

Evaluación del patrón de inactivación del cromosoma X en portadoras sintomáticas y mujeres con hemofilia

Jessica Noemi Mundo-Ayala^a y Ana Rebeca Jaloma-Cruz^{b,*}

^aUniversidad de las Américas, Puebla, Puebla, México

^bDivisión de Genética, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Centro Médico de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, Jalisco, México

Recibido en su versión modificada: 19 de noviembre de 2007

Aceptado: 23 de noviembre de 2007

RESUMEN

La inactivación del cromosoma X es un fenómeno estocástico que ocurre en la embriogénesis temprana femenina para lograr una compensación de dosis génica respecto a los varones. Ciertos mecanismos genéticos afectan el proceso normal, propiciando una inactivación sesgada con efectos clínicos relevantes en portadoras de trastornos recesivos ligados al cromosoma X, como la hemofilia. La herramienta molecular mayormente utilizada para la evaluación del patrón de inactivación del cromosoma X es la amplificación por PCR del gen del receptor de andrógenos humano (HUMARA). El empleo de esta técnica en portadoras sintomáticas y mujeres con hemofilia permite esclarecer si las manifestaciones de la enfermedad se deben a una lyonización desfavorable. Estos estudios, además, son importantes para la comprensión del proceso de inactivación del cromosoma X en humanos.

Palabras clave:

Inactivación del cromosoma X, hemofilia, gen del receptor de andrógenos humano

SUMMARY

X chromosome inactivation is a stochastic event that occurs early in female embryo development to achieve dosage compensation with males. Certain genetic mechanisms affect the normal process causing a skewed X inactivation pattern which has clinical relevance in female carriers of X-linked recessive disorders, like haemophilia. The most commonly used assay to evaluate the X inactivation pattern is the PCR amplification of the human androgen receptor gene (HUMARA). The use of this technique in bleeding carriers and women with haemophilia allows identifying if their hemorrhagic symptoms are due to an unfavourable lyonization. Furthermore, these studies are important for understanding the X chromosome inactivation process in humans.

Key words:

X chromosome inactivation, haemophilia, human androgen receptor gene

Las hemofilias A y B son trastornos de la coagulación que ocasionan manifestaciones hemorrágicas debidas a la deficiencia de los factores VIII y IX, respectivamente.¹ La frecuencia de la hemofilia A es de 1 a 2 en 10 mil varones nacidos vivos, y la de hemofilia B de 1 en 30 mil varones.² La hemofilia se clasifica como leve, moderada o grave de acuerdo al nivel de factor coagulante plasmático de los pacientes^{1,2} y siendo una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X, la hemofilia se manifiesta en el varón hemigigoto, mientras que la mujer heterocigota es portadora y generalmente asintomática;² esto se debe a la inactivación al azar de uno de los dos cromosomas X en las células somáticas femeninas, lo que se conoce como fenómeno de lionización. Por lo tanto, las portadoras de un trastorno recesivo ligado al cromosoma X tendrán en promedio 50% de células que expresan el alelo normal en el cromosoma X activo (y el alelo mutado en el cromosoma X inactivo). Estas

células con el alelo normal activo son suficientes para que las mujeres portadoras no expresen las manifestaciones clínicas de la enfermedad.² Ciertos mecanismos genéticos afectan el proceso normal de inactivación del cromosoma X, propiciando una inactivación sesgada sin consecuencias funcionales en individuos sin alteraciones genéticas, pero con efectos clínicos relevantes en portadoras de trastornos recesivos ligados al cromosoma X, como la hemofilia.^{2,3}

Inactivación del cromosoma X y su implicación en portadoras de hemofilia

La inactivación del cromosoma X es un evento estocástico que comienza en las primeras etapas del desarrollo embrionario con un mecanismo de conteo y selección de cromosomas X. Este proceso está controlado por un *locus* conocido

*Correspondencia y solicitud de sobretiros: Ana Rebeca Jaloma-Cruz. Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Sierra Mojada 800, Col. Independencia, 44340 Guadalajara, Jalisco, México. Apdo. Postal 31310. Tel.: (52 33) 3668 3000, extensión 31929. Fax: (52 33) 3618 1756. Correo electrónico: jessica_mundo@hotmail.com; arjaloma@gmail.com

como centro de inactivación del cromosoma X (*Xic*), localizado en el brazo largo proximal (Xq13.2).^{4,5} *Xic* contiene múltiples elementos reguladores, incluyendo el gen *XIST* (*X Inactive Specific Transcript*).^{4,5} Una vez que se ha seleccionado un cromosoma X para inactivarse, el ARN de *XIST* se incrementa, se acumula y comienza el silenciamiento.^{4,5} El transcrito de *XIST* se propaga hacia arriba y abajo del cromosoma X donde reside, como una señal de inactivación (inactivación *cis*), y a pesar de que *XIST* participa en el inicio de la inactivación del cromosoma X tiene un papel menor en el mantenimiento de la misma.^{4,5} El estado de represión de un cromosoma X se mantiene a través de las divisiones celulares y esto se logra mediante modificaciones epigenéticas como la metilación de residuos de citosina en el ADN, replicación tardía e hipacetilación de histona H4.⁴

Existen casos donde la ionización no ocurre al azar y se presenta inactivación extrema, 0:100, donde el mismo cromosoma X se encuentra activo en todas las células.³ Esta situación puede deberse a un sesgo en la decisión inicial de la inactivación o por presiones selectivas subsecuentes sobre un linaje celular específico, como se observa en ciertos trastornos linfoproliferativos ligados al cromosoma X.^{5,6} En este caso, ciertas mutaciones pueden proporcionar ventajas o desventajas a una célula, ocasionando una competencia entre los linajes celulares, provocando que uno supere al otro y como resultado se genera un sesgo en la proporción celular que originalmente presentaba ionización al azar.^{5,6} Por otro lado, si el sesgo es ocasionado por mutaciones que afectan la decisión inicial, es posible que el centro de inactivación del cromosoma X que involucra al gen *XIST* se encuentre afectado.⁵

Un cromosoma X no puede inactivarse sin un gen *XIST* funcional.⁵ Deleciones completas del *locus* evitan la inactivación en *cis* del cromosoma X.⁵ Mutaciones que decrecientan la actividad de *XIST* interfieren con la habilidad del cromosoma X para inactivarse.⁵ Además, algunos elementos reguladores que se encuentran presentes en el centro de inactivación del cromosoma X son necesarios para recibir la señal de represión mediada por *XIST*, por lo que mutaciones que interfieran con la respuesta a esta señal o incrementen la probabilidad de que *XIST* sea reprimido, pueden resultar en inactivación sesgada del cromosoma X.⁵ Asimismo, existe evidencia de que una mutación puntual en el promotor del gen *XIST* provoca la inactivación preferencial del cromosoma X que la porta.^{2,5}

En mujeres no afectadas o sin alteraciones, la evaluación del patrón de inactivación del cromosoma X puede no tener importancia clínica, sin embargo, un patrón de inactivación con sesgo extremo en portadoras de algún trastorno mendeliano recesivo ligado al cromosoma X, como la distrofia muscular de Duchenne y la hemofilia, puede explicar la expresión de la enfermedad.^{2,5,7} En hemofilia existen ciertos mecanismos genéticos que pueden llevar a la expresión fenotípica de un nivel de factor coagulante disminuido y manifestaciones hemorrágicas en mujeres:^{1,2}

1. Anormalidades numéricas y estructurales del cromosoma X.
2. Homocigocidad para la mutación del *FVIII* o *FIX* que se presenta generalmente cuando hay consanguinidad.

3. Ocurrencia concomitante de dos mutaciones de *nov*o en los genes del *FVIII* o del *FIX*.
4. Isodisomía uniparental del cromosoma X.
5. En deficiencia de factor VIII, la presentación de enfermedad de Von Willebrand variedad Normandía.
6. Inactivación extrema del cromosoma X normal en una mujer heterocigota.

Esta última es la causa más frecuentemente descrita en la literatura, como el caso reportado por Favier R y colaboradores (2000): paciente femenina con nivel de *FVIII* <1% (hemofilia grave) y manifestaciones hemorrágicas, quien que presentó niveles normales de factor von Willebrand y cariotipo 46, XX sin anomalías estructurales visibles.² Se pudo confirmar el origen del cromosoma X paterno y materno mediante el análisis de polimorfismos intragénicos y cercanos al gen del *FVIII*. Finalmente se evaluó el patrón de inactivación del cromosoma X en el caso índice, el cual se encontraba extremadamente sesgado.² Se concluyó que la hemofilia grave en esta mujer se debía a una mutación de *nov*o en el gen del *FVIII* asociada a una inactivación con sesgo extremo del cromosoma X materno que porta el alelo del gen del *FVIII* silvestre.²

El estudio anterior y otros como el de Casey G y colaboradores (2004) —donde se encontró la expresión fenotípica de hemofilia A en mujeres portadoras en las que existía la expresión de un solo alelo del *FVIII* debido a una inactivación no balanceada del cromosoma X—⁷ y el de Biccocchi MP y colaboradores (2005) — caso familiar con inactivación sesgada ligada al *Xic* en mujeres heterocigotas con manifestaciones de hemofilia A—,⁵ ponen de manifiesto la importancia del análisis del patrón de inactivación del cromosoma X para explicar la expresión fenotípica de hemofilia A y B en portadoras.^{2,5,7}

También se ha observado que no en todos los casos la expresión fenotípica de hemofilia en portadoras sintomáticas tiene una correlación con un sesgo extremo en la inactivación del cromosoma X.⁸ Esta discordancia puede ser explicada por un mosaicismo tejido-específico, con inactivación sesgada no presente en tejido sanguíneo pero sí en tejido hepático donde se producen los factores de coagulación.⁸

Marcadores para estudio del patrón de inactivación del cromosoma X

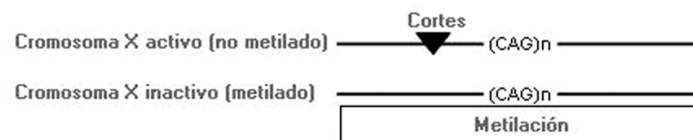
Para evaluar el patrón de inactivación del cromosoma X es necesario distinguir entre ambos cromosomas y determinar si se encuentran equitativamente activos.⁶ La replicación tardía es un procedimiento cuantitativo excelente pero únicamente aplicable cuando existe una diferencia estructural entre los cromosomas X, como translocaciones X; autosoma.⁶ La expresión de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) ha sido utilizada pero es limitada porque el polimorfismo es relativamente raro en la población caucásica (~1% heterocigocidad).⁶ Finalmente, la mejor opción para la evaluación del patrón de inactivación del X ha sido la detección de las diferencias en la metilación entre los cromosomas X activo e inactivo.⁶

La disponibilidad de sondas moleculares para la región 5' de genes polimórficos ligados al X, como el gen de la hipoxantina fosforibosiltransferasa (*HPRT*) y el gen de la fosfoglicerato cinasa (*PGK*), permiten la evaluación del patrón de inactivación en una gran proporción de mujeres, sin embargo, sólo 35 a 40% de las mujeres son heterocigotas para este polimorfismo.^{6,9,10} En 1992, Allen y colaboradores desarrollaron una técnica que utiliza un polimorfismo de repeticiones cortas o STR en el gen del receptor de andrógenos humano (*HUMARA*),¹⁰ gen que en el primer exón contiene una repetición altamente polimórfica (~90%) de trinucleótidos CAG, lo cual permite establecer el origen parental de los cromosomas X en mujeres informativas para este *locus*.^{2,5,6,9,10} La proximidad del STR a cuatro sitios de restricción sensibles a metilación, dos *HpaII* y dos *HhaI* (Figura 1),¹⁰ hace posible el análisis basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), puesto que se ha demostrado que la metilación de estos sitios se correlaciona con la inactivación del cromosoma X.^{2,5,6,9,10}

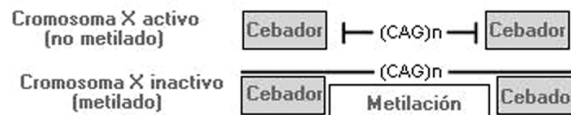
Metodología del análisis por PCR del gen *HUMARA*

El ADN es digerido primeramente con una enzima sensible a metilación, ya sea *HpaII* o *HhaI*, de manera que los alelos no metilados (activos) son cortados y consecuentemente los iniciadores no podrán acoplarse a su sitio de unión, con lo cual no habrá amplificación, mientras que los alelos metilados (inactivos) no son cortados y sí son amplificados (Figura 1).¹⁰ Ya que la metilación de los sitios *HpaII* o *HhaI* se correlaciona con la inactivación del X, el producto que es visualizado en un gel de poliacrilamida a 9% en condiciones no desnaturalizantes y teñido con nitrato de plata, es únicamente el correspondiente al cromosoma X metilado o inactivo.⁵ Por lo tanto, cuando ocurre una inactivación sesgada, el alelo inactivo será preferentemente amplificado, lo cual podrá ser identificado con una banda de mayor intensidad en el gel o como única banda cuando se trate de un sesgo extremo.^{5,9}

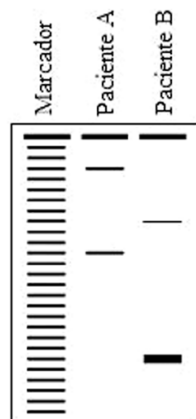
La enzima de restricción sensible a metilación (*Hpa II*) corta los alelos no metilados o activos, mientras que los alelos metilados o inactivos no serán cortados.



Los alelos cortados no podrán ser amplificados



Visualización de los productos en gel de poliacrilamida



Paciente A
Inactivación aleatoria del cromosoma X - Las bandas son de proporciones semejantes.

Paciente B
Inactivación sesgada del cromosoma X - Una de las bandas es más intensa que la otra.
Predominio de un alelo con respecto al otro.

Figura 1. Esquema de la evaluación del patrón de inactivación del cromosoma X mediante el análisis por PCR del gen *HUMARA*.¹⁰

Para la optimación del análisis por PCR del gen *HUMARA* se deben tener en cuenta dos consideraciones importantes:

1. Los resultados obtenidos de la digestión utilizando *HpaII* se correlacionan completamente con el patrón de inactivación del cromosoma X, pero los resultados obtenidos de la digestión con la enzima *HhaI* deben ser tratados con mayor precaución, debido a que pueden existir valores discordantes con la inactivación, lo que no sucede cuando se emplea la enzima *HpaII*.⁹
2. Es necesario limitar el número de ciclos de la PCR a 20, pues de esta manera se reduce la amplificación preferencial de los alelos menores evitando una interpretación errónea del sesgo debida a un artefacto de la amplificación del polimorfismo tipo STR.⁹

De cualquier forma, es necesario realizar el mismo ensayo sin previa digestión, el cual servirá como control de la reacción.⁹

Los resultados del ensayo obtenidos a partir de geles de poli-acrilamida se deben confirmar con una evaluación semi-cuantitativa de las bandas de la electroforesis, por medio de un programa de densitometría, lo que permitirá establecer la relación entre alelos, tanto para el ensayo sometido a la digestión enzimática como para el control sin digestión.⁹ Se esperará un valor cercano a uno cuando las bandas sean semejantes en los casos de inactivación al azar y habrá diferencia en la relación entre alelos cuando alguno de los valores de los alelos se reduzca considerablemente o sea igual a cero, lo cual reflejará el efecto de un sesgo parcial o extremo en el patrón de inactivación, respectivamente.⁹

Recientemente esta técnica se ha optimado con el empleo de métodos automatizados, utilizando iniciadores marcados con moléculas fluorescentes para analizar los productos de PCR con y sin digestión, en un secuenciador de ADN,^{2,3} permitiendo que el ensayo sea más sensible y cuantitativo.

Conclusiones

Varios estudios han demostrado la importancia de analizar el patrón de inactivación del cromosoma X en portadoras sintomáticas y mujeres con hemofilia, ya que es posible que

las manifestaciones hemorrágicas puedan explicarse por un patrón de inactivación sesgado del cromosoma X. En nuestro país existen casos de portadoras sintomáticas y mujeres con hemofilia, y aunque estas últimas son excepcionales, todas requieren un manejo hematológico muy cuidadoso con tratamiento eficiente, sobre todo en eventos ginecológicos o intervenciones quirúrgicas mediante regímenes profilácticos, que eviten complicaciones hemorrágicas.

La identificación de un sesgo en el patrón de inactivación del cromosoma X es de suma importancia y debe ser considerada para el seguimiento y asesoramiento genético por el riesgo de recurrencia en otras portadoras de la familia de presentar manifestaciones hemorrágicas. Además, el registro de dichos casos clínicos inusuales es de valiosa importancia para la comprensión del proceso de inactivación del cromosoma X en humanos.

Referencias

1. **McKusick VA.** Mendelian inheritance in man. Catalog of autosomal dominant, autosomal recessive and X-linked phenotypes. 11th edition. Baltimore, EUA: Johns Hopkins University Press; 2001.
2. **Favier R, Lavergne JM, Costa JM, Caron C, Mazurier C, Viéumont M, et al.** Unbalanced X-chromosome inactivation with a novel FVIII gene mutation resulting in severe hemophilia A in a female. *Blood* 2000;96:4373-4375.
3. **Amos-Landgraf JM, Cottle A, Plenge RM, Friez M, Schwartz Ch, Longshore J, et al.** X chromosome inactivation patterns of 1005 phenotypically unaffected females. *Am J Hum Genet* 2006;79:493-499.
4. **Ng Karen, Pullirsch D, Leeb M, Wutz A.** Xist and the order of silencing. *EMBO Rep* 2007;8:34-39.
5. **Bicocchi M, Migeon B, Pasino M, Lanza T, Bottini F, Boeri E, et al.** Familial nonrandom inactivation linked to the X inactivation centre in heterozygotes manifesting haemophilia A. *Eur J Hum Genet* 2005;13:635-640.
6. **Belmont JW.** Genetic control of X inactivation and processes leading to X-inactivation skewing. *Am J Hum Genet* 1996;58:1101-1108.
7. **Casey G, Rodgers S, Hall J, Lloyd J, Rudzki Z.** Phenotypic expression of hemophilia A in female carriers. *Haemophilia* 2004;10(Suppl 3):2.
8. **Orstavik KH, Scheibel E, Ingerslev J, Schwartz M.** Absence of correlation between X chromosome inactivation pattern and plasma concentration of factor VIII and factor IX in carriers of haemophilia A and B. *Thromb Haemost* 2000;83:433-437.
9. **Gale RE, Mein CA, Linch DC.** Quantification of X-chromosome inactivation patterns in haematological samples using the DNA PCR-based HUMARA assay. *Leukemia* 1996;10:362-367.
10. **Allen C, Zoghbi H, Moseley A, Rosenblatt H, Belmont JW.** Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 1992;51:1229-1239.