

# Estudio de la base genética de la asociación de hiperinsulinismo congénito y poliquistosis renal tipo adulto

## A study of the genetic basis of the association of congenital hyperinsulinism and adult polycystic kidney disease

Antonio David Hidalgo Santos<sup>1</sup>, Maria del Carmen de Mingo Alemany<sup>1</sup>, Francisca Moreno Macián<sup>1</sup>, Sara León Cariñena<sup>1</sup>, Francisco Martínez Castellano<sup>2</sup>, Juan Antonio Cerón Pérez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Endocrinología infantil. Hospital Universitario y Politécnico La Fe. Valencia

<sup>2</sup>Servicio de Genética clínica. Hospital Universitario y Politécnico La Fe. Valencia

### Resumen

En nuestro centro se ha realizado el seguimiento de 6 pacientes afectados de poliquistosis renal e hiperinsulinismo congénito. Dicha asociación ha sido descrita en la literatura en dos ocasiones. **Objetivos:** Realizamos un estudio con intención de identificar los genes responsables de la asociación observada. **Material y métodos:** Ultrasecuenciación de los genes implicados en hiperinsulinismo congénito, hibridación del ADN para detectar variantes en el número de copias y análisis de las regiones deletionadas, duplicadas o en homocigosis. **Resultados:** No se detectó ninguna mutación en los genes conocidos de hiperinsulinismo congénito. Se descartó la posibilidad de que se tratara de un síndrome de genes contiguos. Se detectó en cuatro pacientes un tramo en homocigosis que contiene el gen *CEACAM1* cuya secuenciación no permitió identificar ninguna mutación en estos pacientes. **Conclusión:** En nuestro estudio no se ha podido encontrar ninguna causa genética que justifique ambas patologías.

**Palabras clave:** Hiperinsulinismo congénito, poli-

quistosis renal, síndrome de delección de genes contiguos

### Abstract

In our center, 6 patients with polycystic kidney disease and congenital hyperinsulinism were followed up. This association has been described in the literature twice. **Objectives:** We performed a study with the intention of identifying the genes responsible for the observed association. **Materials and methods:** Ultrasequencing of genes involved in congenital hyperinsulinism, DNA hybridization to detect copy number variations and analysis of deleted, duplicated or homozygous regions. **Results:** No mutation was detected in the known genes of congenital hyperinsulinism. The possibility of contiguous gene syndrome was ruled out. A homozygous section containing the *CEACAM1* gene was detected in four patients, whose sequencing did not allow the identification of any mutation. **Conclusion:** In our study no genetic cause has been found to justify both pathologies.

**Key Words:** congenital hyperinsulinism, polycystic kidney diseases, contiguous gene syndrome

### Correspondencia:

Antonio David Hidalgo Santos  
Endocrinología infantil  
Hospital Universitario y Politécnico La Fe  
Avda Fernando Abril Martorell 106, 46026, Valencia  
Tel: 687164542  
E-mail: davidhidalgosantos@yahoo.es

### Introducción

El hiperinsulinismo congénito de la infancia es un trastorno poco frecuente que resulta de una disregulación en la secreción de insulina por las

células  $\beta$  pancreáticas, con una incidencia aproximada de 1 de cada 50.000 nacidos vivos. Representa la causa más común de hipoglucemia recurrente y persistente durante la infancia. Hasta el momento se han implicado mutaciones en 11 genes diferentes (*ABCC8*, *KCNJ11*, *GLUD1*, *GCK*, *HADH1*, *UCP2*, *MCT1*, *HNF4A*, *HNF1A*, *HK1*, *PGM1*) en formas monogénicas de hiperinsulinismo congénito <sup>(1)</sup>. La etiología genética más común es la pérdida de función por mutación en los genes *ABCC8* y *KCNJ11*; éstos son dos genes adyacentes que se localizan en el brazo corto del cromosoma 11 (11p5.1) y que codifican respectivamente el receptor de sulfonilurea 1 y el canal de K-ATP dependiente. El hiperinsulinismo también puede estar asociado con muchos síndromes de crecimiento excesivo o de forma transitoria a condiciones como asfixia neonatal, retraso del crecimiento intrauterino, isoimmunización Rh y diabetes mellitus materna <sup>(2)</sup>. Además se han descrito asociaciones entre hiperinsulinismo congénito y otros síndromes <sup>(3)</sup>.

Entre las enfermedades renales quísticas hereditarias, las más comunes son las enfermedades renales poliquísticas como la enfermedad renal poliquística autosómica recesiva y la enfermedad renal poliquística autosómica dominante. La primera es una enfermedad rara relacionada con un solo gen asignado al cromosoma 6p 21. Provoca insuficiencia renal en la infancia y en la niñez y se suele diagnosticar durante el período neonatal. La forma dominante (1/1000) aunque generalmente se presenta en la edad adulta ha sido cada vez más reconocida en la edad pediátrica y está relacionada con 2 genes diferentes: el gen *PKD1* en el cromosoma 16 p 13.3 que representa el 85% de los casos y el *PKD2* asignado al cromosoma 4q 13-p23 que representa el 15% de los casos <sup>(4,5)</sup>. La nefronoptosis juvenil y la displasia renal multiquística se encuentran dentro del espectro clínico de las enfermedades quísticas renales en la infancia.

Muchos trastornos pediátricos muestran quistes renales o displasia quística como componente de sus fenotipos pleiotrópicos. Estos trastornos se pueden distinguir generalmente de la enfermedad renal poliquística autosómica recesiva y la dominante mediante una historia detallada, un examen físico, estudios básicos de laboratorio y de imágenes y, en particular, las características clínicas predominantemente no renales <sup>(6)</sup>.

En nuestro centro se ha realizado el seguimiento de 6 pacientes afectos de poliquistosis renal e hiperinsulinismo congénito. Los 6 pacientes pertenecen a 4 familias no emparentadas; 4 de ellos son dos parejas de hermanos. Dicha asociación ha sido descrita en la literatura en dos ocasiones <sup>(7,8)</sup>. Se plantearon las siguientes hipótesis de trabajo:

1. La hipótesis principal es que esta asociación clínica pueda ser debida a un síndrome de genes contiguos, por una microdelección o una microduplicación que afecta al menos dos genes distintos localizados en la misma región cromosómica.
2. Como hipótesis secundarias establecemos que esta asociación pueda ser debida a la presencia de un tipo de mutación monogénica muy poco prevalente y de carácter recesivo, por lo que se puede asumir que ambas familias han heredado una misma mutación de un ancestro común. Bajo esta hipótesis, y dado que no se conoce una posible consanguinidad ni relación de parentesco entre ambas familias, el mapeo de homocigosidad en los pacientes permitirá delimitar en gran medida el gen responsable.
3. Si por el contrario, ambas familias no presentan homocigosidad simultáneamente para la misma mutación, el hecho de que se trate de una enfermedad tan poco prevalente permite esperar que al menos compartan la presencia de mutaciones en un mismo gen candidato.

## Material y métodos

En la tabla 1 se adjuntan los datos clínicos de los seis pacientes (sexo, edad al diagnóstico y actual, clínica de debut y niveles de insulina/glucagón al diagnóstico, tratamiento recibido y función renal actual). Los cuatro primeros pacientes de la tabla son las dos parejas de hermanos (el paciente 1 y 2 son hermanos y el paciente 3 y 4 son hermanos) en los que realizamos un estudio con intención de identificar el gen /genes responsables de la asociación observada:

1. Hibridación del ADN sobre un array que permite genotipar 610.000 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), así como detectar variantes en el número de copias, para ello el tipo de array empleado fue Illumina Infinium 610S-Quad que permite caracterizar los 610.000 SNPs. Se realiza un análisis in silico de los genes contenidos en aquellas regiones que se encuentran delecionadas, duplicadas o en homocigosis con el fin de seleccionar posibles candidatos funcionales.
2. Análisis mediante ultrasecuenciación de los siguientes genes conocidos en la regulación de la secreción de insulina *ABCC8*, *GCK*, *HNF1A*, *HNF1B*, *HNF4A*, *INS*, *KCNJ11*, *AKT2*, *BLK*, *CEL*, *GLUD1*, *HADH*, *INSR*, *KCJ11*, *KLF11*, *NEUROD1*, *PDX1*, *PLAG1*, *SLC16A1*, *UCP2*. Para ello se realiza una captura de las regiones

Tabla 1. Datos clínicos de los pacientes afectados de hiperinsulinismo congénito y poliquistosis renal.

HIPERINSULINISMO CONGÉNITO				POLIQUISTOSIS RENAL		
Sexo	Edad al diagnóstico	Edad actual	Clínica inicial	Niveles insulina/ glucosa al diagnóstico	Tratamiento	Función renal actual
1 Varón	4 años	39 años	Convulsión, hipotonía	I: 42,5 mUI/L G: 36 mg/dl	Diazóxido	Normal
2 Varón	1 año	37 años	Convulsión	I: 36 mUI/L G: 33 mg/dL	Diazóxido y Nifedipino	Normal
3 Varón	8 meses	23 años	Crisis de hipotonía, cianosis	I: 19 mUI/L G: 17 mg/dl.	Diazóxido	ERC estadio IIIB
4 Mujer	2 años y 2 meses	30 años	Crisis de hipotonía	I: 23,7 mUI/L G: 40 mg/dl	Diazóxido	ERC estadio II-III
5 Varón	7 días de vida	4 años	Vómitos	I: 16 mUI/L G: 45 mg/dl	Diazóxido	ERC estadio IIIB
6 Varón	3 años y 7 meses	3 años	Cefalea e insomnio	I: 7 mUI/L G: 41 mg/dl	Medidas dietéticas	ERC estadio III

Tabla 2. Relación de deleciones detectadas en los pacientes estudiados (posiciones según hg19).

Cromosoma	Posición inicial	Posición inicial	Tamaño (pb)	Genes	CNVs
4	4340034	4346237	6203	-	NO
6	78972930	79033478	60548	-	SI
10	20850624	20855009	4385	-	SI
15	101437358	101439353	1995	ALDH1A3	SI
16	4643452	4711737	68285	MGRN1	NO
17	4856376	4863410	7034	ENO3, SPAG7	SI
17	70691071	70692820	1749	-	NO
19	49233406	49251755	18349	RASIP1, IZUMO1, FUT1	SI

exónicas de interés, utilizando Kit TruSight One Sequencing Panel y generación de librerías paired-end. Ultrasecuenciación (2x150pb) en la plataforma NextSeq 500 sequencing system (Illumina). Análisis bioinformático de los datos mediante software HD Genome One Research Edition de Dreamgenics. Han sido consideradas como variantes los cambios con número de lecturas > 20 y con una frecuencia superior al 30%. Las variantes detectadas han sido contrastadas con distintas bases de datos y programas de predicción *in silico*.

En los dos últimos pacientes (no emparentados entre sí) no fue posible el estudio de hibridación dado que el seguimiento en consultas comenzó posteriormente al inicio del estudio, aunque sí se realizó el estudio de ultrasecuenciación de los genes implicados en el punto 2.

Todos los pacientes firman el consentimiento informado para la realización de los estudios genéticos.

## Resultados

El análisis de los resultados obtenidos con las muestras de ADN de los cuatro pacientes analizados en el array de hibridación permite descartar la primera hipótesis planteada. No se detectó ninguna deleción o duplicación que estuviera presente en los cuatro pacientes. Se detectaron ocho deleciones genómicas diferentes, que aparecen detalladas en la tabla 2. No obstante, ninguna de estas deleciones se pudo relacionar con la enfermedad estudiada por distintas causas: por estar descritas como variantes polimórficas sin repercusión clínica (CNVs), por no contener ningún gen o elemento genético funcional conocido, o por afectar a genes que no se pudieron relacionar con la aparición de hiperinsulinismo en base a sus funciones conocidas o posibles y a sus patrones de expresión. Por lo que se desestima la primera hipótesis.

En el estudio de homocigosidad, se identificaron y analizaron todas las regiones en homocigosis e

**Tabla 3.** Regiones en homocigosis e idénticas en los cuatro pacientes (posiciones según hg19).

Cromosoma	Inicio	Fin	Tamaño (pb)	Nº SNPs <sup>a</sup>	Genes contenidos
6	27885356	28671723	786367	153	ZNF165, ZNF192, ZNF193, ZKSCAN4, PGBD1, GPX6, GPX5, ZNF452, NKAPL, pp14762
6	107573570	107989077	415507	74	PDSS2, SOBP
8	50279613	50784484	504871	70	SNTG1
17	58322729	59286263	963534	72	USP32, APPBP2, PPM1D, BCAS3
X	65382685	67286067	1903382	198	SPIN4, FAM123B, ASB12, MTMR8, ZC4H2, ZC3H12B, LAS1L, MSN, VSIG4, HEPH, EDA2R, AR, OPHN1

<sup>a</sup>Polimorfismos de un solo nucleótido.

**Tabla 4.** Regiones que presentan homocigosis intrafamiliar (posiciones según hg19).

Cromosoma	Inicio	Fin	Tamaño (pb)	Nº SNPs <sup>a</sup>	Genes contenidos
12	61320899	61844049	523150	86	-
19	42931004	43853505	922501	98	CXCL17, <b>CEACAM1</b> , PSG1, PSG3, PSG4, PSG8, PSG2, PSG6, PSG7, PSG11, PSG5, PSG9

<sup>a</sup>Polimorfismos de un solo nucleótido.

idénticas en los cuatro pacientes analizados para al menos 50 polimorfismos de un solo nucleótido consecutivos (Tabla 3). En el análisis funcional y del patrón de expresión de todos los genes contenidos en dichas regiones no se pudo identificar un gen candidato funcional que pudiera estar relacionado con la patología. En consecuencia, se desestimó, en principio, la hipótesis de que pudiera estar implicada una misma mutación de carácter recesivo en los cuatro pacientes, que fuera idéntica en las dos familias.

A continuación, se analizó la posibilidad de la existencia de homocigosis intrafamiliar, para un haplotipo diferente en cada familia. Como resultado de este análisis se identificaron otras dos regiones en homocigosis, compartida por cada pareja de hermanos (Tabla 4). Curiosamente, se pudo constatar que en una de ellas, la correspondiente a la región cromosómica 19q13.2, los primeros 40 polimorfismos de tipo SNP eran además idénticos en ambas familias, y a partir de un punto el haplotipo es diferente en cada familia, aunque manteniendo la homocigosis en cada pareja de hermanos. Entre los genes contenidos en esta región, el gen *CEACAM1* se consideró el único candidato funcional con posibilidades de estar implicado en la patología.

Tras detectar zonas en homocigosis para el gen *CEACAM1* en ambas familias se puso a punto su secuenciación. Para ello, se diseñaron oligonucleótidos cebadores específicos para cada uno de los

exones y regiones intrónicas flanqueantes, con la dificultad añadida del elevado grado de homología que presentan, incluso las secuencias intrónicas, con otros miembros de la familia, en los primeros 5 exones del gen. No se consiguió identificar ninguna mutación patológica en las secuencias analizadas de este gen, por lo que se está valorando la posibilidad de analizar otras secuencias con importancia funcional, como la región promotora, secuencias potenciadoras y posibles exones alternativos, que no se procesan en las isoformas más frecuentes del gen.

En los 6 pacientes, el análisis mediante ultrasecuenciación de los genes *ABCC8*, *GCK*, *HNF1A*, *HNF1B*, *HNF4A*, *INS*, *KCNJ11*, *AKT2*, *BLK*, *CEL*, *GLUD1*, *HADH*, *INSR*, *KCJ11*, *KLF11*, *NEUROD1*, *PDX1*, *PLAG1*, *SLC16A1* y *UCP2* no demostró mutaciones.

## Discusión

En nuestro trabajo la secuenciación de los genes conocidos implicados en el hiperinsulinismo no permitió detectar ninguna mutación, además se descarta que forme parte de un síndrome de genes contiguos. En base al mapeo por homocigosis realizado en los cuatro pacientes estudiados, el gen *CEACAM1* se estableció como el principal candidato funcional como causa de esta patología. No obstante la secuenciación de *CEACAM1* no permitió identificar ninguna mutación en estos pacientes.

El gen *CEACAM1* es un miembro de la familia génica del antígeno carcino-embriionario (CEA) que forma parte de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Dos subgrupos de esta familia, las moléculas de adhesión celular (*CEACAMs*) y las glicoproteínas específicas del embarazo (PSGs) se agrupan en una región del brazo largo del cromosoma 19, junto con 11 pseudogenes. La proteína codificada por *CEACAM1* se expresa, entre otros tejidos, en hígado y riñón, actuando como molécula de adhesión celular homo- y heterofílica, con capacidad de unión a otros miembros del mismo subgrupo. Se han atribuido numerosos tipos de funciones a esta proteína, incluyendo un papel en la diferenciación celular, disposición celular en estructuras tridimensionales, angiogénesis, apoptosis, etc. Posiblemente esta diversidad de funciones está relacionada de forma específica con sus múltiples variantes transcripcionales, ya que presenta una gran diversidad de isoformas. No obstante, su posible relación con la patología estudiada se debe a la existencia de un modelo animal de ratón que demuestra la implicación de esta proteína en el aclaramiento de la insulina en hígado.

Poy y colaboradores <sup>(9)</sup> generaron un ratón transgénico con la mutación S503A en *CEACAM1*, que impide su capacidad de fosforilarse en presencia de insulina. Se basaron en la hipótesis de que la insulina estimula la fosforilación de *CEACAM1*, que a su vez estimula la endocitosis y degradación de la insulina en el hepatocito. La consecuencia fue que el ratón desarrolló hiperinsulinemia por un aclaramiento defectuoso de la insulina en el hígado, que a su vez condujo a una resistencia secundaria a la insulina.

Hasta muy recientemente, no ha sido publicado ningún estudio genético que identificara un gen candidato en varios pacientes no relacionados y que explicara la asociación de hiperinsulinismo y poliquistosis renal. Sin embargo, Rubio Cabezas et al <sup>(8)</sup> han llevado a cabo un estudio multicéntrico en el que proponen que esta enfermedad es causada por una mutación en la región promotora (c.-167G.T) del gen de la fosfomanomutasa 2 (*PMM2*), ya sea en homocigosis o en trans con mutaciones que codifican *PMM2*. Para identificar las bases genéticas de este trastorno, realizaron un estudio de ligamiento del genoma completo en cinco familias afectadas identificando estos hallazgos. Las mutaciones bialélicas en *PMM2* causan un trastorno congénito de la glicosilación tipo 1A (CDG1A), que se caracteriza especialmente por una afectación neurológica grave. Sin embargo se trata de un gen pleiotrópico cuya mutación del promotor conduce a que sólo las células renales, las células  $\beta$  pancreáticas y potencialmente las células hepáticas estén afectadas. Esta variante se asoció con una actividad transcripcional reducida de *PMM2* en riñones

humanos y líneas de células  $\beta$  pancreáticas. Por otra parte, el análisis in silico de los investigadores sugirió que esta variante podría afectar a la formación de los bucles de cromatina específica de tejidos, que podría subyacer a la aparición fenotípica de hiperinsulinismo congénito y poliquistosis renal.

El estudio molecular de dicho gen no ha sido realizado en nuestros pacientes dado que su identificación ha sido muy posterior a la realización de nuestro estudio. En función de estos últimos hallazgos, valoraremos la evaluación de esta variante de la región promotora de dicho gen con el fin de determinar si también se encuentra presente en nuestros seis pacientes.

## Conclusiones

Se recoge la asociación entre un tipo de poliquistosis renal en forma del adulto y un tipo de hiperinsulinismo congénito presente en 6 pacientes en seguimiento en nuestra consulta. Mediante los análisis expuestos no se ha podido encontrar la causa genética que justifique ambas patologías. Hacen falta estudios posteriores con el objetivo de evaluar variantes no codificantes en el análisis genético de la enfermedad.

## Conflictos de interés

Los autores declaran que no tienen Conflictos de Interés Potenciales

## Referencias Bibliográficas

1. Stanley CA. Perspective on the Genetics and Diagnosis of Congenital Hyperinsulinism Disorders. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016; 101: 815–826. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26908106>.
2. Senniappan S, Arya VB, Hussain K. The molecular mechanisms, diagnosis and management of congenital hyperinsulinism. *Indian J Endocrinol Metab*. 2013; 17: 19-30.
3. Giri D, Patil P, Hart R, Didi M, Senniappan S. Congenital hyperinsulinism and Poland syndrome in association with 10p13–14 duplication. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep*. 2017 Mar 31; 2017. pii: 16-0125. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28373276>
4. Sweeney WE, Avner ED. Pathophysiology of childhood polycystic kidney diseases: new insights into disease-specific therapy. *Pediatr Res*. 2014; 75: 148-57.

5. Ibrahmov-Beskrovnaya O, Bukanov N. Polycystic kidney diseases: from molecular discoveries to targeted therapeutic strategies. *Cell Mol Life Sci*. 2008; 65: 605-19.
6. Sweeney WE, Avner ED. Diagnosis and management of childhood polycystic kidney disease. *Pediatric Nephrology*. 2011; 26: 675-692. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21046169>.
7. Müller D, Zimmering M, Roehr CC. Should nivedipine be used to counter low blood sugar levels in children with persistent hyperinsulinemic hypoglycaemia?. *Arch Dis Child* 2004; 89: 83-85.
8. Cabezas OR, Flanagan SE, Stanescu H, García-Martínez E, Caswell R, Lango-Allen H et al. Polycystic kidney disease with hyperinsulinemic hypoglycemia caused by a promoter mutation in phosphomannomutase 2. *J Am Soc Nephrol*. 2017 Apr 3. Pii: ASN.2016121312. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28373276>.
9. Poy M, Yang Y, Razaei K, Fernström MA, Lee AD, Kido Y, Erickson SK, Najjar SM. CEACAM1 regulates insulin clearance in liver. *Nature Genetics* 2002; 30: 270-276.