

Estudios genéticos en el diagnóstico de la osteoporosis y otras enfermedades metabólicas óseas

Riancho JA¹, Fernández-Luna JL²

¹ Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Marques de Valdecilla. Departamento de Medicina y Psiquiatría. Universidad de Cantabria. IDIVAL. Santander (España)

² Unidad de Genética Molecular. Hospital Universitario Marques de Valdecilla. Departamento de Medicina y Psiquiatría, Universidad de Cantabria. IDIVAL. Santander (España)

Resumen

El estudio de la causa genética de un trastorno depende de las características clínicas. Si se sospecha una alteración genética puntual, la secuenciación puede centrarse en un gen, en un panel de genes relacionados, o en todo el exoma, en función de que se tenga o no un gen como claramente sospechoso. Las estrategias concretas dependen del cuadro en estudio y los protocolos diagnósticos implementados en cada centro. No obstante, probablemente en los próximos años, cuando se abaraten los costes y se agilicen los procedimientos de análisis, la secuenciación de todo el exoma vaya sustituyendo progresivamente los paneles de genes. Por el contrario, en caso de sospecha de alteraciones de una región cromosómica más amplia están indicados los procedimientos que permiten detectar las variantes estructurales, en general algún tipo de “array”. A menudo la interpretación de los resultados, sobre todo en el caso de las “variantes de significado incierto” requiere la integración juiciosa de los datos genéticos, bioinformáticos y clínicos.

ADN Y MUTACIONES

El núcleo contiene la mayor parte de la información genética, distribuida a lo largo de los aproximadamente 3.000 millones de nucleótidos del ADN haploide humano. Ahí están representados los aproximadamente 21.000 genes que codifican las proteínas necesarias para las diversas funciones orgánicas, así como un número indeterminado de genes que se transcriben en ARNs que no codifican proteínas, sino que tienen funciones reguladoras¹.

El ADN mitocondrial es más pequeño, tiene unos 16.000 nucleótidos, con genes para codificar 13 proteínas y 24 ARNs no codificantes (de transferencia y ribosómicos)².

Los cambios del ADN que dan lugar a enfermedades se pueden clasificar de acuerdo a diversos criterios, entre ellos:

Según la frecuencia

- **Polimorfismos.** Son variaciones relativamente frecuentes en la población, presentes en más del 1% de las personas. Su repercusión funcional es en general limitada. Así que de manera individual no suelen ser causantes de enfermedad. Sin embargo, hay polimorfismos que están asociados a una mayor o menor respuesta a determinados fármacos. Además, cuando se dan en combinación varios polimorfismos perjudiciales, o cuando coexisten circunstancias ambientales adversas, pueden determinar el riesgo de sufrir algunos procesos, como la osteo-

porosis y otras enfermedades complejas prevalentes, que tienen una herencia “poligénica”.

- **Mutaciones.** Son poco frecuentes. Dependiendo de la región concreta de ADN afectada, pueden inducir cambios muy importantes en la actividad de los genes o de las proteínas codificadas por ellos. De ahí que una mutación única puede ser suficiente para producir una enfermedad. Es el caso habitual de las enfermedades hereditarias clásicas, monogénicas o mendelianas.

Según la transmisión

- **Heredadas.** Son las variantes genéticas que están ya presentes en las células de los progenitores, incluyendo las células germinales, tengan estos o no la enfermedad. Lógicamente, los progenitores portadores de estas mutaciones pueden transmitirlos a varios descendientes.

Como es bien conocido, en función de que sea necesaria la presencia de 1 o 2 alelos mutados para que se desarrolle la enfermedad, mostrarán un patrón de herencia dominante, recesiva o codominante. El análisis cuidadoso del árbol familiar ayudará a establecer cuál de estos patrones se da, y si la mutación afecta a los autosomas (en ese caso la enfermedad aparece por igual en varones y mujeres), a los cromosomas sexuales (en los casos más frecuentes, de herencia recesiva ligada al cromosoma X, afecta preferentemente a los varones, pero es transmitida por las mujeres) o al ADN mitocondrial (ambos sexos están afectados, pero sólo se transmite por línea materna).



- *De novo*. Estas mutaciones no están presentes de forma general en los tejidos de los progenitores, sino que aparecen durante la formación de las células germinales y persisten en el embrión si afectan el óvulo o el espermatozoide implicados en la fecundación. Otras veces, estas mutaciones no están presentes en las células germinales de los progenitores, sino que aparecen durante el desarrollo embrionario.

Según los tejidos afectados

- *Mutaciones germinales*. Sean mutaciones heredadas o de novo, están presentes en las células germinales de los progenitores, de manera que lo están también en todos los tejidos del embrión y posteriormente del individuo adulto. Son, por tanto, transmisibles a la descendencia

- *Mutaciones postcigóticas o somáticas*. Aparecen en algunas células del embrión en desarrollo, por lo que sólo los tejidos derivados de esas células presentan la mutación. En función del momento de aparición, pueden afectar a la totalidad de un determinado tejido, o sólo a una parte del mismo, ocasionando un mosaicismo, es decir la coexistencia en el mismo individuo de células normales y células con ADN mutado. Dependiendo de que las células germinales porten o no la mutación, podrán ser transmisibles a la descendencia.

Según el número de nucleótidos implicados

- *Mutaciones puntuales*. La mutación afecta sólo a un nucleótido, en el cual la base habitual cambia por otra.

- *Pequeño grupo de nucleótidos*. En estos casos, suele tratarse de inserciones o deleciones de unos pocos nucleótidos. Otras veces afecta a regiones repetitivas, de manera que se produce un cambio en el número de repeticiones de grupos de 3-5 nucleótidos.

- *Regiones grandes*. A veces, las deleciones o duplicaciones afectan a regiones extensas del ADN, que pueden incluir miles o millones de nucleótidos. Los casos extremos son aquéllos en los que se pierde un cromosoma entero (como el síndrome de Turner, en el que falta el cromosoma Y) o se adquiere un cromosoma extra adicional (como ocurre en la trisomía 21 del síndrome de Down).

Hay que tener en cuenta que durante la replicación del ADN a menudo se producen algunas mutaciones, la mayor parte de las cuales no llegan a tener una repercusión negativa. Así, se estima que en cada individuo se producen aproximadamente unas 50 mutaciones de novo, de las cuales 1 o 2 están localizadas en el exoma. El exoma es el conjunto de las regiones codificantes. Aunque sólo representa el 1% del ADN (unas 30Mb), se supone que es lugar de asiento de más del 80% de las mutaciones causantes de enfermedades monogénicas. La acumulación a lo largo de las generaciones, hace que el exoma de un individuo promedio presente unas 20.000 variantes puntuales en comparación con el genoma de referencia. En el conjunto del genoma se acumulan muchas más variantes, incluyendo, como promedio en un individuo dado, unas 1.000 "variaciones en el número de copias" (duplicaciones y deleciones extensas), unas 350.000 inserciones y deleciones de uno o unos pocos nucleótidos, y más de 3 millones de mutaciones y polimorfismos puntuales. Ese grado de variación, aunque es un porcentaje mínimo en comparación con los 3×10^9 nucleótidos del genoma, representa una complejidad muy importante a la hora de interpretar los resultados de los tests genéticos.

SECUENCIACIÓN Y OTROS TESTS GENÉTICOS

Hay diversos tipos de tests genéticos, con objetivos y procedimientos diferentes. Sólo comentaremos algunos de los tests utilizados con mayor frecuencia, resaltando los aspectos de interés para el clínico en el campo de las alteraciones esqueléticas.

Cariotipo

Es uno de los procedimientos clásicos. Resulta útil sobre todo cuando se sospecha que hay un número anormal de cromosomas u otras alteraciones estructurales extensas (grandes deleciones o duplicaciones).

Genotipado mediante arrays

Las matrices o "arrays" exploran algunos nucleótidos concretos. En general, se trata de $0,1-1 \times 10^6$ nucleótidos distribuidos, bien a lo largo de todo el genoma, bien preferentemente en regiones codificantes o más frecuentemente causantes de enfermedad. Pueden ser útiles para detectar algunas mutaciones concretas, pero en la clínica su utilidad principal es la detección de variaciones en el número de copias y otras anomalías cromosómicas extensas, pues tienen mayor resolución que otras técnicas, como el cariotipo.

Secuenciación

En este caso se investiga de manera exhaustiva la secuencia de una región más o menos grande del ADN, de manera que se obtiene la secuencia completa de la región estudiada.

Los métodos tradicionales de secuenciación (secuenciación Sanger) eran costosos y muy laboriosos, por lo que sólo se podían aplicar a regiones relativamente pequeñas. Por eso, hoy en día han sido desplazadas en buena medida por las llamadas técnicas de "secuenciación de nueva generación" o "secuenciación masiva" (NGS, "next generation sequencing"). Estas técnicas se pueden utilizar para secuenciar un gen, varios genes, todo el exoma o incluso el genoma completo.

En la actualidad, la aproximación más habitual al empleo de la secuenciación masiva en la clínica se basa en los siguientes criterios:

- Aunque no es lo más frecuente, en algunos trastornos (por ejemplo, la hemocromatosis) la mayor parte de los pacientes presentan el mismo tipo de mutación. En esos casos, como primera aproximación se puede analizar sólo uno o unos pocos nucleótidos, mediante secuenciación Sanger o mediante otros procedimientos simples y baratos, como la PCR alelo-específica.

- Si se tiene una fuerte sospecha de cuál es el gen implicado, pero existe heterogeneidad alélica (es decir, son muchas las mutaciones que pueden causar la enfermedad), se puede secuenciar (mediante procedimientos clásicos o NGS) ese gen, bien sólo la zona codificante (que incluye los exones y la parte adyacente de los intrones) o la totalidad del gen. Un ejemplo de esta situación es la hipofosfatasa, cuyo biomarcador característico son los niveles bajos de fosfatasa alcalina, y que se debe a mutaciones en el gen ALPL.

- Si el cuadro clínico tiene características que permiten agruparlo dentro de un conjunto de procesos, pero el gen concreto no es fácilmente predecible, se puede secuenciar, mediante NGS, un "panel" de genes que incluya los genes habitualmente implicados en ese tipo de procesos. Dependiendo del caso, esos paneles pueden incluir sólo unos pocos genes, o varios cientos. Es la aproximación a menudo utilizada, por ejemplo, en caso de sospecha de osteopetrosis.

Tabla 1. Técnicas de análisis de uso frecuente en genética clínica

Test	Resolución típica	Anomalías detectadas	Genes explorados	Aplicable sin sospecha definida de la causa genética
Cariotipo	5-10 Mb	Aneuploidias, grandes alteraciones estructurales	Todos	Sí
FISH	50-2000 Kb	Anomalías estructurales	1 o varios	No (sí)*
CGH	10-1000 Kb	Anomalías estructurales	Todos	Sí
Array SNP	50-400 Kb	Anomalías estructurales, genotipado	Todos	Sí
MLPA	50 b	Variaciones estructurales de longitud intermedia	1/variantes	No
MS-MLPA	50 b	Variaciones estructurales de longitud intermedia, alteraciones de la metilación	1/variantes	No
Genoma (NGS)	1 b	Mutaciones puntuales, inserciones/delecciones cortas, Variaciones en número de copias*** (costoso y de análisis complejo)	Todos	Sí
Exoma (NGS)	1 b	Mutaciones puntuales, inserciones/delecciones cortas, Variaciones en número de copias*** (no detecta mutaciones en regiones reguladoras no codificantes)	~ 21000	Sí
Exoma clínico (NGS)	1b	Mutaciones puntuales, inserciones/delecciones cortas, Variaciones en número de copias*** (limitado a los genes más comúnmente asociados a enfermedad)	~ 6000	Sí
Paneles de genes orientados a la enfermedad** (NGS)	1b	Mutaciones puntuales, inserciones/delecciones cortas, (no explora regiones reguladoras no codificantes)	2-400	No
Genes únicos (NGS o Sanger)	1 kb	Mutaciones puntuales, inserciones/delecciones cortas	1	No
Genotipado (varias técnicas)	1 kb	Mutaciones puntuales	1 nucleótido	No
Genotipado (técnicas múltiples)	1 kb	Mutaciones puntuales	2-50 nucleótidos en 1 o varios genes	No

B: base o nucleótido; NGS: secuenciación de nueva generación; *: los procedimientos basados en la hibridación in situ de sondas fluorescentes (FISH) se utilizan en principio para explorar un locus determinado. Sin embargo, pueden mezclarse varias sondas para explorar múltiples regiones e incluso "pintar" todos los cromosomas, pudiendo así detectar anomalías estructurales con mayor sensibilidad que el cariotipo convencional; **: en la actualidad la interpretación de las secuencias es a menudo un paso más costoso y laborioso que la propia secuenciación. Por eso a veces se lleva a cabo el análisis de "paneles virtuales". Se conoce también como "exoma dirigido". Es decir, se secuencian todo el exoma, pero sólo se analizan después las variantes en los genes potencialmente relacionados con el fenotipo; ***: no es la técnica más sensible, algunas pueden no ser detectadas.

- Si el cuadro clínico es difícilmente clasificable o se trata de una situación con una elevada heterogeneidad genética (por ejemplo, el retraso mental) o si los estudios anteriores no permiten encontrar la base genética del cuadro, se puede secuenciar todo el exoma, el "exoma clínico" (versión reducida que incluye sólo los genes que se conocen como asociados a enfermedades, unos 7.000) o incluso el genoma completo.

Estos procedimientos plantean a menudo dificultad para interpretar los resultados, puesto que normalmente se detectan numerosas diferencias con el genoma de referencia), pero en muchos casos resulta difícil establecer si se trata de mutaciones patogénicas o no. Para ello se utiliza una combinación de estrategias bioinformáticas, junto a la interpretación juiciosa de los datos clínicos. Así, por ejemplo, se suele valorar:

- o La frecuencia poblacional de las variantes (las muy frecuentes probablemente no son patogénicas).
- o Si esas variantes se han descrito previamente como causa de enfermedad.

o Si, a la luz de los sistemas de predicción "in silico", las variantes producen cambios funcionales importantes en la secuencia proteica. No obstante, en la actualidad muchas de las variantes que se encuentran quedan clasificadas como de significado incierto (VUS, "variants of unknown significance").

o Si la cigosidad se ajusta al patrón de herencia o no. Así, si la historia familiar sugiere un patrón de herencia autosómica recesiva, las mutaciones que estén en heterocigosis posiblemente no sean patogénicas. No obstante, en estos casos no hay que olvidar la posibilidad de que se trate de un individuo heterocigoto compuesto (es decir, que presente dos mutaciones heterocigotas distintas en cada uno de los alelos del gen).

Es también muy útil secuenciar el genoma de los progenitores (lo que a veces se conoce como "exoma trio", pues incluye los dos progenitores y el paciente en estudio) para facilitar la interpretación de las variantes encontradas. Si los progenitores son sanos, las variantes del paciente que estén presentes en alguno de ellos no deben de ser patogénicas.

Para confirmar la patogenicidad, a menudo hay que proceder a realizar un estudio de “segregación”, es decir a analizar la variante sospechosa en otros familiares, para comprobar si dicha mutación está presente en los enfermos y ausente en los sanos.

Detección de variantes estructurales y otras limitaciones de la secuenciación

Las técnicas de secuenciación masiva han supuesto una auténtica revolución en los estudios genéticos. Permiten determinar secuencias extensas de ADN en un tiempo corto y a un coste relativamente reducido y decreciente. Sin embargo, hay que tener en cuenta que esas técnicas permiten conocer la secuencia de nucleótidos en el ADN analizado, pero tienen algunas limitaciones:

1. Aunque existen algoritmos que permiten determinar si hay alteraciones en el número de copias de las regiones analizadas, estos procedimientos no son completamente efectivos para detectar las **variantes estructurales**. Por eso, en caso de sospecha, está indicado llevar a cabo procedimientos que son más sensibles para detectar ese tipo de alteraciones. Entre ellos merece la pena destacar:

a. *Arrays de hibridación genómica comparativa o hibridación diferencial (CGH arrays)*. Llevan sondas distribuidas por todo el genoma. Se comparan los resultados obtenidos en el paciente con los obtenidos en un sujeto sano. Habitualmente tienen un resolución entre 40 y 400 kilobases.

b. *Arrays de SNPs*. Analizan nucleótidos dispersos a todo lo largo del genoma y permiten determinar si hay o no dos copias de cada uno de ellos, detectando así las deleciones y duplicaciones que puedan existir. Hay que tener en cuenta que estas técnicas no detectan algunas variantes estructurales que no implican cambios en el número de copias, como reordenamientos e inversiones.

b. *Amplificación de sondas tras ligación múltiple (MLPA, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)*. Es una técnica multiplex que permite hacer una cuantificación relativa del número de copias de varias decenas de regiones diferentes. Está indicada cuando se sospechan variantes estructurales de una o unas pocas regiones genómicas.

2. Los casos de **mosaicismo** representan una dificultad adicional. El mosaicismo puede darse a nivel de las células germinales, de las células somáticas o de ambas. Entre los trastornos genéticos del esqueleto que pueden estar en relación con un mosaicismo germinal se encuentran la osteogénesis imperfecta y el síndrome de Down³. Las técnicas habituales de secuenciación (clásica o NGS) no suelen poder detectar mosaicismos en los cuales menos del 5-10% de la población celular analizada presente la mutación. A veces, en esos casos es útil repetir los estudios que se hayan realizado con ADN extraído de células sanguíneas en otras muestras, como las células de la mucosa bucal o de la piel.

3. La detección de alteraciones epigenéticas (sobre todo, la metilación de citosinas) mediante técnicas de secuenciación, requiere el tratamiento previo del ADN con bisulfito, que convierte las citosinas en uracilos, mientras que las citosinas metiladas permanecen sin cambio. Para detectar el estado de metilación de secuencias genómicas específicas, se utiliza también una variante de la MLPA conocida como MS-MLPA (Methylation-Specific MLPA) que combina el uso de MLPA con el de enzimas de restricción que permiten detectar si la secuencia de ADN está metilada o no.

4. Las técnicas mencionadas (excepto la secuenciación del genoma completo) no suelen permitir identificar mutaciones que afectan a **regiones reguladoras** que están fuera de la región codificante, ni algunas de las que provocan alteraciones en el “splicing” (proceso de corte y eliminación de las regiones intrónicas en el ARN y unión de las regiones exónicas para formar el ARN mensajero maduro). En caso de sospecha de estas últimas, se debe secuenciar no el ADN genómico, sino el sintetizado *in vitro* a partir del ARN (cADN).

5. La mayor parte de los procedimientos de secuenciación y genotipado están dirigidos a examinar el ADN genómico. En caso de sospecha de una alteración del **ADN mitocondrial**, se necesitan procedimientos dirigidos específicamente a tal fin⁴.

6. Los tests genéticos se realizan habitualmente en muestras sanguíneas, que son fácilmente accesibles y útiles para detectar las mutaciones germinales, es decir, las presentes en todos los tejidos del organismo. Sin embargo, como se ha comentado, algunos procesos se deben a **mutaciones somáticas o postcigóticas**, de manera que sólo algunas células llevan la mutación. En esos casos, es necesario realizar el estudio en el tejido afecto, pues los resultados serán normales en la sangre y otros tejidos no involucrados.

OSTEOPOROSIS Y OTROS PROCESOS CON DISMINUCIÓN DE LA MASA ÓSEA

En la gran mayoría de los pacientes con osteoporosis, la enfermedad aparece en adultos mayores o ancianos y es el resultado de la interacción entre factores de predisposición genética y factores ambientales, junto al deterioro esquelético inducido por la disminución de hormonas sexuales y otros fenómenos asociados al envejecimiento. En general, la susceptibilidad tiene una base poligénica, determinada por varias decenas o centenares de variantes genéticas que, aunque con una influencia funcional limitada de forma aislada, conjuntamente tienen una notable influencia en la masa ósea. Así, los estudios de genoma completo (GWAS, “genome-wide association studies”) y algunos estudios de asociación de genes candidatos han permitido identificar más de 500 loci asociados con la densidad mineral ósea o el riesgo de fractura⁵⁻⁷. Se están haciendo esfuerzos por tratar de combinar esos loci en índices (a menudo denominados índices de riesgo poligénico) que ayuden a determinar el riesgo individual de osteoporosis⁸. Sin embargo, su aplicabilidad a la clínica es todavía muy limitada.

Ocasionalmente, la osteoporosis es el resultado de una mutación puntual que tiene una marcada repercusión funcional y altera algún gen con un papel esencial en la homeostasis esquelética. Entre las formas “monogénicas” de osteoporosis, se han descrito casos debidos a mutaciones en los genes LRP5, WNT1, DKK1 o PLS3⁵.

Los casos de osteoporosis juvenil o en la infancia, así como aquéllos que presentan una historia familiar particularmente marcada, sobre todo si aparecen en edades tempranas, es más probable que se deban a mutaciones puntuales. Los estudios genéticos en osteoporosis juvenil y del adulto joven no han permitido establecer una base genética de manera consistente. No obstante, en algunos pacientes se han detectado mutaciones en genes implicados en la homeostasis esquelética, en particular, algunos relacionados con la vía Wnt, como LRP5, WNT1 o DKK1, o en la síntesis del colágeno⁹. Por tanto, en estos pacientes puede ser interesante analizar un panel de genes que englobe aquéllos más frecuentemente rela-

cionados con trastornos esqueléticos. Por supuesto, antes del estudio genético está indicado descartar que la osteoporosis sea secundaria a otros trastornos sistémicos (malabsorción, hipertiroidismo, etc.).

Si no existe una causa de osteoporosis secundaria, conviene también asegurarse de que no existe otro trastorno genético que se asocie a osteoporosis. Entre ellos, el más importante es la osteogénesis imperfecta. Cursa con fracturas por fragilidad y, en algunos casos, deformidades óseas y escleras azules o grises. En la mayoría de los casos se debe a mutaciones en los genes que codifican las cadenas alfa y beta del colágeno tipo 1 (COL1A1 y COL1A2), por lo que el estudio puede comenzar por el análisis de esos genes. En una serie reciente de 364 pacientes con diversas formas clínicas de OI, el 50-66% presentaban mutaciones en COL1A1 y el 18-37% en COL1A2. No obstante, en un 20% de los casos no se encontraron mutaciones en los genes del colágeno tipo 1¹⁰. Esos casos pueden deberse a mutaciones en regiones reguladoras no analizadas, pero se deben descartar mutaciones en otros genes, que también se asocian a formas menos frecuentes de osteogénesis imperfecta^{11,12} (Tabla 2).

En cualquier caso, siempre hay que prestar atención a la presencia de otras manifestaciones asociadas que hagan pensar en cuadros en los que la osteoporosis forma parte de un proceso sistémico o sindrómico (por ejemplo, síndrome de Turner, neurofibromatosis tipo 1, síndrome de Marfan, etc.), que requieren una aproximación diagnóstica diferente.

OSTEOPETROSIS Y OTROS TRASTORNOS CON OSTEOSCLEROSIS

Los trastornos que cursan con osteoesclerosis son mucho menos frecuentes que los que cursan con disminución de la masa ósea. Junto a algunos adquiridos (metástasis osteoblásticas, mielofibrosis, fluorosis, etc.), otros tienen un origen genético¹³. Pueden ser generalizados o localizados.

Entre las formas de osteoesclerosis generalizada, la osteopetrosis es el trastorno más común. Puede deberse a mutaciones en varios de los genes con un papel importante en la actividad osteoclástica, sobre todo CLCN7 y TCIRG1 (que codifica la ATPasa transportadora de protones). Otros trastornos que cursan con aumento difuso de la masa ósea son la esclerosteosis y la enfermedad de Van Buchem, debidas a mutaciones en el gen SOST, que codifica la esclerostina¹⁴. Probablemente, la aproximación más eficaz al estudio genético de la osteoesclerosis difusa incluye el análisis de un panel de genes que incluye los más frecuentemente implicados en estos procesos (Tabla 3). Si los resultados son negativos, el siguiente paso sería la secuenciación de todo el exoma.

Entre las formas de osteoesclerosis localizada se incluyen diversos trastornos, cuya diagnóstico se basa en general en las características clínicas y radiográficas del proceso, pero cuya base genética en general no está bien establecida¹⁵.

TRASTORNOS DEL METABOLISMO MINERAL

La aproximación a la identificación de la base genética de los trastornos hereditarios del metabolismo mineral depende del trastorno concreto de que se trate.

Hipocalcemia

La causa genética más frecuente es el pseudohipoparatiroidismo, debido a una pérdida de función del gen GNAS^{16,17}. Este gen, que codifica una proteína relacionada con la vía

Tabla 2. Genes involucrados en formas monogénicas de osteoporosis y osteogénesis imperfecta

Genes relacionados con la síntesis y la maduración del colágeno	COL1A1 COL1A2 CRTAP PPIB P3H1 FKBP10 PLOD2 SERPINH1 BMP1
Genes relacionados con otras proteínas de la matriz o la actividad osteoblástica	SPARC SERPINF1 IFITM5 PLS3 TMEM38B WNT1 SP7 (osterix) CREB3L1 MBTPS2 TENT5A (FAM46A) CCDC134

Tabla 3. Genes causantes de algunos procesos que cursan con aumento de densidad ósea

Gene	Enfermedad	Patrón de herencia
CLCN7	Osteopetrosis	AD/AR
TCIRG1	Osteopetrosis	AD/AR
CA2	Osteopetrosis	AR
OSTM1	Osteopetrosis	AR
SNX10	Osteopetrosis	AR
LRP4, LRP5	Varias formas de hiperostosis	AD/AR
SOST	Esclerosteosis, enfermedad de Van Buchem	AD/AR
CTSK	Picnodisostosis	AR
FAM20C	Síndrome de Raine	AR
GJA1	Displasia oculodentodigital	AD/AR
LEMD3	Osteopoiquilosis	AD
TGFB1	Enfermedad de Camurati-Engelmann	AD

de señalización de la proteína G, se caracteriza por presentar impronta genética. Es decir, en la mayoría de los tejidos se expresan los alelos transmitidos por los dos progenitores, pero en algunos (como el riñón, la hipófisis, las gónadas o el tiroides) sólo se expresa el alelo materno. Por eso, las mutaciones inactivadoras del alelo materno causan resistencia a la PTH y otras hormonas, así como un fenotipo esquelético característico (talla baja, cara redondeada, metacarpianos cortos), que constituye la llamada "osteodistrofia hereditaria de Albright". Sin embargo, cuando el alelo mutado es de origen paterno, aparece la osteodistro-

fia, pero sin alteraciones hormonales (seudo-seudohipoparatiroidismo). Las alteraciones del gen *GNAS* que ocasionan estos cuadros son de diversos tipos, incluyendo mutaciones puntuales, anomalías estructurales y alteraciones de los patrones habituales de metilación. Por eso, en casos sospechosos, si el análisis convencional de la secuencia de *GNAS* no revela anomalías, se debe profundizar el estudio recurriendo a otras técnicas (MLPA y MS-MLPA, sobre todo)¹⁸.

Hipercalcemia

Entre las causas genéticas de hipercalcemia se encuentra la hipercalcemia hipocalciúrica familiar, que suele deberse a mutaciones inactivadoras del gen que codifica el canal sensor del calcio (*CASR*). En caso de sospecha, pues, el estudio comenzará con el análisis de este gen. Si no se detectan mutaciones en *CASR*, se ampliará el estudio a otros genes (*GNA11*, *AP2S1*), que son responsables de una tercera parte de los casos. Curiosamente, las mutaciones activadoras de los genes *CASR* o *GNA11* dan lugar a raros cuadros de hipocalcemia de herencia autosómica dominante¹⁹.

El hiperparatiroidismo de carácter familiar puede darse en el seno de un síndrome de neoplasias endocrinas múltiples (*MEN1* o *2*, a menudo con anomalías en los genes *MEN1* o *RET*, respectivamente) o de manera aislada. La base genética de estos últimos casos no siempre se conoce, pero algunos pacientes presentan mutaciones en el gen *HRPT2* (*CDC73*) o en el *CASR*.

Hipofosfatemia

La disminución persistente de los niveles de fosfatasa alcalina, en ausencia de tratamiento anti-resortivo u otras causas adquiridas que lo expliquen, debe hacer sospechar una alteración del gen *ALPL*, que codifica la fosfatasa alcalina no específica de tejido (ósea, hepática). Por tanto, en estos casos el estudio inicial debe ir dirigido a la secuenciación de dicho gen. Las mutaciones de este gen dan origen a la hipofosfatemia, que puede tener graves repercusiones fenotípicas cuando se da en niños, pero suele ser mucho más leve si aparece en adultos. De hecho, muchos casos en adultos son asintomáticos o presentan sólo síntomas leves inespecíficos. Sin embargo, el estudio detallado puede revelar alteraciones sutiles del remodelado que pueden asociarse a un mayor riesgo de efectos adversos con los fármacos anti-resortivos^{20,21}.

Hipofosfatemia y otros raquitismos

El análisis del árbol familiar suele dar información muy importante sobre el tipo de herencia. La forma más frecuente de raquitismo hereditario es el raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X, debido a mutaciones en el gen *PHEX*. Los raquitismos de herencia autosómica incluyen, entre otros, los debidos a mutaciones en genes relacionados con la vitamina D (raquitismos vitamina D-dependientes), como los que codifican la hidroxilasa renal implicada en la síntesis de 1,25-dihidroxitamina D (*CYP27B1*) y el receptor de la vitamina D (*VDR*). Otros cuadros de raquitismo de herencia autosómica se deben a mutaciones en los genes *FGF23*, *DMP1*, *ENPP1* y *SCLC34A3*²².

TRASTORNOS DEL DESARROLLO

Muchos trastornos del desarrollo incluyen anomalías del crecimiento o la forma de los huesos. En algunos casos forman parte de síndromes complejos, con afectación de múltiples órganos y sistemas. El estudio detallado del

fenotipo es esencial para enfocar el estudio genético. En muchos casos estos trastornos se deben a alteraciones de grandes regiones cromosómicas que afectan a varios genes, en cuyo caso el primer paso puede ir dirigido a identificar alteraciones estructurales, mediante cariotipo, CGH arrays o arrays de SNP. Las condrodisplasias son un extenso grupo que incluye más 350 trastornos en los que la alteración de la osificación endocondral o endomembranosa provoca alteraciones a menudo graves del esqueleto^{23,24}. Pueden o no acompañarse de lesiones a otros niveles. El fenotipo puede ser muy orientativo en algunos casos con características típicas (por ejemplo, en la acondroplasia) y el diagnóstico se podrá confirmar mediante el análisis dirigido de uno o unos pocos genes. Sin embargo, en otros casos con fenotipo menos característico, será necesario estudiar, mediante procedimientos de secuenciación masiva, un amplio panel de unos 50-100 genes, o incluso secuenciar todo el exoma.

LESIONES LOCALIZADAS

Algunas lesiones esqueléticas focales, únicas o múltiples, pueden tener también una causa genética.

Enfermedad de Paget

Aunque la enfermedad de Paget puede mostrar una agregación familiar, en la mayor parte de los casos no se identifica el gen responsable de la susceptibilidad genética. Sin embargo, en algunos casos puede ser el resultado de mutaciones puntuales en genes relacionados con el sequestosoma (*SQSTM1/p62*) o con la vía *RANKL*. En aproximadamente un 25-40% de los casos familiares de Paget y un 4-8% de los casos esporádicos se identifican mutaciones en sequestosoma^{25,26}. Por otro lado, hay formas de enfermedad de Paget juvenil y otros cuadros con afectación esquelética y extraesquelética debidos a mutaciones de los genes *TNFRSF11A* y *TNFRSF11B* (que codifican el *RANK* y la osteoprotegerina, respectivamente)²⁷.

Exóstosis múltiples

Los pacientes con exóstosis múltiples desarrollan lesiones excrecentes (ostecondromas) a nivel de las metafisis desde los primeros años de vida. Pueden ser asintomáticas, producir dolor o afectar el crecimiento, sobre todo de los huesos largos de las extremidades. Se debe generalmente a mutaciones en el gen *EXT1*, o, menos veces, del gen *EXT2*, con herencia autosómica dominante²⁸.

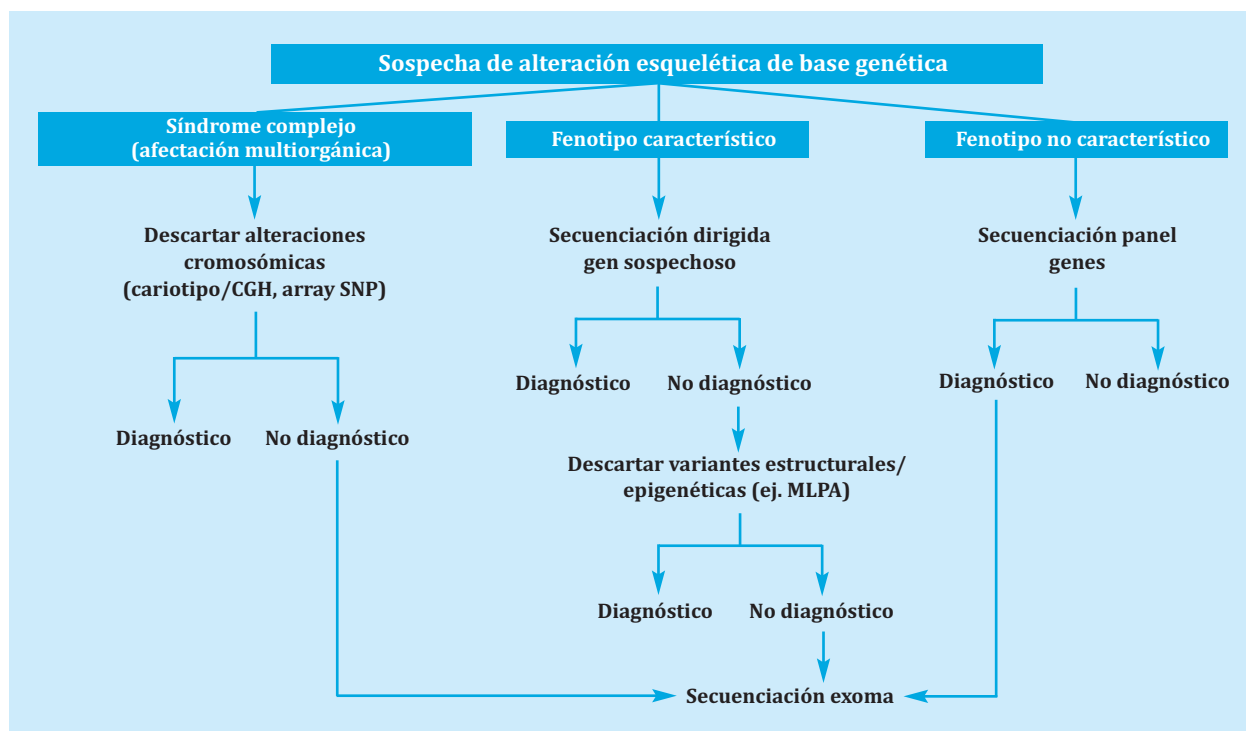
Encondromatosis múltiple

Cursa también con lesiones esqueléticas múltiples en niños y jóvenes, pero, a diferencia de las exóstosis (ostecondromas), los encondromas típicamente crecen en el interior del hueso. La causa no está firmemente establecida, pero en los encondromas de algunos pacientes se han encontrado mutaciones somáticas de los genes *PTH1R*, *IDH1* o *IDH2*²⁹.

Displasia fibrosa ósea

La displasia fibrosa ósea puede manifestarse como lesiones óseas únicas o múltiples. A veces forma parte del síndrome de McCune-Albright, que incluye, además, máculas cutáneas hiperpigmentadas y/o alteraciones debidas a un aumento en la producción de algunas hormonas (pubertad precoz, hipertiroidismo, hipercortisolismo, exceso de GH). La producción excesiva de *FGF23* en las

Figura 1. Aproximación inicial a los trastornos esqueléticos de causa genética



lesiones hace de la hipofosfatemia una manifestación frecuente. Se debe a una mutación somática (postzigótica) activadora en el gen *GNAS*, que codifica una proteína implicada en la vía de señalización de la proteína G^{30} . Por tanto, si se plantea hacer un estudio genético, es preciso realizarlo con tejido afecto, pues el resultado en las células sanguíneas suele ser normal.

CONCLUSIÓN

El estudio de la causa genética de un trastorno depende del cuadro sospechado a partir de un análisis detallado del fenotipo. Una de las primeras cuestiones a responder es si se sospecha un trastorno debido a una mutación que afecta a un gen, o una alteración cromosómica más amplia. En el primer caso, la aproximación suele comenzar con la secuenciación del gen o genes sospechosos, mientras en el segundo caso están indicados los procedimientos que permiten detectar las variantes estructurales, en general algún tipo de array.

Si se sospecha una alteración genética puntual, la secuenciación puede centrarse en un gen, en un panel de

genes relacionados, o en todo el exoma, en función de que se tenga un gen como claramente sospechoso, o sea un cuadro con heterogeneidad genética (Figura 1). Las estrategias concretas dependen no sólo del cuadro en estudio, sino de la disponibilidad de las pruebas y los protocolos diagnósticos implementados en cada centro. No obstante, es probable que en los próximos años, cuando se abaraten los costes y se agilicen los procedimientos de análisis, la secuenciación de todo el exoma vaya sustituyendo progresivamente los paneles de genes. De hecho, ya en este momento puede resultar más eficiente en muchos casos la realización de “paneles virtuales”³¹. Es decir, se secuencian todo el exoma, aunque después en un primer momento sólo se analizan las variantes existentes en los genes potencialmente relacionados con el fenotipo, con lo que el número de mutaciones a valorar por medios bioinformáticos y análisis de la literatura se reduce mucho. Sin embargo, como en realidad se secuenció todo el exoma, si el análisis inicial de los genes seleccionados no revela mutaciones patogénicas, se puede ir ampliando el estudio a otros genes, sin necesidad de secuenciar de nuevo la muestra.



Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Salzberg SL. Open questions: How many genes do we have? *BMC Biol.* 2018;16(1):94.
2. Shen L, McCormick EM, Muraresku CC, Falk MJ, Gai X. Clinical Bioinformatics in Precise Diagnosis of Mitochondrial Disease. *Clin Lab Med.* 2020;40(2):149-61.
3. Thorpe J, Osei-Owusu IA, Avigdor BE, Tupler R, Pevsner J. Mosaicism in Human Health and Disease. *Annu Rev Genet.* 2020.
4. Schon KR, Ratnaik T, van den Aamele J, Horvath R, Chinnery PF. Mitochondrial Diseases: A Diagnostic Revolution. *Trends Genet.* 2020;36(9):702-17.
5. Mäkitie RE, Costantini A, Kämpe A, Alm JJ, Mäkitie O. New Insights Into Monogenic Causes of Osteoporosis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:70.
6. Yang T-L, Shen H, Liu A, et al. A road map for understanding molecular and genetic determinants of osteoporosis. *Nat Rev Endocrinol.* 2020;16(2):91-103.
7. Koromani F, Trajanoska K, Rivadeneira F, Oei L. Recent Advances in the Genetics of Fractures in Osteoporosis. *Front Endocrinol (Lausanne)*- 2019;10:337.
8. Forgetta V, Keller-Baruch J, Forest M, et al. Development of a polygenic risk score to improve screening for fracture risk: A genetic risk prediction study. *PLoS Med* 2020;17(7):e1003152.
9. Collet C, Ostertag A, Ricquebourg M, et al. Primary Osteoporosis in Young Adults: Genetic Basis and Identification of Novel Variants in Causal Genes. *JBMR Plus.* 2018;2(1):12-21.
10. Maioli M, Gnoli M, Boarini M, et al. Genotype-phenotype correlation study in 364 osteogenesis imperfecta Italian patients. *Eur J Hum Genet.* 2019;27(7):1090-100.
11. Rossi V, Lee B, Marom R. Osteogenesis imperfecta: Advancements in genetics and treatment. *Curr Opin Pediatr.* 2019;31(6):708-15.
12. Tournis S, Dede AD. Osteogenesis imperfecta - A clinical update. *Metabolism.* 2018;80:27-37.
13. Boulet C, Madani H, Lenchik L, et al. Sclerosing bone dysplasias: Genetic, clinical and radiology update of hereditary and non-hereditary disorders. *Br J Radiol.* 2016;89(1062):1-7.
14. Balemans W, Van Hul W. Human genetics of SOST. *J MusculoskeletNeuronal Interact.* 2006;6:355-6.
15. De Ridder R, Boudin E, Mortier G, Van Hul W. Human Genetics of Sclerosing Bone Disorders. *Curr Osteoporos Rep.* 2018;16(3):256-68.
16. Mantovani G, Bastepe M, Monk D, et al. Diagnosis and management of pseudohypoparathyroidism and related disorders: First international Consensus Statement. *Nat Rev Endocrinol.* 2018;14(8):476-500.
17. Germain-Lee EL. Management of pseudohypoparathyroidism. *Curr Opin Pediatr.* 2019;31(4):537-49.
18. Hannan FM, Newey PJ, Whyte MP, Thakker RV. Genetic approaches to metabolic bone diseases. *Br J Clin Pharmacol.* 2019;85(6):1147-60.
19. Gattineni J. Inherited disorders of calcium and phosphate metabolism. *Curr Opin Pediatr.* 2014;26(2):215-22.
20. Riancho-Zarrabeitia L, García-Unzueta M, Tenorio JAJA, et al. Clinical, biochemical and genetic spectrum of low alkaline phosphatase levels in adults. *Eur J Intern Med.* 2016;29:40-5.
21. López-Delgado L, Riancho-Zarrabeitia L, García-Unzueta MT, et al. Abnormal bone turnover in individuals with low serum alkaline phosphatase. *Osteoporos Int.* 2018;29(9):2147-50.
22. Carpenter TO, Shaw NJ, Portale AA, Ward LM, Abrams SA, Pettifor JM. Rickets. *Nat Rev Dis Prim.* 2017;3.
23. Ngo AV, Thapa M, Otjen J, Kamps SE. Skeletal Dysplasias: Radiologic Approach with Common and Notable Entities. *Semin Musculoskelet Radiol.* 2018;22(1):66-80.
24. Nikkel SM. Skeletal Dysplasias: What Every Bone Health Clinician Needs to Know. *Curr Osteoporos Rep.* 2017;15(5):419-24.
25. Albagha OME, Visconti MR, Alonso N, et al. Common susceptibility alleles and SQSTM1 mutations predict disease extent and severity in a multinational study of patients with Paget's disease. *J bone Miner Res.* 2013;28(11):2338-46.
26. Rea SL, Walsh JP, Ward L, et al. Sequestosome 1 mutations in Paget's disease of bone in Australia: prevalence, genotype/phenotype correlation, and a novel non-UBA domain mutation (P364S) associated with increased NF-kappaB signaling without loss of ubiquitin binding. *J bone Miner Res.* 2009;24(7):1216-23.
27. Ralston SH, Taylor JP. Rare Inherited forms of Paget's Disease and Related Syndromes. *Calcif Tissue Int.* 2019;104(5):501-16.
28. Pannier S, Legeai-Mallet L. Hereditary multiple exostoses and enchondromatosis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2008;22(1):45-54.
29. Jurik AG. Multiple hereditary exostoses and enchondromatosis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2020;101505.
30. Javaid MK, Boyce A, Appelman-Dijkstra N, et al. Best practice management guidelines for fibrous dysplasia/McCune-Albright syndrome: A consensus statement from the FD/MAS international consortium. *Orphanet J Rare Dis.* 2019;14(1):1-17.
31. Marques Matos C, Alonso I, Leão M. Diagnostic yield of next-generation sequencing applied to neurological disorders. *J Clin Neurosci.* 2019;67:14-8.