

Premios y Becas de la Fundación Sociedad Española de Endocrinología Pediátrica (F.S.E.E.P) 2023

FSEEP Awards 2023



Entregados en el 45 Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología Pediátrica (Palma, 10-12 de mayo de 2023)

Beca en Investigación Básica en Endocrinología Pediátrica 2023 de la F.S.E.E.P

Proyecto: **Terapia intratecal con T3 nanoencapsulada en un modelo murino del síndrome de Allan-Herndon-Dudley.**

José Carlos Moreno Navarro, Hospital Universitario La Paz. Madrid. Colaboradores: Ana Guadaño Ferraz, Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC, Madrid; María Josefa Alonso Fernández, CIMUS-Centro Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas, Santiago de Compostela.

Beca en Investigación Clínica en Endocrinología Pediátrica 2023 de la F.S.E.E.P

Proyecto: **Evaluación del estado metabólico-nutricional y riesgo cardiovascular en adolescentes con anorexia nerviosa y bajo peso corporal.**

Paula Sol Ventura Wichner, Hospital HM Nens, Barcelona; Núria Amigó, Laboratorio Biosfer Teslab; José Manuel Siurana, Hospital HM Nens, Barcelona; Diego Yeste, Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron, Barcelona; Albert Feliu, Hospital Sant Joan, Reus.

Beca Proyecto de Investigación Clínica Gabriela Morreale 2023 de la F.S.E.E.P

Proyecto: **Impacto medioambiental en el desarrollo y crecimiento del recién nacido prematuro (IMA-DyC-Pre).**

Paula Sol Ventura Wichner, Instituto de Investigación Germans Trias i Pujol (IGTP), Badalona (Barcelona); Marta Ocaña Rico, Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (ibs.GRANADA); Carmen Freire Warden, Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (ibs.GRANADA); Nicolás Olea Serrano, Universidad de Granada.

Beca para la Cooperación al Desarrollo en Endocrinología Pediátrica 2023 de la F.S.E.E.P

Proyecto: **Hambre Cero, programa integral de lucha contra la desnutrición en la región rural de Gambo en Etiopía: huerto comunitario, cribado nutricional y suplementos nutricionales.**

Ignacio Alegría Coll, ONGD Alegría sin fronteras, avalado por Isolina Riaño Galán, ONGD Asociación Arco Iris, educación para el desarrollo.

Beca F.S.E.E.P de Intercambio en Servicio y/o Unidades de Endocrinología Pediátrica 2023

(Patrocinada por Sandoz)

Proyecto: **Uso de inteligencia artificial para la caracterización de endotipos de diabetes mellitus de tipo 1 en la población pediátrica**, que se desarrollará en la Unidad de Endocrinología Pediátrica del Hospital de Niños de Toronto.

Yeray Nóvoa Medina, Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno Infantil, Las Palmas de Gran Canaria.

Beca F.S.E.E.P José Igea 2023

(Patrocinada por Pfizer)

Proyecto: **Caracterización molecular de variantes codificantes no HLA de riesgo en población pediátrica con diabetes de tipo 1 y su asociación con el perfil clínico y autoinmune.**

Investigadora principal: Purificación Ros Pérez, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Madrid.

Becas F.S.E.E.P Anne-Marie Kappelgaard a la Investigación en Endocrinología Pediátrica 2023

(Patrocinadas por Novo Nordisk)

Proyecto: **Registro Nacional de pacientes con variantes en heterocigosis en ACAN e IHH. Proyecto piloto de registro de pacientes con displasias esqueléticas con afectación leve.**

Investigadora principal: Lucía Sentchordi Montané, Hospital Infanta Leonor, Madrid.

Coinvestigadores: Ana Coral Barreda Bonis, Isabel González Casado, Hospital La Paz, Madrid; Karen E. Heath, INGEMM, IdiPAZ. Hospital La Paz, Madrid.

Proyecto: **Monitorización de los pacientes con hiperplasia suprarrenal congénita clásica por déficit de 21 hidroxilasa mediante el análisis de esteroides urinarios.**

Investigadora principal: Marina Mora Sitja, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid.

Premios F.S.E.E.P a la Investigación en Endocrinología Pediátrica y Crecimiento 2023

(Patrocinados por Merck Serono)

Primer Premio

Efficacy and safety of setmelanotide, a melanocortin-4 receptor agonist, in patients with Bardet-Biedl syndrome and Alström syndrome: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial with an open-label period.

Haqq AM, Chung WK, Dollfus H, Haws RM, Martos-Moreno GÁ, Poitou C, Yanovski JA, Mittleman RS, Yuan G, Forsythe E, Clément K, Argente J.

Lancet Diabetes Endocrinol 2022; 10: 859-68.

Accésits

Candidate biomarkers for the prediction and monitoring of partial remission in pediatric type 1 diabetes.

Gomez-Muñoz L, Perna-Barrull D, Caroz-Armayones JM, Murillo M, Rodriguez-Fernandez S, Valls A, Vazquez F, Perez J, Corripio R, Castaño L, Bel J, Vives-Pi M.

Front Immunol 2022; 13: 825426.

Cognitive and adaptive effects of early growth hormone treatment in Prader-Willi syndrome patients: a cohort study.

Ayet-Roger A, Joga-Elvira L, Caixàs A, Corripio R.

J Clin Med 2022; 11: 1592.

XXV Premios F.S.E.E.P a Póster y Comunicación Oral en Endocrinología Pediátrica

(Patrocinado por Lilly)

Premio a la Mejor Comunicación Oral en el Congreso de la SEEP 2023

Utilización del test de arginina-coceptina en el síndrome polidipsia-poliuria en pediatría. Experiencia en seis pacientes.

González Llorens N¹; Puerto Carranza E²; Mogas Viñals E¹; Campos Martorell A¹; Yeste Fernández D¹; Clemente León M¹.

¹Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona; ²Hospital Universitari Doctor Josep Trueta, Girona.

Premio al Mejor Póster del Congreso de la SEEP 2023

Identificación de predictores precoces de hipotiroidismo congénito permanente y transitorio.

Navarro Moreno C; Fernández Fuentes C; Gómez Gila AL, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla.

Premios de la Revista Española de Endocrinología Pediátrica de la F.S.E.E.P 2023

Premio al mejor artículo original

Singularities of the Endocrine Causes of Hypoglycemia in the Pediatric Age.

Inés Vieira¹, Laura Correia², Isabel Dinis³, Rita Cardoso⁴, Joana Caetano⁴, Dírcea Rodrigues¹, Isabel Paiva¹, Alice Mirante⁴.

¹Endocrinología, Diabetes e Metabolismo. Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. Coimbra (Portugal). ²Pediatría. Centro Hospitalar de Baixo Vouga. Aveiro (Portugal). ³Endocrinología Diabetes e Crescimento. Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. Coimbra (Portugal). ⁴Endocrinología, Diabetes e Crescimento. Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. Coimbra (Portugal).

Rev Esp Endocrinol Pediatr 2022; 13: 27-35.

Premio al mejor caso clínico

Hipocalcemia grave secundaria a pseudohipoparatiroidismo en niña con antecedente de obesidad precoz y macrosomía.

Cristina Armero-Bujaldón¹, Estefanía Moratalla Jareño¹, Alejandro Ramírez Arredondo², Diego de Sotro Esteban³, María Caimari Jaume⁴, Guiomar Pérez de Nanclares⁵, Arrate Pereda⁵.

¹Servicio Endocrinología Infantil. Hospital Universitario Son Espases. Palma de Mallorca, Illes Balears (España). ²Pediatría. Hospital Comarcal de Inca. ³Servicio Endocrinología Infantil. Clínica Rotger. ⁴Servicio Endocrinología Infantil. Hospital Universitario Son Espases. ⁵Instituto de investigación Sanitaria BioAraba. Laboratorio de (Epi)Genética Molecular. Hospital Universitario Araba, Vitoria-Gasteiz.

Rev Esp Endocrinol Pediatr 2022; 13: 64-72.

Resumen de resultados de las BECAS 2021 y 2022 de la F.S.E.E.P

Presentados en el 45 Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología Pediátrica. (Palma, 10-12 de mayo de 2023)

Beca de Investigación Básica en Endocrinología Pediátrica 2022 de la F.S.E.E.P

Estudios funcionales de variantes genéticas en pacientes con hiperinsulinismo congénito

Núria Camats-Tarruella^{1,2}, Noelia Baz-Redón^{1,2}, Mónica Fernández-Cancio^{1,2}, María Antolín^{3,4}, Elena García-Arumí^{2,3,4,5}, Ariadna Campos^{1,6,7}, Eduard Mogas^{1,6,7}, Anna Fàbregas^{6,7}, Diego Yeste^{1,2,6,7}, María Clemente^{1,2,6,7}

¹ Grupo de investigación en Crecimiento y Desarrollo, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona. ² Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBER)

RER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid. ³ Unidad de Genética Clínica y Molecular y Enfermedades Raras, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona. ⁴ Grupo de Investigación en Genética Médica, VHIR, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona. ⁵ Grupo de Investigación en Enfermedades Neuromusculares y Mitocondriales, VHIR, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona. ⁶ Sección de Endocrinología Pediátrica, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona. ⁷ Unidad de Pediatría, Obstetricia y Ginecología y Medicina Preventiva, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.

Introducción

El hiperinsulinismo congénito (HIC) es la causa más común de hipoglucemia persistente en recién nacidos y lactantes. Es una condición heterogénea en la que la desregulación de la secreción de insulina puede conducir a formas muy graves de hipoglucemia. Por tanto, la detección y el tratamiento precoces son claves para prevenir o atenuar las secuelas neurológicas de estos pacientes¹. Desafortunadamente, algunos de los pacientes no responden al tratamiento farmacológico. Dos tercios de los pacientes con HIC (60-65%) son portadores de variantes candidatas en genes expresados en las células beta pancreáticas. Estos genes (más de 14) participan directa o indirectamente en la regulación de la secreción de insulina²⁻⁶. Específicamente, las variantes inactivadoras de los genes *ABCC8* y *KCNJ11* son la causa más frecuente y generalmente dan lugar a formas graves que no responden al tratamiento con diazóxido. Los genes *ABCC8* y *KCNJ11* codifican para las subunidades SUR1 y Kir6.2, respectivamente, del canal de potasio sensible al trifosfato de adenosina (K_{ATP}), que desempeña un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa por las células beta pancreáticas⁷. Específicamente, las variantes de *ABCC8* con pérdida de función (inactivadoras) pueden causar HIC y las variantes con ganancia de función (activadoras) pueden causar diabetes neonatal (con baja secreción de insulina e hiperglucemia)⁷. Además, existen dos tipos histológicos principales de HIC en pacientes con variantes *ABCC8* (y *KCNJ11*), las formas focales y las formas difusas. Las formas focales son subsidiarias del tratamiento quirúrgico curativo, al estar localizada la lesión pancreática.

Nuestra unidad clínica (Hospital Universitari Vall d'Hebron, HUVH, Barcelona) es centro de referencia de enfermedades metabólicas hereditarias y lleva 45 años siguiendo a 71 pacientes con HIC. Durante más de tres años, en colaboración con el Departamento de Genética y Medicina Molecular (HUVH), nuestro panel de genes de secuenciación de nueva generación para HIC de diseño propio (14 genes) ha detectado variantes en genes relacionados con el HIC en el 55% de los pacientes en seguimiento: de ellos, actualmente 28 pacientes tienen variantes en el gen *ABCC8*⁸. En algunos casos existe una buena asociación entre la alteración genética y las características clínicas del paciente portador, pero no es tan clara en otros casos⁸. Por lo tanto, es necesario realizar estudios funcionales de variantes no descritas previamente o descritas sin estudio funcional para confirmar si tienen un impacto real como causa del HIC. Desafortunadamente, a pesar de su importancia, hay muy poca información acerca de estudios funcionales en el HIC. Por otro lado, un 45% de estos pacientes permanece sin diagnóstico genético y sería necesario llevar a cabo

estudios genéticos más exhaustivos, como un análisis de exoma completo (WES), para hallar nuevos genes afectados.

En nuestra unidad, desde hace más de 40 años realizamos un abordaje conservador en la mayoría pacientes con afectación pancreática difusa que no responden al tratamiento farmacológico^{8,9}. Por tanto, disponemos de una extensa cohorte de pacientes no pancreatectomizados (22 de 28 pacientes con variantes en *ABCC8* no fueron pancreatectomizados). Existen pocos datos en la bibliografía sobre la evolución natural a largo plazo de esta enfermedad, porque hay pocos pacientes no pancreatectomizados descritos. En 2011 se inició un estudio longitudinal para evaluar el estado del metabolismo hidrocarbonado a largo plazo en los pacientes no pancreatectomizados mediante la realización periódica de monitorización continua de glucosa intersticial y de test de tolerancia oral a glucosa en los pacientes con picos hiperglucémicos en la monitorización continua de glucosa intersticial. Observamos diferentes fenotipos en estos pacientes: 16 de ellos con resolución espontánea (tres pacientes con hiperglucemia, cuatro con hipoglucemia, seis evolucionaron a diabetes y el resto ha permanecido normoglucémico hasta la fecha)⁸. Por tanto, estos datos sugieren que existe una variabilidad en la evolución natural de la enfermedad de origen poco claro. Se han propuesto algunos mecanismos patogénicos para explicar esta evolución a diabetes¹⁰, pero creímos que un estudio minucioso de estos pacientes por WES podría identificar otros genes afectados que pudieran explicar su evolución clínica. Por lo tanto, en estos pacientes con defectos en *ABCC8*, nos interesaba detectar variantes adicionales candidatas en genes de predisposición a diabetes que justifiquen los fenotipos a largo plazo.

Objetivos

Nuestros objetivos son: a) realizar estudios funcionales *in vitro* de variantes candidatas en el gen *ABCC8* detectadas en nuestros pacientes con HIC; b) estudio de WES en pacientes con HIC con estudio genético negativo para detectar otros genes implicados; y c) análisis de WES a pacientes no pancreatectomizados con cambios en *ABCC8* para detectar variantes en genes de predisposición a diabetes que justifiquen los fenotipos a largo plazo.

Metodología

Cohorte con hiperinsulinismo congénito

Todos los pacientes, o sus tutores responsables, aprobaron un consentimiento informado. Sus datos se mantienen anonimizados por asignación de un

código de muestra. Nuestro estudio está aprobado por el Comité de Ética en Investigación Clínica del HUVH: PR(AMI)485/2019. Nuestra unidad clínica (Servicio de Endocrinología Pediátrica, HUVH, Barcelona, España) lleva 45 años siguiendo a una cohorte de >70 pacientes con HIC. Su número está aumentando aproximadamente en tres pacientes por año. Los criterios de inclusión están expuestos en Clemente et al⁸. El análisis genético de estos pacientes se realiza en el Departamento de Genética y Medicina Molecular de nuestro hospital (HUVH), con un panel de genes HIC (Cell3 Target Custom Panel, NONACUS). Disponemos de una base de datos actualizada con todas las variantes candidatas detectadas en nuestros pacientes⁸.

Métodos

Estudios funcionales in vitro de variantes candidatas en el gen ABCC8 (objetivo 1). Se proyectan estudios funcionales *in vitro* de variantes en *ABCC8* en pacientes con HIC para evaluar su potencial patógeno y su posible asociación con el fenotipo del paciente. Los estudios de función y expresión de *ABCC8* dise-

ñados se basan en diferentes técnicas y ensayos ya publicados^{7,11-15}. El primer paso es caracterizar las variantes de pérdida de función, que, por lo tanto, causarían HIC. Las técnicas incluyen ensayos para la evaluación de la actividad del canal, su biogénesis, procesamiento y tráfico, y/o su respuesta a ligando. Considerando la experiencia y disponibilidad en el laboratorio, se realizará un ensayo de salida de Rb^+ (⁸⁶Rb⁺ *efflux assay*)⁷ (respuesta metabólica), la técnica *patch-clamp*⁷ (respuesta a ligando del canal) y ensayos de quimioluminiscencia^{7,11} e inmunofluorescencia^{11,12} (expresión en superficie). Por último, si se predice que la variante candidata afectará al empalme de los exones (o *splicing*), se realizará un enfoque de *minigene* (o similar)^{13,14}. La figura muestra el esquema de estos estudios.

WES, análisis bioinformático, análisis de variantes y confirmación de variantes candidatas (objetivos 2 y 3). El ADN de los pacientes con HIC y de sus padres (cuando sea posible) se estudiará mediante WES (tríos familiares). Se extraerá el ADN de sangre periférica siguiendo protocolos comerciales. Se realizará un control de calidad y preparación de este ADN se-

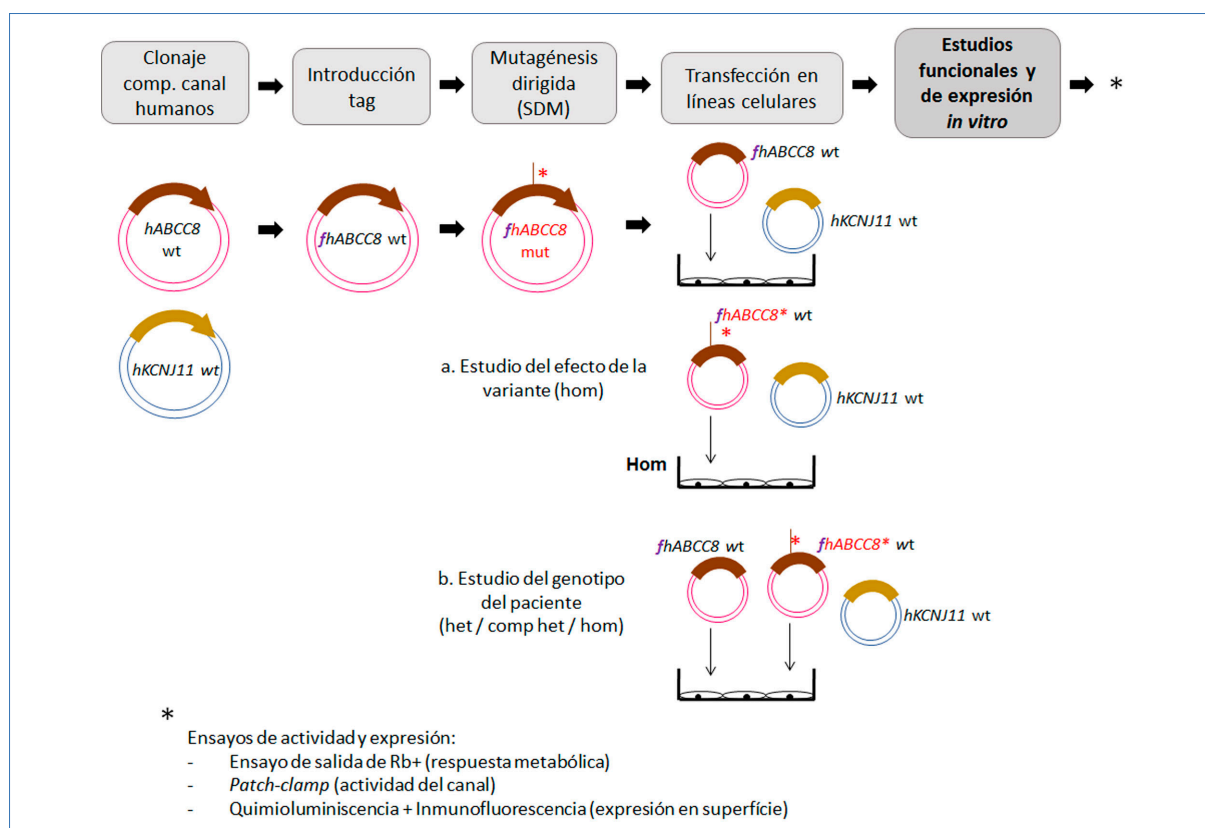


Figura. Pipeline de los estudios funcionales y de expresión de variantes en el gen *ABCC8*. Primero se introduce el gen humano en vectores de expresión animal, junto con una secuencia tag. Se realiza mutagenia dirigida y se transfectan transitoriamente líneas celulares con vectores que contienen las secuencias *ABCC8* y *KCNJ11* para poder expresar los canales K_{ATP} . a) Para el estudio del efecto de la variante se introduce la variante *ABCC8/SUR1* en las células. b) Para imitar el genotipo del paciente se introduce la variante de *ABCC8/SUR1* (estado homocigótico) o la variante y la secuencia WT *SUR1 (ABCC8)* (estado heterocigótico), o se introducen dos variantes diferentes (estado heterocigótico compuesto)¹¹. A partir de aquí se realizan los diferentes ensayos de actividad y expresión. comp het: heterocigoto compuesto; het: heterocigoto; hom: homocigoto.

gún protocolos estandarizados y se enviará a un centro de análisis genómico para preparar las bibliotecas de ADN, realizar WES y hacer un análisis bioinformático de los datos obtenidos. En el laboratorio, haremos el análisis de las variantes (MAF < 1%), con criterios adaptados a la búsqueda de variantes de datos WES. Este análisis de las variantes detectadas incluye: a) la comparación con bases de datos de variantes comunicadas (HGMD y ClinVar) y bases de datos de frecuencia poblacional (GnomAD, ExAC y 1.000 genomas); y b) la clasificación y evaluación de la patogenicidad de las variantes con *softwares* de análisis y predictores de patogenicidad y conservación *in silico* (Varsome, <https://varsome.com/>, etc.). Con esto, buscaremos variantes candidatas en otros genes que podrían explicar el fenotipo de estos pacientes. Por último, las variantes candidatas se confirmarán mediante secuenciación de Sanger.

- *Detección de nuevas variantes en pacientes con diagnóstico genético negativo (objetivo 2).* Un 45% de estos pacientes permanece sin diagnóstico genético. Estudiaremos exhaustivamente a 18 de estos pacientes por WES para identificar nuevos genes afectados que podrían estar relacionados con el HIC.
- *Determinar la posible existencia de variantes adicionales en genes de predisposición a diabetes (objetivo 3).* Pretendemos realizar un estudio exhaustivo de 20 pacientes con HIC (con variantes en *ABCC8*, no pancreatetectomizados)

por WES para identificar otros genes afectados que puedan explicar su evolución clínica. Filtraremos nuestras variantes por genes candidatos descritos en la bibliografía relacionados con HIC, diabetes e hiper/hipoglucemia.

Resultados preliminares y estado actual

Estudios genéticos e in silico. Como ya hemos comentado, hemos detectado variantes en el gen *ABCC8* en 28 pacientes con HIC, 22 de los cuales no están pancreatetectomizados. Los datos clínicos y genéticos de estos pacientes han sido publicados recientemente en un estudio donde también demostramos una correlación entre evolución a diabetes y la presencia de dos variantes en *ABCC8*⁸. También hemos realizado una extensa caracterización *in silico* de estas variantes genéticas en relación con su posible patogenicidad, conservación y estabilidad proteica⁸.

Estudios funcionales y de expresión. Hemos obtenido los dos vectores de SUR1/*ABCC8* y Kir6.2/*KCNJ11* humanos. Estamos realizando mutagenia dirigida y preparando los vectores para llevar a cabo las transfecciones celulares y los test de análisis. En la [figura](#) presentamos un esquema del *pipeline* del proceso. También hemos seleccionados 17 variantes (16 exónicas y 1 de *splicing*) para su estudio exhaustivo *in vitro*, que se presentan en la [tabla](#). Los criterios de elección no excluyentes han sido: a) que

Tabla. Variantes en el gen *ABCC8* seleccionadas para los estudios funcionales.

N.º de paciente ^a	Evolución clínica actual	Cambio en cDNA de <i>ABCC8</i> (NM_000352.6)	Cambio en aminoácido de SUR1 (NP_000343.2)	Predicción de patogenicidad (criterios del ACMG) ^b
1	Diabético	c.2797C>T	p.Arg933Ter	P
2	Diabético	c.3440T>G	p.Leu1147Arg	P
2	Diabético	c.3748C>T	p.Arg1250Ter	P
7	Diabético	c.4720G>A	p.Ala1574Thr	VUS
9	Diabético	c.2143delG	p.Val715TrpfsTer10	LP
9	Diabético	c.3388A>C	p.Thr1130Pro	P
10	Diabético	c.4078G>T	p.Val1360Leu	LP
11	Normoglucémico	c.674T>C	p.Leu225Pro	P
14	Normoglucémico	c.3641G>A	p.Arg1214Gln	P
16	Normoglucémico	c.4157_4159delCCT	p.Ser1386del	P
19	Normoglucémico	c.4238C>T	p.Pro1413Leu	P
21	Hipoglucémico	c.5C>T	p.Pro2Leu	VUS
21	Hipoglucémico	c.1220T>C	p.Leu407Pro	LP
25	Normoglucémico	c.1332+4C>T	-	VUS
26	Normoglucémico	c.2797C>T	p.Arg933Ter	P
28	Fallecido	c.946G>T	p.Gly316Trp	LP
-	-	c.2583C>G	p.Ile861Met	VUS

LP: variante potencialmente patogénica; P: variante patogénica; VUS: variante de significado incierto. ^a Los números corresponden a los de la publicación de Clemente et al⁸; ^b Revisión de los criterios del American College of Medical Genetics (ACMG) en la web Varsome (mayo de 2022).

la variante sea de significado incierto, o b) que no haya correlación de la clínica o la genética del paciente, y/o c) que sea una variante no publicada funcionalmente.

Estudios WES. Tenemos seleccionados a 18 pacientes con estudio genético negativo y 20 pacientes (no pancreatectomizados) con variantes en *ABCC8*. Estamos preparando sus muestras para enviar a secuenciación WES. También hemos hecho un estudio exhaustivo de genes candidatos relacionados con predisposición a diabetes.

Discusión

Este proyecto de investigación tiene un importante carácter traslacional para la clínica y podría contribuir a crear y establecer estudios funcionales para confirmar o rechazar variantes genéticas en *ABCC8* candidatas como causa del fenotipo de HIC en los pacientes. Desafortunadamente, a pesar de su importancia, hay muy poca información sobre estudios funcionales en el HIC. Además, la evolución clínica de nuestros pacientes *ABCC8*-HIC no pancreatectomizados muestra una variabilidad de origen poco claro y no hay suficiente evidencia notificada sobre la evolución natural a largo plazo de este tipo de pacientes. Se han propuesto algunos mecanismos patógenos para explicar su evolución a diabetes, pero creemos que un estudio exhaustivo de estos pacientes por secuenciación de nueva generación permitiría identificar otros genes afectados que puedan explicar su evolución clínica.

En cuanto a las limitaciones del estudio, queremos destacar que las estrategias utilizadas para los estudios funcionales, como la obtención de vectores específicos y su mutagenia, así como la optimización de las técnicas para la evaluación de la patogenicidad de las variantes, han sido muy costosas en tiempo. En cuanto a los estudios de exoma, hay una limitación inherente a este tipo de secuenciación, que es la imposibilidad de detectar variantes intrónicas profundas (*deep intronic*) y las situadas en zonas promotoras (de regulación).

En resumen, estos estudios genéticos exhaustivos de los pacientes y estudios funcionales de las variantes detectadas tendrían un impacto en el pronóstico y la terapéutica. De este modo, este proyecto de investigación será de gran interés, porque permitirá: a) explicar la evolución clínica de estos pacientes; b) establecer el diagnóstico clínico definitivo; c) orientar el tratamiento más adecuado; d) orientar un pronóstico; e) realizar un adecuado asesoramiento genético de los pacientes afectados y sus familiares; y f) establecer un protocolo *in vitro* para análisis de variantes genéticas en *ABCC8*.

Bibliografía

1. Güemes M, Hussain K. Hyperinsulinemic hypoglycemia. *Pediatr Clin North Am* 2015; 62: 107-36.
2. Martínez R, Fernández-Ramos C, Vela A, Velazco T, Aguayo A, Urrutia I, et al. Clinical and genetic characterization of congenital hyperinsulinism in Spain. *Eur J Endocrinol* 2016; 174: 717-26.
3. Kapoor RR, Flanagan SE, Arya VB, Shield JP, Ellard S, Hussain K. Clinical and molecular characterization of 300 patients with congenital hyperinsulinism. *Eur J Endocrinol* 2013; 168: 557-64.
4. Nessa A, Rahman SA, Hussain K. Hyperinsulinemic hypoglycemia - the molecular mechanisms. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2016; 7: 29.
5. Snider KE, Becker S, Boyajian L, Shyng SL, MacMullen C, Hughes N, et al. Genotype and phenotype correlations in 417 children with congenital hyperinsulinism. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: E355-63.
6. Galcheva S, Al-Khawaga S, Hussain K. Diagnosis and management of hyperinsulinaemic hypoglycaemia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2018; 32: 551-73.
7. Kandasamy B, Shyng SL. Methods for characterizing disease-associated ATP-sensitive potassium channel mutations. *Methods Mol Biol* 2018; 1684: 85-104.
8. Clemente M, Cobo P, Antolín M, Campos A, Yeste D, Tomasini R, et al. Genetics and natural history of non-pancreatectomized patients with congenital hyperinsulinism due to variants in *ABCC8*. *J Clin Endocrinol Metab*. 2023; [Epub ahead of print].
9. Salomon-Estebanez M, Flanagan SE, Ellard S, Rigby L, Bowden L, Mohamed Z, et al. Conservatively treated congenital hyperinsulinism (CHI) due to K-ATP channel gene mutations: Reducing severity over time. *Orphanet J Rare Dis* 2016; 11: 163.
10. Kassem SA, Ariel I, Thornton PS, Scheimberg I, Glaser B. β -Cell proliferation and apoptosis in the developing normal human pancreas and in hyperinsulinism of infancy. *Diabetes* 2000; 49: 1325-33.
11. Taschenberger G, Mougey A, Shen S, Lester LB, Lafranchi S, Shyng SL. Identification of a familial hyperinsulinism-causing mutation in the sulfonylurea receptor 1 that prevents normal trafficking and function of KATP channels. *J Biol Chem* 2002; 277: 17139-46.
12. MacMullen CM, Zhou Q, Snider KE, Tewson PH, Becker SA, Aziz AR, et al. Diazoxide-unresponsive congenital hyperinsulinism in children with dominant mutations of the β -cell sulfonylurea receptor SUR1. *Diabetes* 2011; 60: 1797-804.

13. Camats N, Pandey A V, Fernandez-Cancio M, Andaluz P, Janner M, Toran N, et al. Ten novel mutations in the NR5A1 gene cause disordered sex development in 46,XY and ovarian insufficiency in 46,XX individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: E1294-306.
14. Camats N, Pandey A V, Fernandez-Cancio M, Fernandez JM, Ortega AM, Udhane S, et al. STAR splicing mutations cause the severe phenotype of lipoid congenital adrenal hyperplasia: insights from a novel splice mutation and review of reported cases. *Clin Endocrinol* 2014; 80: 191-9.
15. Huopio H, Reimann F, Ashfield R, Komulainen J, Lenko HL, Rahier J, et al. Dominantly inherited hyperinsulinism caused by a mutation in the sulfonylurea receptor type 1. *J Clin Invest* 2000; 106: 897-906.

Beca en Investigación Clínica en Endocrinología Pediátrica 2022 de la F.S.E.E.P

Inteligencia artificial, epigenética y predicción de la obesidad infantil

Judit Bassols¹, Ariadna Gómez-Vilarrubla¹, Marina Rodríguez², Marta Díaz³, Lourdes Ibáñez³, Beatriz López², Abel López-Bermejo^{4,5}

¹ Grupo de Investigación Metabólica Materno-Fetal. Instituto de Investigación Biomédica de Girona (IDIBGI), Girona. ² Grupo de Investigación en Ingeniería de Control y Sistemas. Universidad de Girona, Girona. ³ Departamento de Endocrinología Pediátrica. Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona. ⁴ Grupo de Investigación Obesidad y Riesgo Cardiovascular en Pediatría. Instituto de Investigación Biomédica de Girona (IDIBGI), Girona. ⁵ Departamento de Pediatría. Hospital Dr. Josep Trueta, Girona.

Introducción

La obesidad infantil es un problema importante de salud pública que afecta a millones de niños en todo el mundo y que supone una amenaza para el sistema de salud actual y futuro. Además de tener mayor riesgo de obesidad persistente en la edad adulta, los niños obesos tienen menor calidad de vida relacionada con la salud y mayor riesgo de padecer trastornos cardiometabólicos y diversas enfermedades crónicas de aparición tardía, como hipertensión, diabetes de tipo 2, enfermedad coronaria y algunos tipos de cáncer¹. En este con-

texto, la identificación temprana de la población con riesgo de sufrir sobrepeso/obesidad y trastornos cardiometabólicos puede ayudar a diseñar estrategias de intervención para reducir la carga de enfermedad en el sistema nacional de salud.

Hasta hace poco, se consideraba que la obesidad era consecuencia de exposiciones conductuales poco saludables, como la inactividad física y el consumo excesivo de energía. Sin embargo, a pesar de la mayor conciencia de estos factores de riesgo conductuales, las tasas de obesidad continuaron aumentando en todo el mundo durante las últimas décadas. Hoy en día, la obesidad se considera una condición multifactorial provocada por la compleja interacción entre factores genéticos y ambientales². La evidencia acumulada sugiere que el sobrepeso/obesidad en los niños está influenciado por el entorno intrauterino, lo que se conoce como programación fetal³. Los mecanismos que subyacen a estas asociaciones aún se desconocen. Sin embargo, la creciente evidencia de estudios en animales y humanos respalda que las exposiciones en el útero están asociadas con modificaciones epigenéticas, como la metilación del ADN, que, a su vez, puede alterar la capacidad transcripcional de genes importantes en el metabolismo⁴.

La epigenética es un mecanismo molecular que media la interacción entre los factores de comportamiento/estilo de vida y la genética, al adaptar el genoma a las exposiciones ambientales⁵. Las principales modificaciones epigenéticas son cambios en la metilación del ADN en los sitios de citosina-

fosfato-guanina (CpG). Este mecanismo es bastante estable; por lo tanto, podría mejorar la precisión diagnóstica, la predicción pronóstica y convertirse en potenciales objetivos farmacológicos⁶. La relación entre los mecanismos epigenéticos, especialmente la metilación del ADN, y la obesidad está emergiendo como un nuevo campo con potenciales implicaciones clínicas⁷. Varios rasgos maternos, estilo de vida o morbilidades durante el embarazo y durante los primeros años de vida, incluido el índice de masa corporal (IMC) materno, el tabaquismo materno, la dieta materna, la actividad física materna, el peso al nacer para la edad gestacional y la duración de la lactancia materna, se han asociado con variaciones en la metilación del ADN⁸.

Dada la complejidad de la obesidad, especialmente durante el período infantil, con una gran cantidad de factores que interactúan de manera enrevesada, los métodos estadísticos tradicionales (como los modelos generales lineales) muestran limitaciones importantes, ya que se basan en análisis de un número reducido de variables con un bajo poder predictivo. Las técnicas de inteligencia artificial (IA) son herramientas de modelado especialmente dotadas para este tipo de conjunto de datos, que suelen tener una naturaleza altamente dimensional, heterogéneas y con relaciones complejas entre muchas variables multidominio. Por lo tanto, la capacidad predictiva, la facilidad de aplicación y la solidez de estos modelos para datos complejos ofrecen alternativas a los modelos estadísticos tradicionales⁹. La IA, como parte de la informática, utiliza algoritmos para permitir que los ordenadores realicen funciones ejecutivas tradicionalmente 'humanas', como la resolución de problemas y la toma de decisiones. El aprendizaje automático (*machine learning*), una subdisciplina de la IA, muestra un gran potencial en el ámbito de la sanidad y ha demostrado ser particularmente adecuado para campos médicos ricos en datos, como la genómica y la epigenética¹⁰.

Objetivos

Los objetivos del presente trabajo son: a) identificar marcas de metilación del ADN en la placenta que confieren susceptibilidad o protección contra el sobrepeso y la obesidad en la descendencia a los 6 años de edad; y b) desarrollar estrategias para el diagnóstico y pronóstico de la obesidad infantil basadas en técnicas de IA.

Metodología

Se han utilizado datos de dos cohortes prenatales de base poblacional que reclutaron mujeres embarazadas en la provincia de Girona (Hospital de Figueras y Hospital Dr. Josep Trueta) y Barcelona

(Hospital Sant Joan de Déu). Se incluyó a las madres durante el embarazo y se siguió a los recién nacidos desde el nacimiento hasta los 6 años. Los requisitos de elegibilidad eran etnia caucásica y embarazo único. Se determinaron variables clínicas y ambientales, del padre y de la madre, previas al embarazo, de la madre durante el embarazo, y de los hijos en el nacimiento, entre los 1 y los 12 meses, y a los 6 años de edad.

Se obtuvieron muestras de placenta en el nacimiento para el análisis del perfil de metilación mediante *microarray* ($n = 24$ placentas). Las CpG diferencialmente metiladas y asociadas con el índice de masa corporal (IMC-SDS) del niño se validaron mediante pirosecuenciación ($n = 153$ placentas) y se determinó su expresión génica mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa ($n = 153$ placentas).

Se utilizó la técnica de IA llamada Random Forest para determinar la importancia relativa de las variables de estudio y predecir la obesidad de los niños a los 6 años de edad. Para ello se usaron cuatro modelos, en los cuales se introdujeron las variables de estudio de manera consecutiva: modelo 1: variables pregestacionales (edad, talla, IMC, consumo de tabaco y alcohol, paridad, y peso en el nacimiento del padre y de la madre); modelo 2: modelo 1 + variables gestacionales (IMC, tensión arterial, obesidad gestacional, y consumo de tabaco y alcohol durante el embarazo); modelo 3: modelo 2 + variables en el nacimiento (sexo, peso, talla y peso de la placenta); y modelo 4: modelo 3 + variables durante el primer año de vida (peso y talla del niño a los 4, 6 y 12 meses, y lactancia materna).

Resultados

Los sujetos de estudio eran niños aparentemente sanos, de ambos sexos (50%, niñas), etnia caucásica y nacidos a término (edad gestacional: $40 \pm 1,2$ semanas). Todos los niños presentaban parámetros antropométricos y analíticos dentro de los rangos de normalidad (valores de SDS entre -1 y $+1$), tanto en el nacimiento como en el seguimiento. A los 6 años, un 17% de los niños presentó sobrepeso/obesidad.

El *array* de metilación mostró 1.397 CpG asociadas con el IMC-SDS de los niños a los 6 años de edad, de las cuales 23 presentaban anotación génica de interés metabólico, y se seleccionaron cuatro que anotaban por los genes *IRS1*, *ASPG*, *NPR1* y *CCDC3* para su validación. Para el gen *IRS1*, que está implicado en la vía de señalización de la insulina, se observó una asociación positiva entre la metilación de *IRS1* y el IMC-SDS a los 6 años de edad. Para el gen *ASPG*, que está implicado en el catabo-

lismo de los lípidos, la metilación de ASPG presentó asociaciones positivas con el incremento de peso desde el nacimiento hasta los 6 años de edad (Δ peso). Para el gen *NPR1*, que es importante para la homeostasis cardiovascular, su expresión placentaria se asoció positivamente con la presión arterial sistólica. Para el gen *CCDC3*, que está implicado en la deposición de la grasa, la metilación de *CCDC3* se asoció con menores niveles de colesterol de lipoproteínas de alta densidad en la descendencia.

Los modelos de IA mostraron que las variables pregestacionales más importantes para predecir la obesidad infantil fueron el IMC y la talla del padre, seguidos del IMC, la talla de la madre y la edad de ambos progenitores (modelo 1). Cuando se incluyeron variables gestacionales, la variable más importante continuó siendo el IMC del padre, la talla del padre y de la madre, y el IMC de la madre durante el embarazo (segundo y tercer trimestres), seguidos de la tensión arterial durante el embarazo (segundo y tercer trimestres) y el IMC pregestacional de la madre (modelo 2). Cuando se incluyeron variables en el nacimiento, la variable más importante continuó siendo el IMC del padre, a continuación, el peso del niño al nacer y el IMC pregestacional de la madre, seguidos de la tensión arterial y el IMC durante el embarazo. Finalmente, cuando se incluyeron variables durante el primer año de vida, la variable más importante continuó siendo el IMC del padre, a continuación los pesos del niño a los 12 y 4 meses, seguidos de la tensión arterial y el IMC durante el embarazo (modelo 4).

Discusión y conclusiones

Para prevenir la obesidad infantil es de gran utilidad el conocimiento de marcadores predictivos para identificar los potenciales individuos con alto riesgo. Esto permite enfocar las medidas preventivas hacia esta subpoblación de alto riesgo, lo que permite un enfoque más rentable y personalizado de las intervenciones que se realizan. El uso de estos marcadores en modelos predictivos de IA permite, mediante su análisis, jerarquizar los diferentes factores de riesgo por orden de importancia, de manera que podamos identificar los que serían más efectivos para diseñar intervenciones específicas.

Los resultados de este proyecto muestran que la metilación y/o la expresión de los genes *IRS1*, *ASPG*, *NPR1* y *CCDC3* en la placenta se asocian con distintos parámetros de riesgo cardiometabólico y obesidad (IMC-SDS, Δ peso, colesterol de lipoproteínas de alta densidad y presión arterial sistólica) en los niños a los 6 años de edad y podrían ser nuevos marcadores para identificar población pediátrica con alto riesgo.

Los modelos de IA utilizados muestran que los IMC de los progenitores, sobre todo el IMC del padre, son las variables más importantes para predecir la obesidad infantil a través del modelo Random Forest. Durante el embarazo, el IMC y la tensión arterial de la madre son variables también importantes. En el nacimiento, el peso del niño también tiene importancia, aunque al primer año de vida ganan importancia los pesos a los 12 y 4 meses. Otras características, como el consumo de tabaco y alcohol, la paridad, la edad gestacional, el sexo o el peso placenta, parece que tienen poca importancia. Eso podría deberse a que la cohorte de estudio es una cohorte poblacional con representación equitativa de ambos sexos, padres con bajas tasas de tabaquismo y alcohol, niños nacidos a término, y con pesos y tallas dentro de los rangos de normalidad.

Estos resultados preliminares son la base para futuras investigaciones en las que se prevé: a) validar los resultados obtenidos en otras cohortes; b) añadir las variables epigenéticas a los modelos Random Forest para estudiar su importancia y posible utilidad en la predicción de la obesidad infantil; y c) diseñar un algoritmo/aplicación para la predicción de la obesidad infantil en etapas precoces de la vida.

Bibliografía

1. Dixon JB. The effect of obesity on health outcomes. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 316: 104-8.
2. González-Muniesa P, Martínez-González MA, Hu FB, Després JP, Matsuzawa Y, Loos RJF, et al. Obesity. *Nat Rev Dis Primers* 2017; 3: 17034.
3. Davey Smith G, Steer C, Leary S, Ness A. Is there an intrauterine influence on obesity? Evidence from parent child associations in the Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC). *Arch Dis Child* 2007; 92: 876-80.
4. Sharp GC, Lawlor DA, Richmond RC, Fraser A, Simpkin A, Suderman M, et al. Maternal pre-pregnancy BMI and gestational weight gain, offspring DNA methylation and later offspring adiposity: findings from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Int J Epidemiol* 2015; 44: 1288-304.
5. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 2003; 33 (Suppl): S245-54.
6. Inbar-Feigenberg M, Choufani S, Butcher DT, Roifman M, Weksberg R. Basic concepts of epigenetics. *Fertil Steril* 2013; 99: 607-15.
7. Lima RS, de Assis Silva Gomes J, Moreira PR. An overview about DNA methylation in childhood obesity: characteristics of the studies and main findings. *J Cell Biochem* 2020; 121: 3042-57.

8. Herbstman JB, Wang S, Perera FP, Lederman SA, Vishnevetsky J, Rundle AG, et al. Predictors and consequences of global DNA methylation in cord blood and at three years. *PLoS One* 2013; 8: e72824.
9. Colmenarejo G. Machine learning models to predict childhood and adolescent obesity: a review. *Nutrients* 2020; 12: 2466.
10. Rauschert S, Raubenheimer K, Melton PE, Huang RC. Machine learning and clinical epigenetics: a review of challenges for diagnosis

Beca Proyecto de Investigación Clínica Gabriela Morreale 2021 de la F.S.E.E.P

Rasopatías, genética molecular y su relación con las alteraciones endocrinológicas y antropométricas en pacientes de Castilla y León

Pablo Prieto-Matos^{1,2,3}, María Pilar Bahillo-Currieses⁴, Laura Regueras-Martín^{1,5}, Jesús Lacal^{2,6}

¹ Departamento de Ciencias Biomédicas y del Diagnóstico. Universidad de Salamanca, Salamanca. España. ² Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Salamanca. España. ³ Servicio de Pediatría. Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca. España. ⁴ Servicio de Pediatría. Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Valladolid. España. ⁵ Servicio de Pediatría. Hospital Universitario de León, León. España. ⁶ Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca, Salamanca. España.

Introducción

Las rasopatías son enfermedades genéticas raras que presentan desafíos clínicos y moleculares en su identificación y caracterización. Estas enfermedades tienen una prevalencia superior a 1 de cada 1.000 recién nacidos y actualmente no tienen cura. Se ha determinado que las rasopatías están asociadas con alteraciones en la vía de señalización RAS-MAPK, que desempeña un papel importante en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular¹.

Existen múltiples tipos de rasopatías, incluyendo la neurofibromatosis de tipo 1, la neurofibromatosis de tipo Noonan-like, el síndrome de Legius, el síndrome de Noonan clásico, el síndrome de Noonan con lentigos múltiples, el síndrome de Noonan con ca-

bello anágeno, el síndrome de Noonan con o sin leucemia mielomonocítica juvenil, el síndrome de Costello y el síndrome cardiofaciocutáneo. Estas enfermedades se caracterizan por una amplia variedad de síntomas y signos clínicos, que incluyen alteraciones en el desarrollo neurológico, trastornos cardiovasculares, anomalías musculoesqueléticas, mayor incidencia de cáncer y alteraciones endocrinológicas. Una de las manifestaciones endocrinas más comunes es la baja estatura, que puede ser un signo temprano de la enfermedad desde la infancia. También se han descrito otras alteraciones endocrinológicas en las rasopatías, como hipotiroidismo y criptorquidia. Comprender la fisiopatología subyacente de estas alteraciones es esencial para el diagnóstico, el manejo clínico y el desarrollo de terapias específicas.

Hasta ahora se han identificado más de 20 genes involucrados en la patogenia de las rasopatías², y destacan los genes *NF1* en la neurofibromatosis de tipo 1, y *PTPN11* y *SOS1* en el síndrome de Noonan. En general, se ha observado que las variantes que activan la vía RAS-MAPK son responsables de las rasopatías, pero también hay variantes en las que no se conoce su efecto en la vía y cómo podrían causar síntomas clínicos en los pacientes afectados.

A pesar de que se han realizado numerosos estudios para investigar la patogenia de estas enfermedades, aún queda mucho por descubrir en la correlación genotipo-fenotipo y en la biología molecular subyacente. Hasta ahora, sólo se ha logrado describir esta correlación en pocos genes y variantes genéticas de las rasopatías. Por lo tanto, es fundamental investigar el perfil mutacional de los genes implicados en estas enfermedades para comprender mejor la correlación genotipo-fenotipo y la biología molecular, con el objetivo de mejorar el diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento.

Objetivos

En este trabajo nos planteamos la descripción de los pacientes pediátricos con rasopatías de Castilla y León. Esto lo hemos planteado con un triple objetivo: describirlos desde un punto de vista clínico, centrándonos en los síntomas endocrinológicos; posteriormente, describir sus variantes genéticas y realizar estudios *in silico* para conocer la patogenicidad; y, por último, hemos realizado estudios funcionales de algunas de las variantes para conocer nuestra capacidad de realizar estos estudios y establecer la patogenicidad de alguna de las variantes de significado incierto para investigar su efecto en la vía RAS-MAPK.

Resultados

El estudio realizado consistió en una investigación que analizó las características clínicas y genéticas, y la realización de estudios funcionales de una cohorte de pacientes con rasopatía de Castilla y León. La cohorte incluyó a pacientes con variantes de neurofibromatosis con los diagnósticos de neurofibromatosis de tipo 1, neurofibromatosis de tipo Noonan-like y síndrome de Legius, así como a pacientes con diferentes tipos del síndrome de Noonan, como el síndrome de Noonan clásico, el síndrome de Noonan con pelo anágeno, con leucemia mielomonocítica juvenil y otros. Para establecer la patogenicidad de las variantes hemos realizado estudios bioinformáticos de las variantes y hemos consultado bases de datos como ClinVar, VarSome, COSMIC, HGMD y NSeuroNet, basándonos en las directrices del American College of Medical Genetics and Genomics. Por último, hemos seleccionado las variantes más significativas y las hemos reproducido en el laboratorio mediante ingeniería genética.

En total, incluimos a 108 pacientes diagnosticados con rasopatía, con una edad media de 9,4 años y una mayoría de pacientes varones. El estudio de secuenciación genética reveló variantes en 13 genes asociados con rasopatías. Las variantes más comunes se encontraron en los genes *NF1* y *PTPN11*, y el gen *SOS1* fue el tercero en frecuencia con mucha diferencia respecto de los otros dos. La mayoría de las variantes eran del tipo *missense*, seguidas de las variantes de *splicing*, sin sentido y *frameshift*.

En el gen *PTPN11*, todas las variantes, menos una, eran *missense* y tendían a estar en los mismos exones, con variantes que se repiten con bastante frecuencia. Por el contrario, el gen *NF1* presentaba variantes de todos los tipos y distribuidas a lo largo de todo el gen.

El análisis de estas variantes determinó que el 90,8% eran patógenas o probablemente patógenas, mientras que el 9,2% eran de significado incierto según las recomendaciones del American College of Medical Genetics and Genomics. La variante en *PTPN11* que era *inframe* presentaba resultados contradictorios, entre benigna y patógena según las bases de datos consultadas; sin embargo, la secuencia resultante de la variante determinaba el fin del intrón y, por tanto, su procesamiento y eliminación, y sugería que el intrón debería procesarse y eliminarse sin manifestarse alteración alguna en la proteína, razón por la que la consideramos de significado incierto.

Las características clínicas más comunes observadas en la cohorte fueron las alteraciones endocrinológicas, presentes en el 64,8% de los pacientes. Las cardiopatías afectaron al 35% de los pacientes, y un 26,2% presentó algún tipo de alteración oncológica, como gliomas, astrocitomas, leucemia, rabdomiomas y múltiples lesiones hamartomatosas. Las alteraciones endocrinológicas más destacadas fueron la talla baja (45,4%) y el hipotiroidismo (16,1%). Además, el 17,6% de los pacientes varones presentó criptorquidia.

Al analizar las diferencias entre las neurofibromatosis y sus variantes, y el síndrome de Noonan y sus variantes, se encontró que las alteraciones endocrinológicas eran significativamente más frecuentes en el síndrome de Noonan, mientras que las alteraciones oncológicas eran más comunes en las neurofibromatosis. En cuanto a la antropometría, los pacientes con síndrome de Noonan presentaron una mayor prevalencia de talla baja, peso alterado e índice de masa corporal alterado en comparación con los pacientes con neurofibromatosis.

En el laboratorio se realizaron experimentos para analizar nuestra capacidad de generar variantes genéticas. Se seleccionaron variantes de los genes *NF1*, *SPRED1* y *PTPN11* identificadas en nuestros pacientes, y otras publicadas en la bibliografía, y se reprodujeron en plásmidos de clonación mediante ingeniería genética. Estas variantes se introdujeron en líneas celulares HEK293T a través de lentivirus generados en el laboratorio. Las células infectadas expresaron las variantes genéticas y se estudió su papel en la interacción con otras proteínas y en las rutas de señalización.

Discusión

En este estudio se examinaron las características clínicas y genéticas de pacientes con rasopatía, incluyendo la neurofibromatosis de tipo 1 y sus variantes y el síndrome de Noonan y sus variantes, todos con estudio genético alterado. Los resultados

obtenidos proporcionaron información relevante sobre la variabilidad genética de estos síndromes y las manifestaciones clínicas asociadas. Se observó una similitud en la distribución de genes en el síndrome de Noonan con estudios previos³, y destacó el gen *PTPN11* como el más frecuente. Sin embargo, se identificaron también otras variantes en diferentes genes en esta cohorte de pacientes. En el grupo de neurofibromatosis, un grupo no despreciable presentaba síntomas de neurofibromatosis de tipo Noonan-*likem*, y describimos dos pacientes con síndrome de Legius.

Aunque en el gen *NF1*, cuando se recogen muestras muy amplias, se empiezan a describir *hotspots*⁴, en nuestra muestra no era así, y las variantes estaban a lo largo de todo el gen y presentaban todos los tipos de variantes. Por el contrario, *PTPN11* es un gen en el que casi todas las variantes se encontraban en los mismos exones, mientras que otros exones (como el 5) no presentaban ninguna variante, como se describe en otros estudios^{5,6}. En el conjunto de todos los genes de nuestra muestra, el 10% son variantes de significado incierto, lo que resalta la necesidad de realizar estudios funcionales.

En cuanto a las características clínicas, se observó una alta prevalencia de alteraciones endocrinológicas, especialmente talla baja (45,4%) y alteraciones hipotiroideas (17,6%). Es destacable el porcentaje de hipotiroidismo respecto a lo publicado^{7,8}, pero esto puede deberse a la definición que hemos utilizado en nuestro trabajo (tirotropina > 5 mUI/L). También se encontró una alta prevalencia de cardiopatías y alteraciones oncológicas en esta cohorte de pacientes.

Se observaron diferencias fenotípicas entre los diferentes subtipos de rasopatías, con mayor frecuencia de alteraciones endocrinológicas en el síndrome de Noonan y mayor frecuencia de alteraciones oncológicas en la neurofibromatosis.

Finalmente, se llevó a cabo un estudio en el laboratorio para generar variantes genéticas a partir de pacientes afectados de rasopatía. Se logró reproducir las variantes en el laboratorio y generar líneas celulares que las expresaran. Esto permitirá estudiar el papel de estas variantes en la función de las proteínas y en las rutas de señalización celular.

Conclusiones

En resumen, este estudio proporciona una visión integral de las características clínicas y genéticas de los pacientes con rasopatía de Castilla y León, con datos muy similares a los de otras muestras y con diferencias claras entre los pacientes con neurofi-

bromatosis de tipo 1 y síndrome de Noonan. Los resultados destacan la diversidad de variantes genéticas asociadas con estas enfermedades y las diferencias en las manifestaciones clínicas entre los distintos subtipos. El estudio demuestra nuestra capacidad de generar variantes genéticas en el laboratorio a partir de pacientes con rasopatía. Las líneas celulares proporcionan una herramienta valiosa para investigar el papel de las variantes genéticas en la patogenia de la rasopatía y para estudiar la interacción de las proteínas mutadas con otros componentes celulares y vías de señalización.

Bibliografía

1. Liao J, Mehta L. Molecular genetics of Noonan syndrome and RASopathies. *Pediatr Endocrinol Rev* 2019; 16 (Suppl 2): S435-46.
2. Montero-Bullón JF, González-Velasco Ó, Isidoro-García M, Lacal J. Integrated in silico MS-based phosphoproteomics and network enrichment analysis of RASopathy proteins. *Orphanet J Rare Dis* 2021; 16: 303.
3. Roberts AE. Noonan syndrome. 2001 Nov 15 [Updated 2022 Feb 17]. In Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2023. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1124/>.
4. Lois S, Báez-Flores J, Isidoro-García M, Lacal J, Triviño JC. Identification of germinal neurofibromin hotspots. *Biomedicine* 2022; 10: 2044.
5. Athota JP, Bhat M, Nampoothiri S, Gowrishankar K, Narayanachar SG, Puttamalles V, et al. Molecular and clinical studies in 107 Noonan syndrome affected individuals with *PTPN11* mutations. *BMC Med Genet* 2020; 21: 50.
6. Santomé Collazo JL, Carcavilla Urquí A, Muñoz Pacheco R, Ezquieta Zubizaray B. Estudio molecular de las formas familiares del síndrome de Noonan. *Rev Esp Endocrinol Pediatr* 2012; 3: 37-6.
7. Quaio CRDC, Carvalho JF, da Silva CA, Bueno C, Brasil AS, Pereira AC, et al. Autoimmune disease and multiple autoantibodies in 42 patients with RASopathies. *Am J Med Genet A* 2012; 158A: 1077-82.
8. Sharland M, Burch M, McKenna WM, Paton MA. A clinical study of Noonan syndrome. *Arch Dis Child* 1992; 67: 178-83.

Miembro Honorífico de la SEEP: Prof. Dra. Ana Claudia Latrónico

Honorary Member of the S.E.E.P: Prof. Dra. Ana Claudia Latrónico

Nombramiento de la Prof. Dra. Ana Claudia Latrónico de la Universidad de São Paulo (Brasil), como Miembro Honorífico de la Sociedad Española de Endocrinología Pediátrica (S.E.E.P).

La Prof. Dra. Latrónico tiene una trayectoria curricular extraordinaria y ha mantenido una estrecha colaboración a nivel docente y científico con la S.E.E.P; destacando su participación en la investigación de las bases moleculares de la Pubertad Precoz.



*Momento del reconocimiento como Miembro Honorífico de la S.E.E.P, en el marco del 45 Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología Pediátrica celebrado en Palma (10-12 mayo, 2023), a la Prof. Dra. Ana Claudia Latrónico, con la Presidenta de la S.E.E.P. Dra. Itxaso Rica y el Prof. Dr. Jesús Argente.