

## CANALOPATIILE DE CLOR – INTERFERENȚE ÎNTRE BOLILE GENETICE: DATE ACTUALE PORNIND DE LA OBSERVAȚIA UNUI CAZ CLINIC

### CHLORIDE CHANNELOPATHIES - INTERFERENCIES BETWEEN GENETIC DISEASES: RECENT SCIENTIFIC DATA STARTING FROM A CLINICAL OBSERVATION

Șef lucr.dr. *Laura Larisa Dracea*

Facultatea de Medicină, Univ. Transilvania Brașov,  
Spitalul Clinic de Copii Brașov, Centrul Regional de Mucoviscidoză Brașov  
dracea.laura@yahoo.com

#### Abstract

The clinical observation that led to the writing of this article was the encounter of two genetic diseases, Cystic Fibrosis and Juvenile Myoclonic Epilepsy, two chloride channelopathies, in the same patient.

This represented the reason why I considered important to briefly describe the main scientific data available at the moment regarding chloride channelopathies in correlation with the observations made in the patient with both diseases.

Cystic Fibrosis was first described in 1938 and the affected gene was cloned in 1989. Since then, research and multidisciplinary care improved the life span and quality of life of patients.

Myoclonic Juvenile Epilepsy was described in 1957 and since then a lot of genetic research clarified the transmission of disease.

The chloride channelopathies were more intensely studied after the 1990's after the discovery of CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) and CIC-1 gene (cause of congenital myotonia).

**Key words:** channelopathies, cystic fibrosis, juvenile myoclonic epilepsy, chloride

Observația clinică ce a dus la redactarea acestui articol a pornit de la diagnosticarea a 2 boli genetice, Fibroza Chistică (FC) și Epilepsia Mioclonică Juvenilă (EMJ), două canalopatii de clor la același pacient.

Din acest motiv am considerat oportună descrierea sumară a datelor din literatura de specialitate existente în momentul de față despre canalopatii în general și despre canalopatiile de clor în special, în corelație cu observațiile clinice despre pacientul cu ambele afecțiuni.

Fibroza Chistică a fost descrisă în 1938 și gena cauzatoare a fost clonată în 1989. Din acel moment cercetarea medicală alături de îngrijirea multidisciplinară au îmbunătățit speranța de viață și calitatea vieții pacienților.

Epilepsia Mioclonică Juvenilă a fost descrisă în 1957 și de atunci o serie de cercetări genetice au clarificat modalitatea de transmitere a acesteia.

Canalopatiile de clor au fost studiate mai

mult după anii 1990, după descoperirea CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) și a genei miotoniei congenitale, CIC-1.

#### Scurt istoric al canalopatiilor de clor: deschiderea drumului cercetărilor viitoare

Primul canal ionic a fost clonat în 1982 și de atunci evoluția biologiei moleculare și a geneticii a dus la descoperirea multor alte gene pentru canalele ionice. [2, 6]

În anii 1960 și 1970 Shirley Bryant a stabilit că miotonia congenitală are legătură cu un defect în conductanța musculaturii scheletice astfel încât fibrele musculare miotonice au o rezistență membranară și o conductanță scăzută a clorului (fibrele musculare normale se comportă în mediu deprivat de clor ca fibre miotonice, sunt hiperexcitabile și descarcă potențiale electrice spontan). Thomas Jentsch clonează gena CIC-1 în 1990. [3, 4]

Fibroza Chistică descrisă ca afecțiune letală în 1938 de Dorothy Anderson și considerată în 1953 o disfuncție electrolitică din cauza faptului că sudoarea pacienților afectați era neobișnuit de sărată, abia după 35 de ani de cercetare medicală este recunoscută ca o canalopatie de clor [5].

Gena care codifică un canal de clor AMP-c activat - CFTR, clonată pozițional în 1989, stă la baza modificărilor clinice atât de variate din FC, în care căile aeriene au o permeabilitate foarte scăzută la clor. Aceasta face ca lichidul de suprafață de la nivelul epiteliului căilor aeriene să fie prea puțin hidratat și să promoveze infecția respiratorie ce va duce la boala cronică pulmonară.

Mecanismele prin care CFTR-ul afectat produce boala pulmonară în FC sunt complexe și includ disfuncția glandelor submucoase, un răspuns imun anormal, volum și compoziție anormală a lichidului de suprafață al căilor aeriene, acidifiere anormală a organitelor celulare. Toate acestea se traduc de fapt printr-o deficiență imună la nivel pulmonar împotriva microorganismelor inhalate. Mai mult decât atât, CFTR-ul însuși este reglator al altor canale ionice și transportori ionici (canale epiteliale ENaC ce joacă un rol primordial în reabsorbția sodiului).

### **Canalopatiile: date generale**

Canalopatiile în ansamblu se referă la afecțiuni care rezultă în urma tulburărilor în funcția și expresia canalelor ionice.

Canalele ionice realizează căile (porii) pentru difuziunea pasivă a ionilor de-a lungul membranelor celulare. Deseori acestea sunt înalt selective pentru anumiți ioni, acest fapt ducând la clasificarea actuală în canale de sodiu, de potasiu, de calciu, de clor și canale nespecifice cationice. Direcția transportului ionic asociată cu un curent electric depinde de gradientul electrochimic pentru fiecare ion în parte [7]. Gradientele electrochimice se stabilesc printr-o interacțiune între pompe active ionice, co-transportori și canalele ionice în sine. Astfel, canalele ionice se pot închide și deschide (fenomenul de "gating"), ceea ce le va permite diferite tipuri de reglare.

Pentru a înțelege mai bine modalitatea de funcționare a canalelor ionice și cum se reprezintă în plan fenotipic tulburările acestora,

trebuie precizat că reglarea canalelor ionice se face după natura procesului de „gating”: canale activate postsinaptic sau canale de receptori de glutamat GABA, canale activate de diferențe de potențial (voltaj), de tumefiere sau extensie sau chiar de diferențe de temperatură (cald-frig).

Pe lângă aceasta, canalele ionice pot fi activate și funcționarea lor poate fi indusă de calciu, pH, fosforilare și lipide.

Canalele ionice sunt situate în membranele plasmatică dar și în membranele organelor intracelulare ca reticulul endoplasmatic, endozomi, lizozomi și mitocondrii.

Dintre toate funcțiunile canalelor ionice, cele mai bine cunoscute sunt cele de generare ale curenților electrici (care stau la baza semnalărilor neuronale). Pe lângă acestea, un rol crucial îl au în transportul transepitelial de apă și sare, în reglarea volumului celular și pH-ului, în acidifierea organelor intracelulare și în semnalarea chimică (canale de calciu).

Cu toate că cea mai mare parte din afecțiunile canalelor ionice afectează sistemul neuromuscular (ataxia, epilepsia, aritmiile cardiace, miotonia), unele canalopatii pot afecta și alte organe.

Defectele în transportul transepitelial stau la baza modificărilor clinice din fibroza chistică și o parte din formele de sindrom Barter; unele mutații în canalele de potasiu afectează secreția de insulină, iar alte mutații în canalele de clor din lizozomi și endozomi duc la litiaza renală sau osteopetroza.

Mutațiile în genele canalelor ionice pot duce la pierderea sau câștigarea unei funcții ale canalului respectiv. Mutațiile prin care se pierde funcția duc deseori la boli transmise recesiv – cum este cazul fibrozei chistice în care există mutații în gena CFTR [8] sau în sindromul Barter – mutații în gena CLCNKB [9, 10].

Datorită faptului că aceste canale ionice sunt complexe multimerice, o anumită pierdere a funcției datorate unei mutații poate da naștere mutațiilor dominante - negative (vor reduce funcția canalului sub nivelul de 50% așteptat din partea unor proteine care nu interacționează la pacienții heterozigoți). Pacienții cu mutații recesive (în stare homozigotă) vor fi mai sever afectați decât heterozigoții cu mutații dominante.

Numărul canalopatiilor cunoscute a crescut considerabil în ultimii ani, iar genele

cauzatoare ale bolilor ce au rezultat din disfuncțiile canalelor ionice au fost identificate prin diferite tehnici genetice cum sunt: clonarea pozițională, abordări ale genelor candidate, clonare pozițională a genelor candidate sau pe baza fenotipurilor obținute din modelele de șoareci "knockout" (șoareci experimentali în care se inactivează o genă existentă și este înlocuită cu un fragment artificial de ADN).

În tabelele următoare (tabele 1-3) sunt listate canalopatiile de clor, genele implicate și funcțiile acestora.

Boli umane	Proteina/genă	Funcție defectivă
Sidrom Anderman	KCC3 / SLC12A6	Dezvoltare neuronală
Sindrom Bartter Tip I	NKCC /SLC12A1	Balanța de sare renală
Sindrom Bartter Tip III	CIC-Kb /CLCNKB	Balanța de sare renală
Sindrom Bartter Tip IV cu surditate	Barttin /BSND	Pierderea de sare renală, secreția endolimfei
Diareea congenitală clorat	SLC26A3	Secreția fluidului intestinal

Tabelul 1

Fibroza Chistică	CFTR	Infecția cronică endobronșică
Surditate	KCC4 / SLC12A7	Reciclarea potasiului
Boala Dent	CIC-5 / CLCN5	Acidifierea endozomală
Acidoza tubulară renală distală	AE1 / SLC4A1	Balanța pHului renal
Epilepsia	Receptor GABAA $\gamma$ 2	Inhibiția sinaptică
Hiperekplexia	Receptor Gycine /GLRA1	Inhibiția sinaptică
Epilepsia idiopatică generalizată*	CLC-2 / CLCN2 Cl	Dezactivarea canalelor

Tabelul 2

Epilepsia mio-clonică juvenilă	GABAA receptor $\alpha$ 1	Inhibiția sinaptică
Miotonia cogenitală	CIC-1 / CLCN1	Potențialul membranar
Lipofuscinoza ceroidă neuronală	CLC-7 / CLCN7	Disfuncție lizozomală
Osteopetroza	CLC-7 / LCN7	Secreția acidă de către osteoclaste
Sferocitoza	AE1 / LC4A1	Stabilitatea membranară
Distrofia vite-liformă maculară	Bestrophin-1/ VMD2 RPE	Transportul clorului?

\*gena susceptibilă

Tabelul 3

Tabelele 1-3 - Dezordini ale transportului de clor (după Duran et al, Annu Rev Physiol. 2010)

### Prezentare de caz

Adolescenta PA, născută în 24.07.1997, din Brașov, este în evidența Centrului Regional de Mucoviscidoză Brașov de la vârsta de 6 ani când s-a prezentat la un consult alergologic pentru repetate infecții respiratorii. La momentul consultului prezenta diaree cronică, hipotrofie ponderală, unghii hipocratice și aspect de bronșiectazii bilaterale în lobii superiori. Istoricul releva creștere ponderală nesatisfăcătoare și sindrom de malabsorbție cu steatoree cronică din perioada de sugar, urmată la vârsta copilăriei mici de repetate infecții respiratorii care au dus inclusiv la adenoidectomie, însă fără rezultate satisfăcătoare.

În acest context clinic se ridică suspiciunea de fibroză chistică ce se va confirma prin efectuarea testului sudorii pozitiv, cu valori ale clorului sudoral de 96mEq/l.

Ulterior, testul genetic identifică un status de heterozigot delta F508 (delF508-N 1303K).

În anii ce au urmat diagnosticului, se instituie tratament complex de încetinire a declinului funcției pulmonare și combatere a infecției pulmonare cronice (inițial cu *Staphylococcus aureus*, ulterior cu *Pseudomonas aeruginosa*); terapie substitutivă enzimatică cu Kreon, terapie mucolitică, fizioterapie respiratorie și nutriție hipercalorică conform standardelor de tratament internaționale.

Evoluția clinică este relativ satisfăcătoare până la vârsta de 14 ani, cu status nutrițional bun, exacerbări pulmonare rare și predominant în sfera sinusală când apare un declin al statusului pulmonar datorat unor episoade de aspergiloză bronhopulmonară alergică (ABPA) ce vor necesita corticoterapie prelungită și terapie antifungică. Aceste episoade vor agrava bronșiectaziile existente și vor înrăutăți statusul pulmonar.

Cu ocazia unei recăderi de ABPA se menționează în evoluția clinică episoade de mioclonii matinale la nivelul membrelor superioare apărute la trezirea din somn. Acestea nu au fost luate în considerare până la apariția unei crize de convulsii tonico-clonice apărute după o extenuare fizică și deprivare de somn.

Investigațiile de urgență pentru criza de grand mal se fac la un spital din Germania unde EEG și examenul RMN cerebral sunt interpretate ca normale și categorisite ca epilepsie de

cauză neprecizată. În etapa imediat următoare nu este instituit nici un tratament.

Crizele mioclonice continuă și după episodul convulsiv din Germania și vor fi aduse în atenția noastră cu ocazia internării pentru un episod sever de ABPA asociat cu atelectazie importantă de LSD.

Urmează investigații de specialitate în cadrul consulturilor neurologice și efectuarea EEG intercricice și după deprivare de somn la care se constată aspect caracteristic pentru epilepsia mioclonică juvenilă.

Datele anamnestice, cu prezentarea tipică a miocloniilor, chiar și cu ignorarea acestora o perioadă după debut (cum se menționează și în literatură la adolescenți), criza de convulsii tonicoclonice generalizate și evaluarea datelor de specialitate au condus în final la stabilirea diagnosticului clinic.

În perspectivă se dorește și evaluarea genetică a EMJ pentru identificarea genelor implicate și transmisibilității acestora, în condițiile în care nu se cunosc alte cazuri în familia pacientei.

După depășirea perioadei de acomodare și acceptare a unui nou diagnostic de boală cronică cu un impact emoțional major asupra familiei și adolescenței, se trece la instituirea tratamentului cronic cu Levetiracetam (Keppra) cu efecte de cupare ale crizelor mioclonice și cu evoluție clinică bună.

Diagnosticul a două boli genetice cu impact asupra speranței de viață și asupra calității vieții, ce implică tratamente multiple, complexe și permanente, a constituit punctul de plecare în cercetarea posibilelor legături fiziopatogenice între cele două afecțiuni.

În cele ce urmează sunt schițate aspectele comune și interferențele genetice posibile, într-un rezumat al datelor din literatura medicală existentă.

### **Fibroza Chistică și Epilepsia Mioclonică Juvenilă**

Fibroza Chistică este boala genetică cea mai frecventă cu transmitere autosomal recesivă la caucazieni datorată mutațiilor de la nivelul genei CFTR (brațul lung al cromozomului 7) care codifică un canal de clor.

Anomaliile funcționale ale CFTR vor avea ca și consecințe clinice o afectare multisistemică a sistemul respirator, gastrointestinal,

hepatobiliar și reproducător cu infertilitate masculină.

Pacienții FC sunt susceptibili la infecții recurente și cronice respiratorii cu o varietate de microorganisme (în special *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, complexul *Burkholderia cepacia* și *Aspergillus*).

Disfuncția în canalul CFTR este astfel asociată cu obstrucție cronică a căilor respiratorii, infecție și inflamație, fapt care va constitui factorul major de morbiditate și mortalitate.

Descoperirea genei Fibrozei Chistice în 1989 și a mutațiilor sale ca și cauză primară a FC a generat în lumea științifică o reacție optimistă mai ales în legătură cu dezvoltarea unor terapii potențiale pentru o boală cu speranță de viață limitată [10].

CFTRul are funcții multiple: în reglarea altor canale ionice și în diverse procese celulare, de asemenea controlul mișcării anionilor de-a lungul epiteliilor.

Datorită faptului că de-a lungul timpului s-au descoperit peste 1900 de mutații CFTR, fenotipul pacienților este foarte variabil (chiar și la nivelul celor care au același genotip CFTR). În prezent se consideră că modificatori genici (alte gene), cat și factori de mediu pot modula fenotipul FC.

Epilepsia idiopatică cuprinde forme de epilepsie care au fost definite mai precis în ultimii 10 ani prin studiile genetice familiale care au identificat un număr tot mai mare de gene predispozante. Printre acestea, cele mai importante par să fie mutațiile în patru gene ce codifică subunități ale receptorului acidului c-aminobutiric (GABA)<sub>A</sub>. Cercetările recente au demonstrat că aceste mutații sunt asociate cu o scădere dramatică a curenților GABA-evocați în receptorii recombinanți. Datorită faptului că GABA este inhibitorul principal al transmiterii în creierul adult, se crede că pierderea funcțiunii acestuia va cauza o excitabilitate anormală a neuronilor corticali, ducând astfel la manifestări clinice convulsive; în forma de epilepsie mioclonică juvenilă fiind descrise și mecanisme genetice adiționale [11].

Epilepsia mioclonică juvenilă (EMJ) întrunește aproximativ 3% -30% din epilepsii și este primar genetică. Există factori rasiali, etnici și geografici care fac ca aceasta să fie transmisă autosomal dominant, recesiv sau complex

oligogenic. Până în prezent au fost descoperiți 15 loci cromozomiali și 3 gene majore implicate în fenotipurile EMJ.

Primele descrieri ale EMJ aparțin lui Janz și Christian din 1957 care definesc un sindrom epileptic „petit mal impulsiv” care apare în perioada pubertară, fiind caracterizat de convulsii mioclonice predominant la nivelul membrelor superioare și care pot duce la tulburări de echilibru cu pierderea posturii.

La acel moment, nu au fost descrise modificări deosebite ale statusului conștienței. Afecțiunea părea să fie moștenită, uneori se manifesta cu crize generalizate tonico-clonice, mai rar absențe. Aceste convulsii păreau să apară la trezirea din somn, fiind precipitate de deprivarea de somn. Electroencefalogramele interictale și ictale erau caracterizate de undevârf rapide, generalizate, neregulate, în care nu existau corelații clare între unde și mioclonii. Răspunsul la tratament părea să fie adecvat, cu necesitatea probabilă de a fi continuat toată viața.

Aceste caracteristici vor fi confirmate mai târziu (1997) și de către Janz și Durner.

Cercetările recente au descoperit implicarea în EMJ a trei gene: GABRA1 la nivelul cromozomului 5q34, CLCN2 la nivelul 3q26 și miocloninal EFHC1 la nivelul 6p12 care sunt segregate în diverse familii afectate și care creează mecanisme posibile ce produc fenotipuri de EMJ [12]. Dintre acestea, primele două sunt gene care codifică canale de clor.

Mai mult decât atât, în 1996 Greenberg descoperă la un grup de familii afectate de EMJ în SUA un locus în regiunea HLA ce are ca expresie clinică crize de grand mal cât și mioclonii la trezirea din somn. Ulterior se confirmă (Greenberg, Obeid) că HLA DR13 este asociat cu EMJ, ceea ce va sugera existența unei a doua gene (în afară de 6p12) la nivelul cromozomului 6p.

Din toate studiile efectuate până în prezent, se pare că fenotipul de epilepsie juvenilă mioclonică clasică este asociat cu mutații în gene EFHC (proteină care acționează ca un canal de calciu, având rol în homeostazia intracelulară a calciului dar și cu rol în apoptoză).

Pe de altă parte, mutațiile în majoritatea genelor identificate până acum în epilepsia generalizată idiopatică (GABRA1, GABRG2,

GABRD, și CLCN2) par mai degrabă să fie asociate cu o varietate de fenotipuri de epilepsie, printre care și EMJ, absențele juvenile, absențele copilăriei și epilepsia cu convulsii grand mal la trezire (tabelul 4) (Baulac et al., 2001; Wallace et al., 2001; Cossette et al., 2002; Haug et al., 2003; Dibbens et al., 2004; Maljevic et al., 2006).

Gene afectate	Fenotip	Referințe
GABRA1	EMJ, EAC	Cossette et al., 2002; Maljevic et al., 2006
GABRG2 GEFS+	EAC	Baulac et al., 2001; Wallace et al., 2001; Harkin et al., 2002; Kananura et al., 2002
GABRD GEFS+,	EMJ	Dibbens et al., 2004
CLCN2	EMJ, EJA, EGCF, EAC	Haug et al., 2003; D'Agostino et al., 2004
EFHC	EMJ	Suzuki et al., 2004

EAC - epilepsia cu absențe a copilăriei

EGMT - epilepsia cu grand mal la trezire

EGCF - epilepsia generalizată cu convulsii febrile

EJA - epilepsia juvenilă cu absențe

EMJ - epilepsia mioclonică juvenilă

*Tabelul 4 - Forme monogenice ale epilepsiei clasice idiopatice generalizate (dupa Patrick Cossette, 2010)*

Anumite studii observaționale au sugerat chiar la un moment dat, ca aceste sindroame să fie considerate niște modificări biologice continue, care se întrepătrund, chiar dacă sunt considerate entități distincte [11]. Aceasta dovedește, încă o dată, cât de variată este corelația genotip-fenotip în domeniul multor afecțiuni.

În urma corelării datelor științifice despre cele două afecțiuni genetice, Fibroza Chistică și Epilepsia Mioclonică Juvenilă ce aparțin canalopatiilor de clor, chiar dacă la nivel genetic recunosc gene de pe cromozomi diferiți, se ridică întrebarea dacă există interferențe la nivel molecular între prezența celor două boli genetice la același pacient.

Urmează să se stabilească, în măsura posibilităților de investigare genetică, tipul genei afectate la pacientul descris, care se prezintă cu un sindrom epileptic sporadic în familia din care face parte.

#### **Bibliografie:**

- [1.]Cossette P. - Channelopathies and juvenile myoclonic epilepsy *Epilepsia*, 51(Suppl. 1):

- 30–32, 2010 doi: 10.1111/j.1528-167.2009.02439.x
- [2.] Delgado-Escueta A.V. - Advances in genetics of juvenile myoclonic epilepsies: *Epilepsy Currents*, Vol. 7, No. 3 (May/June) 2007 pp. 61–67)
- [3.] Edelman A. - Cystic fibrosis and anionic channelopathies, International meeting, Friday 8th September 2006, Book of Abstracts ISBN-13: 978-90-513 0-546-3; ISBN-10: 90-513 0-546-X
- [4.] Estevez R., Boettger T., Stein V., Birkenhager R., Otto E., Hildebrandt F., Jentsch T.J. Barttin is a Cl<sup>-</sup> channel subunit crucial for renal Cl<sup>-</sup> reabsorption and inner ear K<sup>+</sup> secretion. *Nature*, 2001, 414, 558–561
- [5.] Giraudat J., Devillers-Thierry A., Auffray C., Rougeon F., Changeux J. P. Identification of a cDNA clone coding for the acetylcholine binding subunit of Torpedo marmorata acetylcholine receptor. *EMBO J.*, 1, 1982, 713–717
- [6.] Hubner C. A., Jentsch T J. - Human *Molecular Genetics*, 2002, Vol. 11, No. 20 2435–2445
- [7.] Koch M.C., Steinmeyer K., Lorenz C., Ricker K., Wolf F., et al. - The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science* 1992; 257:797–800. [PubMed: 1379744]
- [8.] Noda M., Takahashi H., Tanabe T., Toyosato M., Furutani Y., Hirose T., Asai M., Inayama S., Miyata T., Numa, S. - Primary structure of a-subunit precursor of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence. *Nature*, 1982, 299,793–797
- [9.] Quinton P.M. - Physiological Basis of Cystic Fibrosis: A Historical Perspective. *Physiological Reviews* 1999;79:3–22
- [10.] Riordan J.R., Rommens J.M., Kerem B., Alon N., Rozmahel R., Grzelczak Z., Zielenski J., Lok S., Plavsic N., Chou J.L. et al. - Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 1989, 245, 1066–1073
- [11.] Simon D.B., Bindra R.S., Mansfield T.A., Nelson-Williams C., Mendonca E., Stone R., Schurman S., Nayir A., Alpay H., Bakaloglu A. et al. - Mutations in the chloride channel gene, *CLCNKB*, cause Bartter's syndrome type III. *Nat. Genet.*, 1997, 17, 171–178. 2442 *Human Molecular Genetics*, 2002, Vol. 11, No. 20
- [12.] Steinmeyer K., Ortland C., Jentsch T.J. - Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel. *Nature* 1991; 354:301–304. [PubMed:1659664]