

Les malalties rares

Héctor Martínez López

El grup de Genètica Molecular Humana de la Facultat de Biologia a la UB s'encarrega de l'estudi de diferents malalties genètiques. Per una banda s'encarrega de malalties monogèniques amb diversos graus d'heterogeneïtat (la provoquen moltes variants genètiques), des de malalties lisosomals fins retinitis pigmentosa. D'altra banda s'encarrega de malalties molt complexes.

Per l'estudi de factors de risc genètic (variants) utilitzen marcadors genètics. Però planegen continuar i profunditzar els estudis utilitzant models cel·lulars i animals, amb la finalitat de proporcionar coneixement suficient per desenvolupar estratègies de diagnòstic o terapèutiques.

Les malalties rares estan allà, però... com funcionen? Per què s'anomenen "rars"? Què s'està investigant i com es duu a terme a la Facultat de Biologia? Aquest article intenta donar resposta major o menor mesura a aquestes preguntes. En ell hi trobareu des de conceptes de genètica bàsica i informació general sobre malalties rares fins algunes línies d'investigació a la Facultat de Biologia, així com resultats prometedors d'alguns estudis realitzats aquí.

Grups d'OpitzC i

malalties

lisosomals

Bàrbara Torrico

Carla Esteve

Celia Sintas

Edgar Creus

Héctor Franco

Jenny Serra

Judit Cabana

Laura Pineda

Marta Gómez

Monica Cozar

Neus Roca

Noelia Benetó

Noelia Fernández

Nuria Martínez

Roser Urreizti

Bru Cormand

Lluïsa Vilageliu

Susana Balcells

Daniel Grinberg



RARAS PERO

NO INVISIBLES

Introducció

Les malalties rares no són res aliè. Encara que cada una d'aquestes afecta a una petita part de la població, existeixen al voltant de 7000 diferents que afecten en total a un gran percentatge de la població. A Espanya, el nombre d'afectats per malalties rares és d'uns 3 milions de persones, una xifra gens menyspreable. Així que si creus que això de les malalties rares no anava amb tu, estàs equivocad. Qualsevol pot patir una durant la seva vida.

Si bé és cert que existeixen malalties rares poc greus, un gran percentatge són molt greus. A més una gran part d'aquestes malalties no té tractament, ni tan sols pal·liatiu. Això genera situacions familiars molt difícils on el malalt necessita atenció especial, una forta càrrega econòmica i es desenvolupen molts problemes tant educatius com laborals.

La investigació juga un paper importantíssim en el coneixement d'aquestes malalties, ja que intenta descobrir com funcionen per buscar una potencial solució. Amb tecnologies com la teràpia gènica, les cèl·lules mare pluricel·lulars induïdes (IPSC) i la seqüenciació genètica massiva, aquest camí és molt més senzill, encara que segueix sent costós.

Per finalitzar la introducció s'ha de fer menció al paper social importantíssim que fan les associacions de pacients. Aquestes treballen per sensibilitzar a la població, per aconseguir finançament, per fer pressió sobre la legislació, etc. Sense la seva lluita la investigació no seria possible.

Què és una malaltia rara?

Primer hem de conèixer al personatge principal de l'article, les malalties rares, abreviades com MR. Reben el seu nom per una qüestió de prevalença, és a dir, en quin nombre de la població es presenta. Aquelles patologies que afecten a 1 o menys persones de cada 2000 reben l'estatus de rares.

Les persones afectades per cada MR representen un percentatge molt molt baix, aproximadament un 0,05% (1 de cada 2000). Però afecten fins un 7% de la població, uns 3 milions de persones en Espanya, 27 milions en Europa, per exemple. ¿La raó? Existeixen al voltant de 7000 malalties rares.



70%
DISCAPACITADOS

Figura 1. % de discapacitats sobre el total de afectats per malalties rares. Font: FEDER

Aquestes malalties són, en la seva major part, cròniques i degeneratives. Un gran percentatge, un 65% aproximadament, són greus i invalidants. Dues de cada tres apareixen abans dels 2 anys i moltes comporten dificultats en el desenvolupament motor, cognitiu, sensorial o intel·lectual, fet que origina una discapacitat en l'autonomia.

A més hi ha una falta de coneixement important sobre algunes d'aquestes malalties, tant a nivell dels seus mecanismes com a nivell clínic. Moltes vegades aquesta desinformació fa que es diagnostiquin tard. Encara que també pot passar que dos MR s'assemblin molt i es diagnostiquin de manera errònia, podent donar-se un tractament erroni i inadequat per la malaltia.

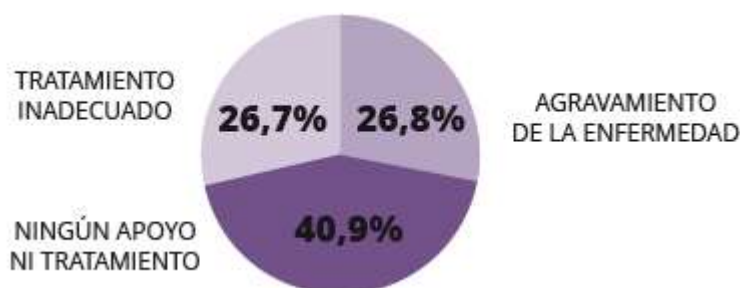


Figura 2. Gràfic de sectors que ens divideix les malalties rares segons el tractament que tenen i els resultats. Font: FEDER.

Això incideix de manera molt negativa sobre les famílies que es veuen desamparades davant la falta d'informació i un correcte diagnòstic. Les associacions lluiten perquè s'investigui en aquestes malalties i es millori el diagnòstic. A més, donen recolzament a les famílies afectades.

Com s'originen les malalties rares?

Generalment tenen un origen hereditari, és a dir, les transmeten els pares, encara que no estiguin afectats, als fills. Quan es dona aquest cas, es diu que els pares són portadors sans de la malaltia, encara que també poden estar afectats.

Totes les cèl·lules del nostre cos tenen, més o menys, el mateix material genètic, conegut com genoma. Aquest s'organitza, a grans trets, en gens que contenen la informació necessària per tal de generar proteïnes. Aquestes, per dir-ho d'alguna forma, són la maquinària cel·lular que duu a terme el treball. En el material genètic hi ha variants negatives i variants neutres, segons si afecten o no a la funció de la proteïna.

Tenim el material genètic duplicat, és a dir, tenim dues variants per cada gen i en rebem cada una dels nostres progenitors, una variant de pare i una de mare. Quan ens reproduïm passem només una variant al nostre descendent, igual que van fer els nostres pares. Així anem passant a la descendència una barreja de les variants dels nostres pares, que les van heretar dels seus pares i així un llarg etc.

Tenim dues variants per cada gen i cada una pot ser neutra o negativa, així que podem tenir diferents combinacions. Hi ha malalties que únicament es donen quan les dues variants són negatives, són conegudes com recessives. També hi ha d'altres que únicament amb una variant negativa en tenen prou per donar-se, a aquestes les anomenem dominants. Per simplificar, direm que cada una de les malalties rares segueix un d'aquests patrons.

Per què es dona aquesta situació? Les variants negatives afecten a la funció de la proteïna de diferents maneres. Poden fer que no es produeixi la proteïna o que es produeixi malament i no compleixi la seva funció. Si tenim una variant negativa i una neutre, encara ens queda proteïna funcional a les cèl·lules i, per tant, seguirà realitzant-se la funció. Hi ha vegades que la funció depèn de la quantitat de proteïna, així que si tenim la mateixa situació de variant negativa i neutra, hi haurà la meitat de proteïna i aquesta no serà suficient per realitzar la funció.

Investigació

La investigació és molt important en les malalties rares degut al profund desconeixement sobre algunes d'elles. Per exemple, per la síndrome d'OpitzC, una malaltia molt poc freqüent fins i tot per ser una malaltia rara, encara no es coneix quin és el gen responsable. Altres, com el síndrome de SanFilippoC sí tenen un gen responsable detectat i es coneix com funciona la malaltia.

A Espanya el *Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras* (CIBERER) agrupa i coordina a alguns grups de investigació. En total té 7 programes científics relacionats amb aquestes malalties que agrupen a més de 62 grups de recerca a tota Espanya. A més, és un nexa amb les federacions i associacions de pacients. Junts treballen per millorar el finançament, l'eficiència de la recerca i el flux d'informació pacients-investigadors-metges.

Aquí a la Facultat de Biologia, situat al Departament de Genètica, trobem un d'aquests grups que forma part del CIBERER. Treballa activament amb diverses malalties rares, entre elles OpitzC i SanFilippoC.

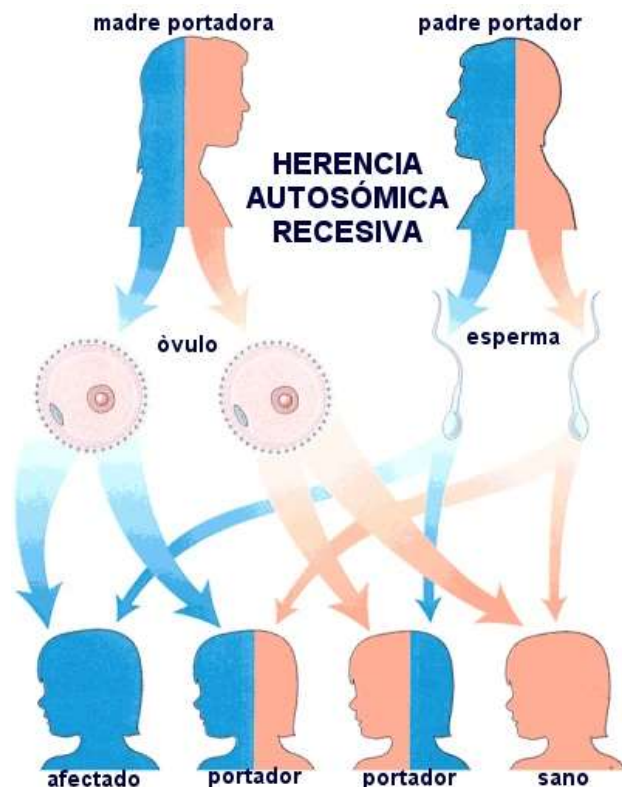


Figura 3. Dibuix que mostra el patró d'herència d'una malaltia recessiva. El color blau indica la variant negativa mentre que el rosa indica la variant neutre. Font: stop SanFilippo.

Síndrome d'OpitzC: a la cerca d'un responsable

La síndrome d'OpitzC és una malaltia catalogada com rara, però amb una incidència tant baixa que li atorguen el títol extraoficial de "super-rara", perquè només hi ha 60 casos a nivell mundial. La malaltia es confon amb la síndrome Bohring-Opitz ja que les dues estan caracteritzades per trigonocefàlia (crani en forma de triangle), dèficit cognitiu, etc. De fet s'inclou OpitzC dins de Bohring-OpitzC perquè són molt semblants i aquesta última és més greu.

Tot i això sí és coneix el gen causant de Bohring-Opitz (ASXL1), mentre que en OpitzC aquest no es troba afectat. En el grup d'investigació de la Facultat es treballa per trobar els gens responsables.

Aquest setembre de 2015 el grup va publicar un article en que realitzen un estudi en onze pacients amb algun de les dues síndromes. En ell estudien si els gens ASXL1 i CD96 tenen relació amb aquestes síndromes. Els resultats són desesperançadors, ja que en 10 dels 11 casos es conclou que no es poden explicar aquestes malalties per aquests gens. Tot i això, com ells mateixos indiquen, amb una mostra d'onze pacients no es poden fer generalitzacions.

A l'estudi utilitzen tècniques de seqüenciació genètica massiva, que permet conèixer de manera ràpida i bastant precisa el genoma d'una persona. Si comparem el genoma d'un individu amb un genoma de referència podem obtenir les diferències, que correspondran a les diferents variants.

De les variants que cada individu té hi ha una gran part que són neutres, però l'altra part poden ser negatives. Aquestes cal estudiar-les per intentar associar-les amb la malaltia. Si veiem que els pacients d'una mateixa malaltia tenen la mateixa variant, no és una bogeria pensar que aquella variant pot ser la causant.

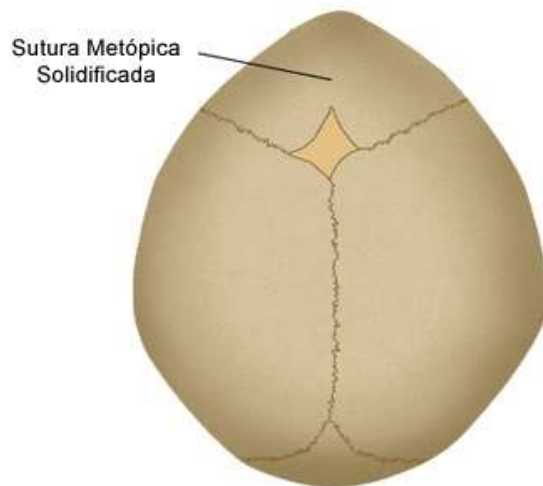


Figura 4. Trigonocefàlia. Al dibuix s'indica la solidificació que causa la forma triangular del crani. Font: Asociación OpitzC

A l'estudi no troben cap variant negativa en el gen CD96, per tant no sembla un bon candidat. D'altra banda, pel gen ASXL1 únicament troben una variant negativa en un únic pacient diagnosticat amb Bohring Opitz, així que reforça la hipòtesi que estan associats. Tot això ens diu que s'ha de seguir buscant un candidat. De fet, el grup comenta al final de l'article que fer un anàlisi molt més ampli, buscant variants negatives, pot ser profitós per seguir avançant en el coneixement de la malaltia.



Figura 5. Seqüenciador de nova generació de l'empresa *Illumina*. Font: *Illumina*

SanFilippoC: cèl·lules mare pluripotents i teràpia gènica

Aquesta síndrome catalogat com malaltia rara afecta a les proteïnes encarregades d'eliminar un compost de les cèl·lules, l'heparan sulfat. Aquesta molècula és molt important a la formació de vasos sanguinis, processos de coagulació i altres. Però si no és eliminat correctament i s'acumula, provoca greus problemes.

La malaltia es presenta als pocs anys d'edat. Està caracteritzada per presentar símptomes com agressivitat, hiperactivitat, trastorns de la son, degeneració de les cèl·lules cerebrals, articulacions rígides, etc.

Als últims mesos el grup ha publicat dos articles molt interessants sobre aquesta malaltia. Un d'ells tracta sobre un estudi realitzat a cèl·lules de pacients, buscant un tractament que pugui millorar la malaltia.

Aquest estudi està basat en teràpia gènica, un camp molt ampli que recull múltiples tècniques basades en material genètic per aplicar al tractament. En aquest cas apliquen una tècnica basada en la reducció de la producció d'una proteïna en concret, amb l'objectiu de reduir la quantitat de proteïna que s'acumula.

Ho fan mitjançant un sistema propi de les cèl·lules (siRNA, de l'anglès *small interference RNA*, o RNA petits d'interferència), que quan detecta una determinada molècula semblant al gen que produeix la proteïna diana, regula la seva expressió. A les cèl·lules de l'estudi introdueixen una molècula similar al gen que produeix la proteïna encarregada de la síntesis de l'heparan sulfat. Així es produeix menys heparan sulfat i, per tant, s'acumula menys.

El resultat de l'estudi és satisfactori, aconseguen que les cèl·lules dels pacients generin menys heparan sulfat i que aquest s'acumuli menys. Són resultats prometedors. Se ha posat a prova la idea i ha funcionat. Serà qüestió de temps que algú intenti portar-lo més enllà, perquè algun dia sigui un fàrmac.

L'altre article que han publicat té relació amb les cèl·lules mare pluripotents induïdes (IPSC). Presenten un estudi on han generat neurones dels pacients, les quals són deficientes en la formació de connexions amb altres neurones, i aconseguen que formin correctament xarxes neuronals.

Les cèl·lules mare són cèl·lules que s'encarreguen de renovar les cèl·lules mortes del cos. Per això es divideixen en dos i una d'elles es converteix en un altre tipus cel·lular, per exemple una cèl·lula muscular, mentre que l'altra segueix sent una cèl·lula mare. Es classifiquen segons el ventall de possibilitats que tenen per convertir-se, conegut com potència, i van des de cèl·lules totipotents fins cèl·lules unipotents.

Al nostre cos tenim cèl·lules mare adultes, que tenen un ventall de possibilitats bastant restringit. Però existeixen tècniques que permeten agafar cèl·lules del cos i convertir-les en cèl·lules mare pluripotents, que poden convertir-se en qualsevol cèl·lula del cos. Segons com les manipulem al laboratori, aquestes cèl·lules pluripotents les podem convertir en un o altre tipus.

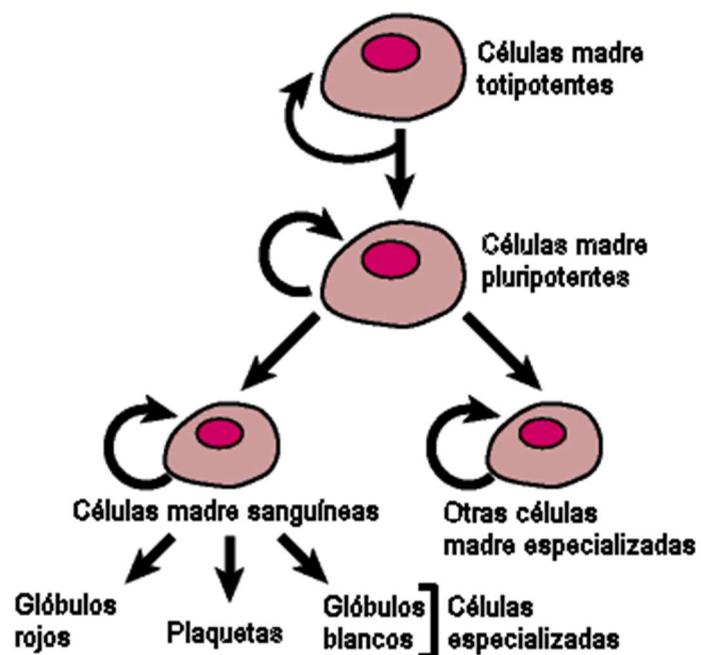


Figura 6. Potencia de las células madre. De las dos células resultantes una pasa a otro estadio (recta), mientras una queda como célula madre (circular). Fuente: ecojoven

A l'estudi agafen cèl·lules de pacients amb SanFilippoC i les converteixen en neurones, que estan bastant afectades en aquesta malaltia. Aquestes no poden formar correctament les unions neuronals. Però utilitzant tècniques de teràpia gènica aconseguen que sí les formin

correctament. Concretament introdueixen el gen correcte a la cèl·lula, que recupera la funció perduda per culpa de la variant negativa.

En tots dos estudis els resultats són positius, però encara s'ha de desenvolupar més i anar avançant en direcció al fàrmac. Tot i això són molt bons recolzaments, ja que s'ha posat a prova el concepte i ha donat resultats positius.

Tancament

Les malalties rares són molt difícils d'estudiar. Molts cops són heterogèniques, és a dir, estan causades per moltes variants genètiques diferents. Altres vegades la informació sobre la família és molt limitada o hi ha pocs malalts, fent difícil el seu estudi. De vegades simplement no es coneix res sobre la malaltia. Altres el model animal que existeix no reproduïx les característiques de la malaltia i, per tant, no aporten informació. També hi ha vegades que no hi ha finançament per estudiar-les. Tot i això hem de continuar estudiant-les. Per ells, pels pacients, les famílies, els afectats, però també per la ciència.

Bibliografia:

- Rodwell C., Aymé S., eds., “2014 Report on the State of the Art of Rare Disease Activities in Europe”, July 2014
 - Asociación Síndrome OpitzC (asopitzc.org)
 - Centro de Investigación Biomédica en Red – Enfermedades Raras (www.ciberer.es)
 - Orphanet: The portal for rare diseases and orphan drugs (orpha.net)
 - Federación Española de Enfermedades Raras (www.enfermedades-raras.org)
 - Online Mendelian Inheritance in Man (omim.org)
1. Urreizti, R. *et al.* Screening of CD96 and ASXL1 in 11 patients with Opitz C or Bohring-Opitz syndromes. *Am. J. Med. Genet. Part A* **170**, 24–31 (2016).
 2. Canals, I., Benetó, N., Cozar, M., Vilageliu, L. & Grinberg, D. EXTL2 and EXTL3 inhibition with siRNAs as a promising substrate reduction therapy for Sanfilippo C syndrome. *Sci. Rep.* **5**, 13654 (2015).
 3. Canals, I. *et al.* Activity and High-Order Effective Connectivity Alterations in Sanfilippo C Patient-Specific Neuronal Networks. *Stem Cell Reports* **5**, 546–557 (2015).

Entrevista a Héctor Franco

Entrevista a Héctor Franco, estudiant del grau de Biotecnologia a la UB que treballa en aquest laboratori des de l'any passat, a la línia d'investigació d'OpitzC.

P. Com has arribat al grup de genètica humana y a treballar amb OpitzC?

R. Vam tenir als dos directors del grup en el que estic com a professors de la carrera. Sempre m'ha agradat la genètica i com els professors em van agradar vaig mirar-me els projectes de genètica humana, però sense fixar-me en cap concret. Simplement m'agradava la genètica humana i vaig contactar amb ells. A l'inici no treballava en OpitzC, sinó que ajudava a una noia de màster que estava fent osteoporosis. Quan la noia que sí feia OpitzC va marxar, em van oferir treballar en aquella línia d'investigació.

P. He estat mirant per sobre bases de dades sobre malalties y sembla que no està clar quin gen causa OpitzC, encara que es creu que forma part del Síndrome Bohring-Opitz.

R. Sí, son els síndromes trigonocefàlia de OpitzC (OTCS) i el Síndrome Bohring-Opitz (BO). Actualment és difícil dir amb seguretat si són dos síndromes diferents o un de sol. Comparteixen molt fenotip, moltes característiques externes, però BO és més greu. Tenen la majoria de símptomes compartits, alguns són característics de la malaltia, però és difícil assegurar-ho. Per BO està més o menys descrit que el gen responsable és ASXL1, encara que només està present al 60-65% dels afectats. Si presenten els símptomes encara que no presentin la mutació podem dir que el pacients tenen Bohring Opitz. Tot i això no en pots estar segur. Quan tenen la mutació a ASXL1 llavors si podem assegurar que es tracta d'una cas de BO. Nosaltres hem treballat amb 3 pacients, 1 dels quals tenia el gen ASXL1 mutat. Els altres dos són germans i no se'ls ha trobat la mutació aquesta, així que estem analitzant quina mutació poden tenir que causi el síndrome. En quant a la trigonocefàlia d'OpitzC (OpitzC) la hipòtesis actual que hi ha és que té heterogeneïtat de locus. És a dir, que molts gens diferents poden causar la malaltia. El problema és que no es sap quins són, partim de 0.

P. Si no es coneix el gen, com en aquest cas. Què es fa?

R. Per resoldre-ho fem aproximacions de seqüenciació d'exoma, és a dir, analitzem la part del genoma que s'expressa (al voltant d'un 1%). Això fa que la quantitat a analitzar sigui molt menor que si féssim seqüenciació del genoma complet. Per començar seqüenciem l'exoma amb una sèrie de kits comercials. Això ens dóna la seqüència de nucleòtids del exoma. Entre dos genomes de persones diferents podem trobar fins 10 milions de mutacions. Moltes són innòcues i no representen un problema, així que no ens interessen. Filtrem tota la informació que hem aconseguit amb la seqüenciació de l'exoma eliminant aquestes mutacions. Després apliquem altres filtres de qualitat, per evitar estudiar mutacions que podrien ser dèficits de les tècniques. També eliminem aquelles variants que estan a gens que sabem que no es probable que donin lloc al síndrome d'OpitzC. Al final del procés tenim entre 50 i 100 variants per analitzar en cada pacient. Llavors les intentem confirmar reseqüenciant amb tècniques més fiables. Si confirmem la mutació passem a la segona fase, on realitzem estudis funcionals per comprovar el efecte real de la mutació. Aquests estudis poden ser cultius cel·lulars on fem que s'expressi el gen mutat o

Biol. on-line: Vol. 5, Núm. 1 (Febrer de 2016)

ISSN: 2339-5745 online

western blot i co-immunoprecipitació, on mirem si s'ha produït la proteïna. Així poc a poc anem cercant quines variants provoquen la malaltia.

P. Heu trobat alguna mutació recentment?

R. L'any passat vam trobar una mutació interessant en un gen, però aquest gen sembla associat a una altra malaltia. Hem de validar-la i segurament la portarem a cultius cel·lulars per aprofundir. Creiem que aquesta mutació pot treballar conjuntament amb una altra per causar la síndrome, així que seguirem buscant.

P. T'agrada treballar en aquesta malaltia?

El tema m'agrada en part perquè no hi està treballant gairebé ningú. És una malaltia minoritària i no se sap gairebé res. Tot i que partim de 0, i és molt dur, m'agrada bastant. La part que estic fent ara és molt repetitiva, ja que hem de validar moltíssimes variants de les seqüenciacions d'exoma que tenim. Al segon semestre, quan tindrè més temps podré fer experiments més laboriosos com cultius cel·lulars, que són més entretinguts.