perez-Nanclares G, Velayos T, et al Pseudohypoparathyroidism type Ib associated with novel duplications in the GNAS locus. *PLoS One.* 2015 Feb 24;10(2):e0117691. doi: 10.1371/journal.pone.0117691. eCollection 2015.

8.- Cairns D, Pignolo R, et al. Somatic disruption of GNAS in chick embryos mimics progressive osseous heteroplasia. *J Clin Invest.* 2013;123(8):3624–3633. doi:10.1172/JCI69746.