

Diagnóstico de las enfermedades genéticas mediante análisis molecular del ADN: fibrosis quística de páncreas en Baleares

B. Jaume Roig*

Prólogo

Desde que el médico Andrés Vesalio en 1543 edita su obra *Humani Corporis Fabrica* diseñando el primer mapa anatómico del ser humano y calificando a nuestro cuerpo como *Terra Incognita* se han sucedido en las ciencias biomédicas grandes y espectaculares avances, los cuales están permitiendo poder hablar hoy en día del descubrimiento de una nueva cartografía y con ello de un nuevo mapa, el mapa genético humano.

Así pues, en estos últimos años, se han visto beneficiadas, de forma especial, las áreas del diagnóstico, pronóstico y tratamiento de muchas enfermedades gracias precisamente al gran desarrollo que dentro de la Genética Humana ha protagonizado la Biología Molecular.

De esta forma, desde que en los años cincuenta se descubre el ADN, llamado por algunos el hilo de la vida, no transcurre un largo período de tiempo sin que se produzcan nuevos descubrimientos que nos permitan avanzar aún más en el íntimo co-

nocimiento del mensaje genético, normal y patológico, guardado celosamente en el núcleo celular.

Hoy, a las puertas de un nuevo milenio el estudio de la patología molecular en colaboración con todas las disciplinas biomédicas supone pues una gran esperanza para la erradicación y posible terapia de las enfermedades que padece el ser humano.

Introducción

La Fibrosis Quística de Páncreas (FQ) o Mucoviscidosis es la más frecuente de las enfermedades autosómicas recesivas en la población caucásica presentando una incidencia media de 1/2.500 recién nacidos vivos.

La gran mayoría de los pacientes sufren trastornos digestivos y nutricionales, lo que provoca una marcada deficiencia ponderal y estatural, si bien son las infecciones y complicaciones respiratorias recidivantes el principal factor que contribuye no sólo a múltiples hospitalizaciones sino a la morbilidad y mortalidad a largo plazo. En 1985 se localiza en el brazo largo del cromosoma 7 (7q22-q31) el locus FQ, siendo en 1989 cuando, gracias al empleo de diversos marcadores moleculares, es aislado, identificado y caracterizado el gen FQ, su producto proteico así como las principales mutaciones responsables de la enfermedad lo que ha abierto una vía a nuevos progresos y a una mejoría del pronóstico y calidad de vida del afecto.

Aspectos históricos

Aunque se tienen referencias anteriores de casos que presentaban signos clínicos compatibles con la mucoviscidosis o enfermedad fibroticoquística del páncreas desde principios de siglo, como la observación de las típicas lesiones pancreáticas de la enfermedad, Fanconi quien en 1936 reconoce a la FQ como una única entidad clínico-patológica al referirse a ella en su

* Licenciado en Ciencias Biológicas.

artículo *Síndrome celíaco con fibromatosis quística-pancreática congénita y bronquiectasis*.

En 1938, D. Andersen del Babies Hospital de Nueva York realiza la primera descripción detallada de las principales características clínicas y anatómicas de la FQ, denominándola *fibrosis quística del páncreas* basándose en el estudio patológico de tres series de casos: a) niños fallecidos por obstrucción neonatal, b) niños con diarrea crónica fallecidos por bronconeumonía en los primeros meses de vida y c) niños fallecidos en los primeros años de la adolescencia por enfermedad pulmonar crónica. Simultáneamente a las observaciones descritas por D. Andersen se describen otras series de niños con idénticos cambios patológicos.

Con la observación del importante papel que tiene en muchos de los síntomas de la FQ la producción de un mucus extremadamente viscoso que colapsa los conductos de diferentes órganos y glándulas se denomina a la enfermedad *mucoviscidosis*. Un gran avance en el conocimiento de los diferentes aspectos de la FQ se produce cuando, en 1947, durante una intensa ola de calor en Nueva York los individuos afectados sufren severos episodios de agotamiento y postración. Para intentar explicar este fenómeno Di Sant' Agnese y cols. en 1953 observan un marcado descenso de los niveles de cloro y sodio en el suero, así como un aumento de las concentraciones de dichos iones en el sudor de los enfermos FQ. Estas observaciones fueron de gran ayuda en el diagnóstico de la enfermedad cuando se demostró la existencia de anomalías en muchas glándulas exocrinas en pacientes con mucoviscidosis.

El término mucoviscidosis que se hace popular en América del Norte y Francia irá evolucionando hasta convertirse en la década de los años sesenta en *fibrosis quística* que es actualmente la forma más usada para referirse a esta concreta patología genética.

Aspectos clínicos

Fisiopatología

Los principales signos clínicos de la FQ (íleo meconial, signos respiratorios, signos digestivos...) son debidos principalmente a dos anomalías:

- La producción de un mucus extremadamente viscoso con elevadas concentraciones de albúmina, iones calcio y glicoproteínas que causa la obstrucción de diversos *ductus* en ciertos órganos, dependiendo del órgano involucrado los cambios patológicos que se produzcan.

- La secreción electrolítica anormal a nivel de las glándulas sudoríparas de la piel que supone un marcado incremento de la concentración de iones cloro, sodio y en menor grado de potasio en el sudor de los afectados. En los niños no afectados de FQ, el cloro y el sodio del sudor son, en gran parte, reabsorbidos al fluir hacia la superficie cutánea resultando un sudor que es hipotónico (< 40-50 mEq/l de cloro y sodio). Sin embargo, en los pacientes con FQ la reabsorción de estos iones a su paso a través del conducto excretor desde el fondo de las glándulas sudoríparas hacia el exterior de la piel está alterada por lo que se produce un sudor con alta concentración de estos iones (> 60 mEq/l).

En los individuos afectados de FQ se observa así un elevado número de anomalías en ciertos procesos celulares. Estas anomalías se deben mayoritariamente a un inadecuado funcionamiento de ciertos tejidos epiteliales, en particular del sistema respiratorio, los asociados al sistema digestivo así como aquellos de las glándulas sudoríparas y salivares. Se ha sugerido que las deficiencias en el transporte de iones inorgánicos y de agua a través de las estructuras epiteliales pudiera ser responsable de la acumulación de secreciones de moco viscoso en las superficies epiteliales. Si bien no existen evidencias claras de la función del agua en dicho proceso, han sido demostradas anomalías en los procesos de transporte transepitelial a par-

TABLA I
FISIOPATOLOGÍA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA FIBROSIS QUÍSTICA

Órgano	Disfunción secretora	Manifestaciones clínicas
Glándulas sudoríparas	Elevadas concentraciones de sodio y cloro en el sudor	Hiponatremia Hipocloremia
Intestino		
a) recién nacido	Meconio viscoso	Íleo meconial con obstrucción intestinal
b) infancia y adulto	Masas mucofecales espesas	Fuertes dolores intestinales
Páncreas	Espesamiento y precipitación de secreciones pancreáticas con obstrucción de canales pancreáticos	Ausencia de enzimas pancreáticas Malabsorción Heces voluminosas
Hígado	Deficiencia de insulina	Intolerancia a la glucosa
	Espesamiento y precipitación de bilis en el sistema biliar	Cirrosis focal biliar (riñón apergaminado)
Glándulas salivares	Espesamiento y precipitación de secreciones salivares en los conductos de las glándulas salivares submaxilares y sublinguales	Fibrosis parcial de las glándulas salivares
Nariz	Pólipos nasales	Obstrucción del flujo de aire nasal
Pulmones	Producción de moco viscoso en bronquios y bronquiolos	Infección Bronquiectasis
Sistema reproductivo		
a) hombre	Secreciones viscosas en tracto genital durante el desarrollo embrionario causa la no formación de los conductos de Wölff	Esterilidad
b) mujer	Dilatación de las células epiteliales endocervicales	Fertilidad disminuida

tir de muestras de tejidos epiteliales de pacientes FQ.

Ya en 1953 se observó que los pacientes FQ presentaban una concentración de ciertos electrolitos del sudor muy elevada en relación a los individuos no afectados. En 1983 se realizan estudios de microdissección y microperfusión en los *ductus* de las glándulas sudoríparas mostrando éstas una diferencia en la permeabilidad del cloro de hasta 40 veces entre los individuos FQ y los individuos control.

En posteriores estudios fueron además descritas anomalías en los potenciales bioeléctricos en las citadas glándulas de los afectados FQ. Y, si bien se creyó en un principio que estas anomalías eran debidas únicamente al transporte del sodio se comprobó más tarde que eran alteraciones en la permeabilidad al cloro lo que podría explicar básicamente los contrastados valores de potencial bioeléctrico hallados en el epitelio de diferentes tipos de

tejidos, hecho que se ha podido comprobar a partir de cultivos de células en monocapa del epitelio traqueal de pacientes FQ. Como defecto fisiológico adicional se identifica, junto con la reducida permeabilidad al cloro, una pérdida de respuesta secretora frente a los estímulos β -adrenérgicos.

Ulteriormente se demuestra que las células epiteliales de los individuos FQ están caracterizadas por una regulación alterada en el canal del ión Cl⁻ que se halla en la membrana apical de las células epiteliales respiratorias y secretoras. Esta alteración supone la pérdida de la activación del canal cloro a través de la vía reguladora del AMP cíclico (AMPc) y es la base del descenso de la secreción y reabsorción electrolítica en el epitelio de los individuos FQ.

Con la caracterización en 1989 del gen FQ y su producto, la proteína CFTR (de *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Re-*

gulator) algunos autores señalan que en los afectos FQ dicha proteína presenta disfunciones, base de las anomalías fisiológicas de dicha enfermedad. Así, la proteína CFTR podría ser bien el canal de transporte para el propio ión Cl⁻ o un regulador del citado canal. Sin embargo, recientes investigaciones enfocadas a la posible terapia génica de la FQ favorecerían la primera hipótesis al resaltar el rol de la proteína CFTR como el canal del transporte del ión cloro.

Manifestaciones clínicas

La FQ es una enfermedad cuya severidad viene determinada básicamente por la afectación del páncreas y de los pulmones si bien la mayoría de órganos y sistemas se ven afectados (Tabla I).

Aspectos genéticos y moleculares

La evaluación de la incidencia de la FQ se ha realizado en las últimas décadas gracias a los datos hospitalarios, a estudios anatomopatológicos o al registro sistemático de los casos. Aunque la FQ se ha descrito en casi todos los grupos étnicos es en la población blanca de origen europeo donde su incidencia media, calculada a partir de estudios epidemiológicos o detecciones neonatales es mayor siendo ésta en Europa y América del Norte aproximadamente de 1/2.000-1/2.500 recién nacidos vivos. En las poblaciones de origen judío, oriental o africano esta enfermedad es extremadamente rara.

Los padres de un individuo afecto de FQ, que no presentan hallazgos o síntomas de la enfermedad, son portadores obligados (heterocigotos) del defecto genético que origina el cuadro fisiopatológico característico de la FQ. El riesgo teórico de concebir nueva descendencia afecta (homocigotos afectos) se cifra en esta pareja en un 25 %, mientras que las probabilidades de

tener hijos sanos, sean éstos homocigotos sanos o heterocigotos (portadores) son respectivamente del 25 % y del 50 %.

La presencia de portadores en la población general, calculada mediante la Ley de Hardy-Weinberg a partir de la incidencia media de la enfermedad implica que 1/20 a 1/25 individuos de dicha población general es portador asintomático del defecto genético causante de la FQ.

El genoma humano haploide tiene una longitud total evaluada en aproximadamente 3×10^9 pares de bases nucleotídicas. A lo largo de este material genético se encuentran distribuidos entre 500.000 y 100.000 genes de los cuales sólo se conocen algo más de 2.000. Hasta hace pocos años para el aislamiento e identificación de un determinado gen la *Genética clásica* requería obligatoriamente el previo conocimiento y caracterización del producto génico (proteína). Sin embargo, desde 1980, con el hallazgo de los polimorfismos de restricción o marcadores RFLP, se desarrolla una nueva metodología para la localización génica. Esta nueva estrategia, la llamada *Genética inversa* permite, gracias a estos marcadores genéticos o RFLP, por una parte el aislamiento del gen desconocido y por otra, a partir de éste, su producto génico.

Marcadores genéticos

Un marcador genético es un polimorfismo del gen o de un segmento próximo al locus génico siendo los más utilizados los polimorfismos debidos a dianas de restricción.

Los polimorfismos de restricción o marcadores RFLP (de *Restriction Fragments Length Polymorphisms*) son polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción. Estos polimorfismos corresponden a cambios de bases en la secuencia del ADN a nivel de los puntos o dianas de restricción (puntos específicos de corte para un concreto enzima de restricción), siendo detectadas dichas modificaciones gracias al método de Southern que

muestra diferencias individuales en el tamaño de los fragmentos de restricción con un enzima y una sonda determinada. De esta forma, el ADN que no se expresa (80-90 % del genoma humano) puede estar sujeto cada intervalo de 200-500 pares de bases a mutaciones que no tienen consecuencia fenotípica ni clínica pero que sí afectan al punto de restricción reconocido por un determinado enzima de restricción. Estas variaciones tienen la importante característica de heredarse generación tras generación según las leyes de Mendel pudiéndose seguir su segregación en una determinada familia. De esta forma, la transmisión de un gen puede seguirse en una familia gracias al empleo de estos marcadores genéticos o RFLP que pueden ser tanto extragénicos (situados junto al gen) como intragénicos (situados en el interior del gen).

Localización cromosómica y génica de la FQ

Con el hallazgo de los RFLP diversos grupos iniciaron la localización molecular del gen FQ a partir de grandes estudios familiares en los que se observaba la segregación y herencia de estos marcadores genéticos con el objetivo de hallar ligamiento genético entre un determinado marcador y el locus génico FQ evaluando estadísticamente las distancias genéticas de los diferentes marcadores y su posición respecto al gen FQ mediante el método de Lod-Score.

Los primeros resultados significativos fueron obtenidos por H. Eiberg en 1985 al observar ligamiento genético entre la enzima sérica polimórfica (arilesterasa) paraoxonasa (PON) cuya posición era en aquellos momentos desconocida y el locus FQ.

De ahí que el siguiente paso fuera, la localización del gen FQ por mapeo génico de PON o hallar nuevos marcadores que estuvieran ligados genéticamente, con el gen FQ y con PON simultáneamente.

Durante el mismo año se halla un nuevo RFLP denominado DOCRI-917 genética-

mente ligado al locus FQ. Dicho marcador se encuentra a una distancia génica de 15 cM del locus y a 5 cM de PON (1 cM = 10^6 pares de bases); R.G. Knowlton y cols. a finales del mismo año mediante el empleo de un banco de híbridos somáticos celulares localizan DOCRI-917 sobre el cromosoma 7.

En la misma época, se produce el descubrimiento de dos nuevos marcadores mucho más cercanos al gen FQ. En primer lugar, se observa el gran ligamiento entre el oncogen celular met y el gen FQ con una distancia génica entre ambos menor de 5 cM, hecho observado por R. White y cols. en un grupo de familias procedentes de Utah (EE.UU.). En segundo lugar, B.J. Wainwright halla ligamiento entre la sonda anónima pJ3.11 del cromosoma 7 y el gen FQ en familias procedentes del Reino Unido.

La localización subcromosómica de estos marcadores permite situar el locus FQ entre las bandas q22 y q31 del brazo largo del cromosoma 7 (Figura 1).

La disponibilidad de dos marcadores (met y pJ3.11) localizados a escasos centimorgans del gen FQ facilitó el seguimiento de la segregación de dicho gen en aquellas familias con un hijo previo afecto y del que se disponía de ADN para su análisis molecular, lo que permitió, indirectamente en ciertas familias, la posibilidad del diagnóstico prenatal y la detección de portadores del gen patológico.

En una búsqueda más precisa de la región cromosómica que circundaba el gen FQ fueron analizados otros marcadores que en algunos casos fueron más próximos al locus FQ.

El estudio en colaboración con otros grupos en series familiares procedentes de zonas geográficas muy distantes en el que se observaba que dos diferentes marcadores del cromosoma 7 segregaban muy cerca del gen FQ apoyaba la hipótesis realizada por G. Romeo de la homogeneidad genética de un único locus génico. Este estudio permitía, además, asegurar el gran ligamiento existente entre met y pJ3.11 con el gen FQ y la posición de éste entre

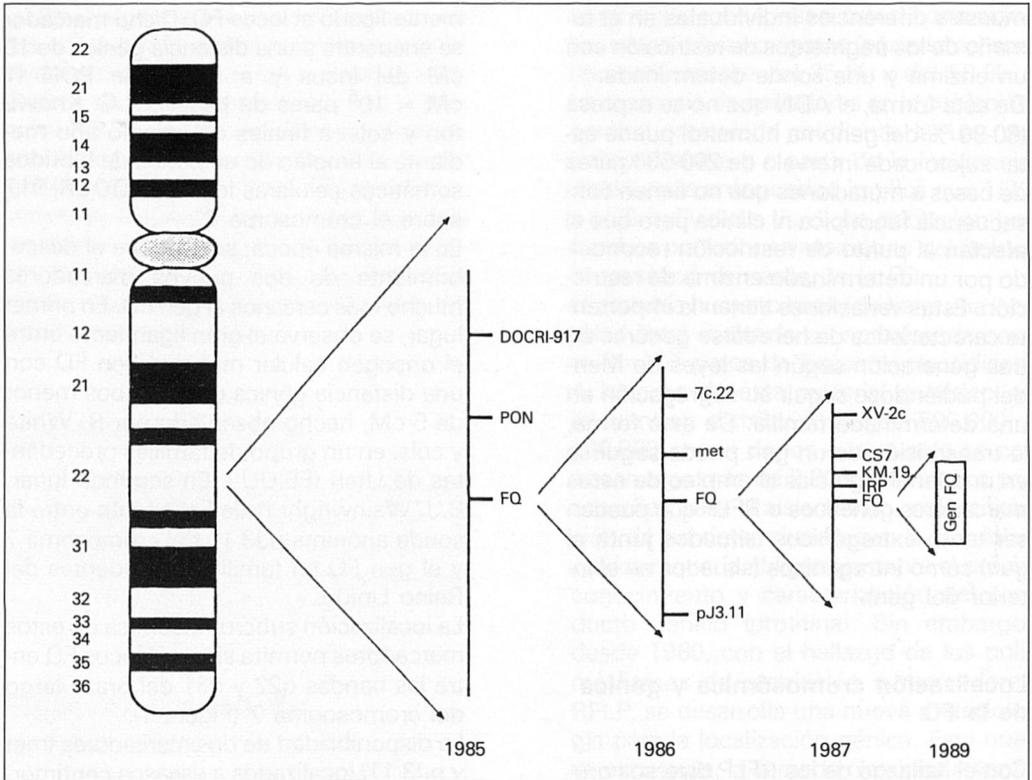


Figura 1. Principales etapas en la identificación y caracterización del gen FQ.

ambos marcadores (met-gen FQ-pJ3.11) (Figura 1).

Desde ese momento varios equipos focalizaron sus investigaciones sobre esta pequeña región del cromosoma 7 (7q22-q31) comprendida entre los dos marcadores met y pJ3.11 para intentar clonar el gen FQ. En 1987, X. Estivill (grupo del Pr. R. Williamson, *St. Mary's Hospital*, Londres) aísla los marcadores KM.19, XV-2 y CS.7 muy cercanos al gen FQ (menos de 0,1 % de recombinación) y en desequilibrio de ligamiento con él, es decir, un alelo del marcador estaba más asociado a un alelo del gen que lo estaría en una segregación al azar (Figura 1).

Este mismo grupo clona el gen IRP (de *Int Related Protein*) creyendo haber clonado el gen FQ. Más tarde se comprobó que este gen IRP codificaba para una proteína sin ninguna relación con la mucoviscidosis.

Es, sin embargo, en septiembre de 1989 cuando el grupo de colaboradores coordinado por L.C. Tsui (Canadá) y F.S. Collins (Estados Unidos) ponen en evidencia a partir del aislamiento de 258 secuencias específicas del cromosoma 7 la localización de dos de ellas (D7S122 y D7S340) en la región situada entre met y pJ3.11. Después de haber determinado su orden en el cromosoma mediante el método del campo forzado, estudian dicha región con la técnica del *paso a paso* (*chromosome walking*) que consiste en la clonación progresiva de pequeñas secuencias cromosómicas unas junto a otras. A esta metodología acoplaron la técnica del *salto* (*chromosome jumping*) que permite la clonación de grandes fragmentos cromosómicos eliminando aquellas secuencias no clonables.

Una vez aislados los clones requeridos se aplicó a ellos la técnica del *zoo-blot* para

determinar las secuencias codificadoras; esta estrategia molecular se basa en la comparación de la conservación, a lo largo de la evolución, de las secuencias codificadoras y la no conservación de las secuencias no codificadoras. De esta forma se hallaron cuatro zonas de homología interespecie. La primera zona, era una secuencia correspondiente a una alternancia de intrones y de exones, pero no podía tratarse del gen FQ ya que los estudios genéticos realizados en algunas familias recombinantes demostraban que el gen FQ se situaba obligatoriamente en la zona telomérica respecto al marcador genético KM.19, mientras que esta secuencia se hallaba situada en posición centromérica respecto al citado marcador. La segunda zona de homología se comprobó corresponder con el gen IRP. La tercera zona demostró una gran riqueza de residuos nucleotídicos CpG no específicos. Finalmente, la cuarta zona de homología puso en evidencia la presencia de una región de lectura acompañada de zonas CpG poco metiladas, que frecuentemente se hallan asociadas a la extremidad 5' de los genes funcionales. De ahí que esta cuarta zona de homología pudiera tratarse de un buen candidato para el gen FQ. Esta zona permitió posteriormente la obtención de un clon de 113 pares de bases del primer exón del gen FQ. A partir de ésta fue reconstituido su ADN complementario completo (6.129 pares de bases).

El gen FQ se describe, pues, formado por 27 exones localizados sobre 250 kilobases del genoma. Su producto es una proteína de 1.480 aminoácidos denominada CFTR (de *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) cuya secuencia indica su pertenencia a una superfamilia de proteínas de membrana.

El modelo hipotético de dicha proteína, elaborado a partir de su secuencia permite observar dos zonas: una de ellas hidrófoba (transmembranal) y otra de naturaleza hidrofílica con dos secuencias NBF (*Nucleotide-ATP Binding Fold*) capaces de captar moléculas de ATP. Ambas zonas están unidas a un dominio citoplasmático

R que presenta numerosos residuos cargados, conteniendo lugares potenciales de fosforilación para las proteinquinasas A y C lo que presupone su probable función reguladora (Figura 2).

La comparación de la estructura de los clones de ADN complementarios obtenidos a partir de glándulas sudoríparas de individuos sanos y enfermos permitió poner en evidencia que una mayoría de los enfermos era portador de una mutación idéntica. Esta mutación suponía la pérdida o deleción de tres pares de bases (CTT) a nivel del 10° exón del gen. La consecuencia directa de ello es la pérdida del aminoácido Fenilalanina que se encuentra en la posición 508 de la proteína, de ahí el nombre de esta mutación principal: ΔF 508 (Figura 2). Esta mutación está localizada a nivel de una de las secuencias NBF y podría teóricamente impedir una correcta unión con la molécula de ATP.

Los trabajos en series de enfermos afectados de FQ de Canadá y América del Norte mostraron que el 68 % de los cromosomas FQ portaban la mutación ΔF 508, mientras que ningún cromosoma normal de los progenitores era portador de esta mutación. Ello permitía asegurar que esta mutación ΔF 508 era la causa principal de la enfermedad.

A finales del año 1989, L.C. Tsui auspicia la creación de un Consorcio Internacional (*Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium*) que agrupa actualmente a Hospitales, Laboratorios y Centros de Investigación dedicados a la patología genética de la FQ, con el fin primordial de localizar otras mutaciones asociadas a la FQ en el resto de cromosomas FQ no ΔF 508 para conocer sus frecuencias y su distribución en las diferentes poblaciones. Hasta el mes de junio de 1992 han sido descritas por el Consorcio Internacional un total de 204 diferentes mutaciones en el gen FQ. Actualmente, la función de la proteína CFTR como anal de transporte del ión cloro ha sido puesta en evidencia por diferentes trabajos. Complementando dicha observación han sido ya realizadas diversas hipótesis frente a una posible terapia

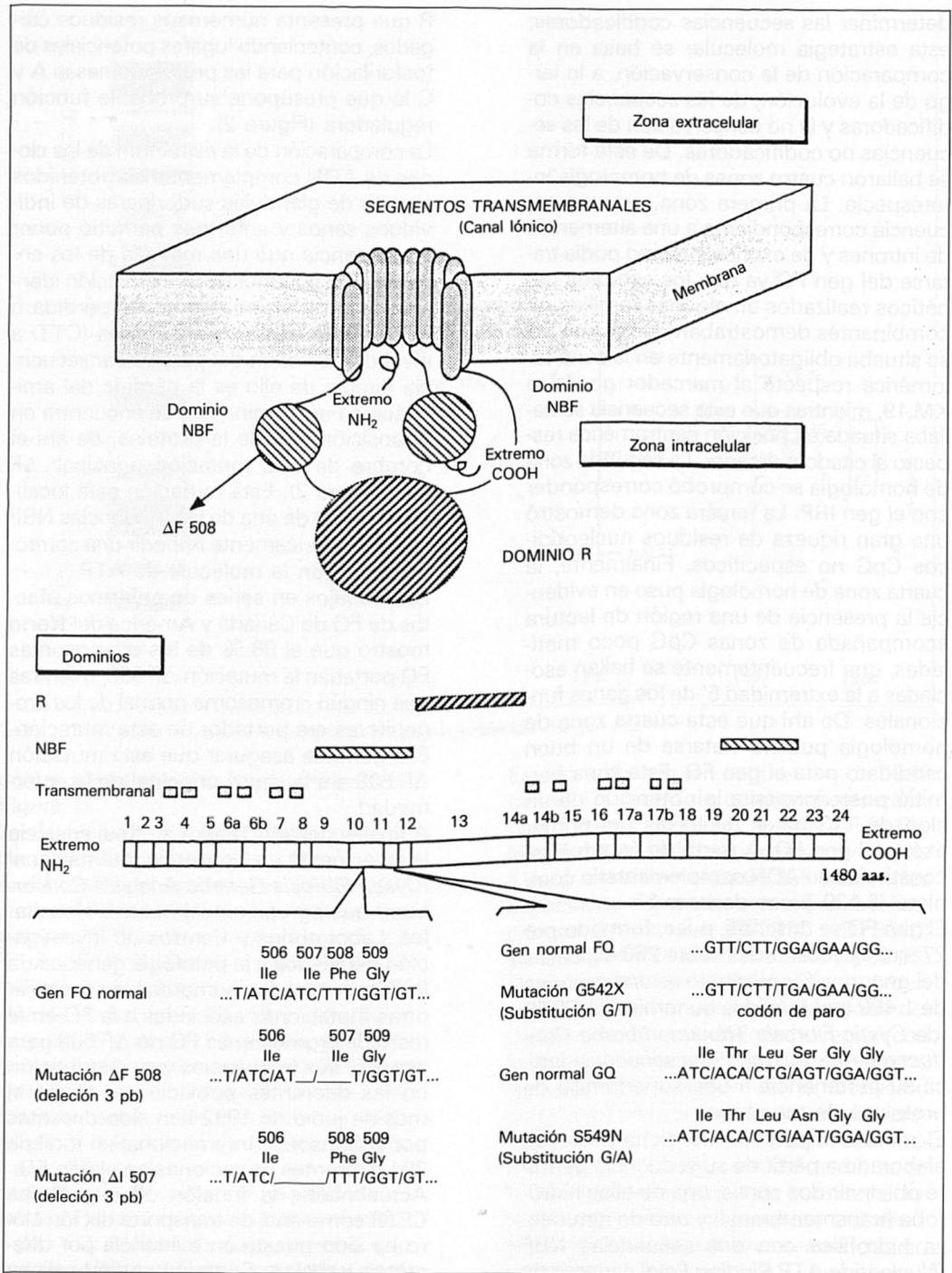


Figura 2. Esquema representativo del gen FQ, las mutaciones $\Delta F 508$, $\Delta I 507$, G542X y S549N (parte inferior) y la estructura de la proteína CFTR (parte superior).

génica, para la corrección de la anomalía funcional de dicho canal cloro por transferencia y expresión *in vitro* del ADNc que codifica para la proteína CFTR en células de pacientes portadores de la mutación $\Delta F 508$.

Estrategias del análisis molecular aplicadas al diagnóstico de enfermedades genéticas

El análisis del genoma humano con fines diagnósticos inició su desarrollo a finales de la década de los años setenta con el empleo de las primeras sondas del gen de la globina aplicadas al diagnóstico de las hemoglobinopatías.

A partir de esa fecha el campo de aplicación del análisis genotípico con fines diagnósticos ha visto aumentar sus posibilidades de actuación gracias, por una parte, al descubrimiento de nuevas sondas, lo que permite el estudio de un número mayor de genes, y de otra, al auge de las técnicas metodológicas como la técnica de Southern, o de última aparición como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction o PCR), que desde el primer momento están apoyando los constantes logros diagnósticos en la patología genética humana.

Para el análisis del ADN con fines diagnósticos a partir de cualquier tipo de célula nucleada, pueden emplearse diferentes tipos de enfoques o análisis en relación al grado de conocimiento que se tiene del gen en estudio y del defecto genético de que se trate. En primer lugar, si se conoce la naturaleza del defecto genético y el gen se ha caracterizado y aislado puede realizarse un análisis directo de la lesión genética, que no requiere un estudio previo de la familia. Cuando el gen está clonado pero la lesión genética es muy variable o desconocida, el diagnóstico puede realizarse con el empleo de marcadores genéticos *intra* o *yuxtapéuticos* y la ayuda de sondas específicas del gen (análisis semidirecto). Finalmente, cuando no se conoce el defecto genético, el método a em-

plear es el análisis indirecto que utiliza el complemento de ciertos marcadores extragénicos indirectos lo más cercanos posible al locus génico para evitar los riesgos de recombinación génica (intercambio de material genético entre los dos cromosomas homólogos). Estas dos últimas estrategias de análisis, a diferencia de la primera, requieren un estudio familiar previo.

Análisis semidirecto e indirecto

Los diagnósticos semidirecto e indirecto, basados en el ligamiento genético, requieren obligatoriamente un análisis familiar, es decir, el estudio molecular del caso afecto y de sus progenitores, mediante diferentes marcadores genéticos (sondas). De esta forma, se determina, para cada individuo, un grupo de alelos correspondiente al polimorfismo de restricción y que sirve de marcador genético, permitiendo establecer en cada familia cuál es el alelo o el haplotipo (conjunto de alelos) asociado al gen mutado, considerando que el caso índice porta los dos genes mutados que ha heredado, respectivamente, de cada uno de sus progenitores.

Análisis directo

Para el análisis directo del defecto genético que pueda causar una determinada enfermedad sea éste una delección, inserción o sustitución, se requiere un conocimiento muy preciso a nivel molecular del defecto genético para que el locus génico pueda ser empleado como sonda génica para la detección del alelo asociado a la enfermedad y discriminar así los individuos homocigotos afectados, los portadores heterocigotos y los individuos homocigotos sanos.

Actualmente las posibles situaciones en que puede aplicarse el análisis directo son: a) cuando una delección genética elimina todo un gen o parte de él es fácil demostrar la ausencia o la modificación de longitud del segmento correspondiente de ADN por comparación de los mapas de restricción normales y anormales; b) si el defecto genético produce un cambio (creación o destrucción) en el punto de reconoci-

miento de un específico enzima de restricción éste puede ser detectado gracias a la observación del perfil de restricción obtenido por el empleo de una sonda específica; c) la identificación de cualquier mutación puntual (cambio de una única base) mediante el empleo de los oligonucleótidos de síntesis, que tienen un origen químico y presentan gran especificidad, gracias al apareamiento de las hebras que constituyen la doble hélice del ADN y al pequeño tamaño de dichos oligonucleótidos (16-20 pares de bases), d) la búsqueda de la lesión genética por amplificación *in vitro* de la secuencia que contiene la región mutada empleando el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerasa Chain Reaction* o PCR), estrategia molecular que requiere un conocimiento exacto de la secuencia a amplificar.

En tanto que ello sea posible, el diagnóstico directo del defecto genético responsable de una determinada patología presenta un gran interés por su especificidad y fiabilidad aplicándose a un número creciente de patologías a medida que van identificándose los genes responsables de enfermedades genéticas.

Aplicaciones diagnósticas de las estrategias moleculares a la FQ

Diagnóstico prenatal

Diagnóstico indirecto

A partir de 1985 aparecen diversas referencias describiendo RFLP muy cercanos al gen de la fibrosis quística suponiendo la culminación de una larga y sistemática búsqueda de ligamiento entre marcadores genéticos indirectos ligados al gen FQ. En 1986, las sondas *met* y *pJ3.11* estando localizadas suficientemente cerca, de una y otra parte del gen FQ, permiten ya la realización de un diagnóstico prenatal por ligamiento indirecto mediante el método de Southern a partir de una muestra de ve-

llosidades coriónicas. Desde 1987, la situación mejora gracias a la descripción de las sondas XV-2c y KM.19 con tasas de recombinación cercanas a 0. De esta forma el análisis por ligamiento genético aporta un cierto número de ventajas siendo éstas principalmente su fiabilidad y su precocidad diagnóstica (antes de las 14 semanas de gestación). Sus límites son básicamente la existencia de familias no informativas (no se puede distinguir el cromosoma normal del cromosoma mutado), la posibilidad de recombinación génica y, por último, la necesidad de disponer de un caso afecto vivo o en su defecto material genético del mismo, requisito éste indispensable para la realización de un estudio molecular por ligamiento genético.

Diagnóstico directo

La identificación y aislamiento del gen FQ en septiembre de 1989 permitió el diagnóstico prenatal de la misma por detección directa de la mutación principal $\Delta F 508$. Para las parejas cuyo hijo afecto de fibrosis quística está vivo, este tipo de análisis otorga un doble beneficio: a) diagnóstico directo de la mutación siendo éstas informativas previamente con los marcadores moleculares; b) diagnóstico directo mediante biología molecular de la FQ sin ser las citadas familias previamente informativas con los marcadores moleculares. Sin embargo, la gran ventaja que supone el hallazgo de la mutación $\Delta F 508$ es la posibilidad de ofrecer un diagnóstico prenatal a parejas cuyo hijo afecto de fibrosis quística haya fallecido, con la condición de que ambos miembros de la pareja sean portadores heterocigotos de la mutación $\Delta F 508$ o de una cadena mutación FQ conocida.

El diagnóstico prenatal directo se ve además favorecido por el constante descubrimiento y hallazgo de nuevas mutaciones asociadas a la FQ referidas por el *Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium*.

Diagnóstico postnatal

El diagnóstico postnatal en un niño con

historia clínica sugestiva de fibrosis quística se basa esencialmente en los tests del sudor y de la tripsinainmunorreactiva (TIR). Sin embargo, estas valoraciones, no sólo no permiten conocer qué individuos dentro de la familia son portadores del gen mutado (heterocigotos) y, por lo tanto, posibles transmisores del mismo a sucesivas generaciones, sino tampoco la existencia de otros casos clínicamente asintomáticos, pero afectados. La biología molecular puede ser en determinados casos una ayuda básica en esta concreta detección.

Diagnóstico de portadores en familias con antecedentes de FQ

Los familiares en mayor o menor grado de un enfermo FQ, pueden haber heredado una de las copias mutadas del gen adquiriendo con ello la condición de portadores. De esta forma, los familiares de un caso afecto FQ, hermanos/as y tíos/as, tienen un riesgo de ser portadores sanos del gen patológico de 2/3 y 1/2 respectivamente.

Los estudios familiares moleculares realizados a partir de una muestra de ADN de todos los individuos de la familia permitirá en la mayoría de los casos, gracias al análisis indirecto con marcadores genéticos (sondas) o al análisis directo de la mutación $\Delta F 508$ u otras mutaciones asociadas a la FQ conocer: a) qué otros individuos de esta familia pudieran estar afectados; b) los individuos heterocigotos y por lo tanto posibles transmisores del gen patológico y c) los individuos homocigotos sanos, que no han heredado ninguna copia mutada del mismo.

De esta forma, el estudio familiar molecular tendrá una gran importancia para el asesoramiento genético y un posible futuro diagnóstico prenatal en algún miembro de una familia con riesgo de patología FQ.

Diagnóstico de FQ en pacientes sin antecedentes familiares

La detección directa de la mutación $\Delta F 508$ u otras mutaciones descritas como asociadas a la FQ es fundamental ya que:

a) si la mutación es detectada en estado homocigoto, el diagnóstico de FQ es concluyente; b) si la mutación es detectada en estado heterocigoto con una mutación no descrita (mutación/x), o no detectada (x/x) su interés diagnóstico disminuye mucho. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la probabilidad de que el niño esté afecto no es nula y debe calcularse basándose en su origen étnico ya que esta probabilidad no es la misma en todos los países dependiendo ésta, de una parte, de la incidencia de la enfermedad y de otra, de la frecuencia de la mutación $\Delta F 508$ en el país de origen del niño.

Pacientes

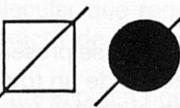
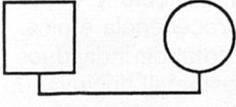
En el presente trabajo se presenta el estudio a nivel molecular de un total de 12 familias que tenían al menos un caso afecto de fibrosis quística con un diagnóstico clínico de certeza (ver árboles genealógicos). Las muestras procedentes de la Conselleria de Sanidad del Govern Balear y del Hospital Son Dureta de Palma de Mallorca fueron remitidas a la *Unité 73 (Génétique et Pathologie Foetale)* del *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* en París (Francia) donde se realizó el correspondiente análisis molecular, fundamento del presente trabajo.

En dichos Centros Hospitalarios, durante la consulta clínica de asesoramiento genético fue establecida la exacta genealogía del individuo afecto y de su familia así como su procedencia étnica.

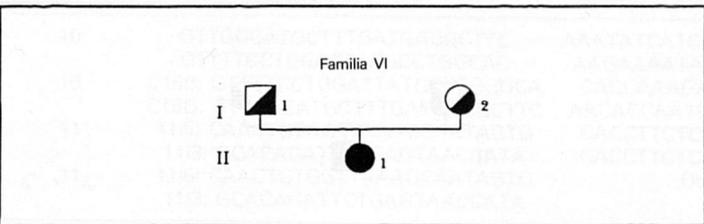
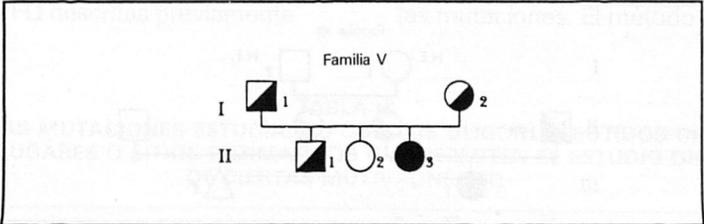
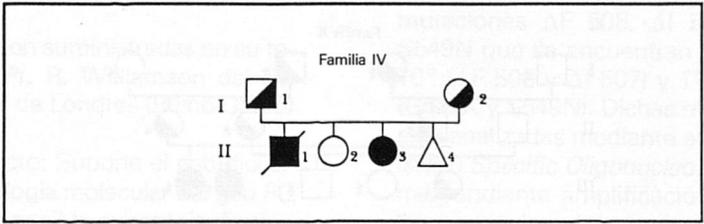
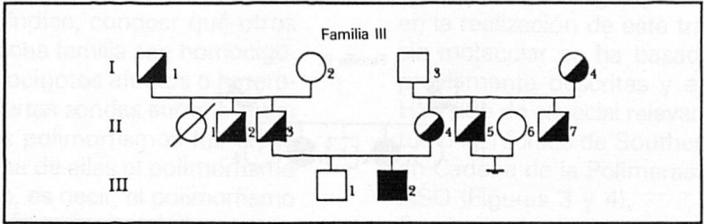
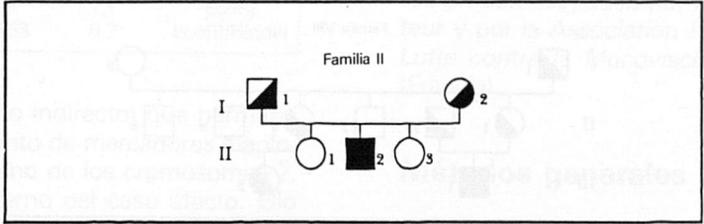
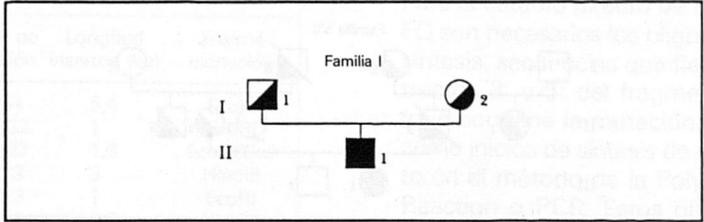
El número total de individuos analizados (estudio postnatal), incluyendo los casos índices así como progenitores y familias directas fue de 79 individuos. De estos, 14 eran individuos afectados existiendo 2 familias que presentaban más de un caso FQ. Para realizar el análisis molecular de las 12 familias se han empleado dos estrategias básicas:

a) Estudio indirecto: Supone el estudio del patrón de segregación de los polimorfismos del ADN (RFLP) detectables mediante la técnica de Southern con sondas extra-

Simbología de los árboles genealógicos

	Varón
	Hembra
	Individuos enfermos
	Individuos heterocigotos (portadores)
	Individuos fallecidos
	Diagnóstico prenatal
	Haplotipos FQ
	Aborto espontáneo
I, II, III, ... 1, 2, 3, ...	Identificación de individuos
	Unión biológica
N.E.	Individuo no estudiado
I.M.	Íleo meconial
	No descendencia

2.1.2. Árboles genealógicos de las familias FQ.



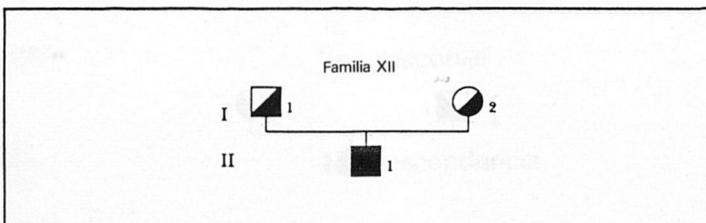
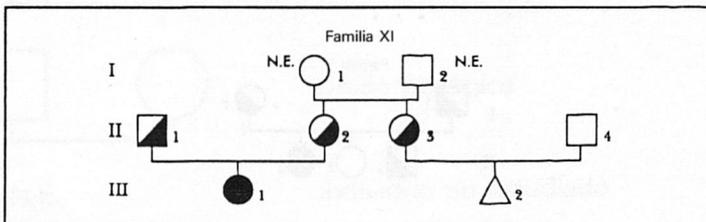
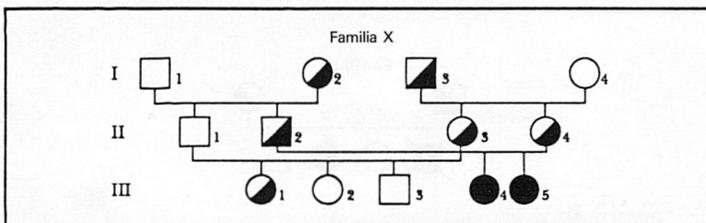
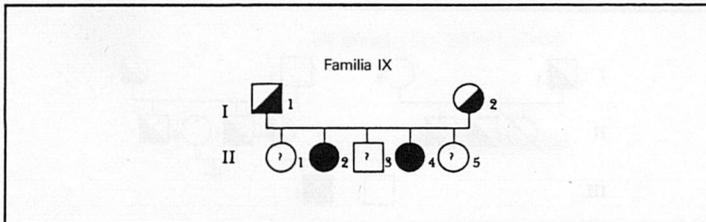
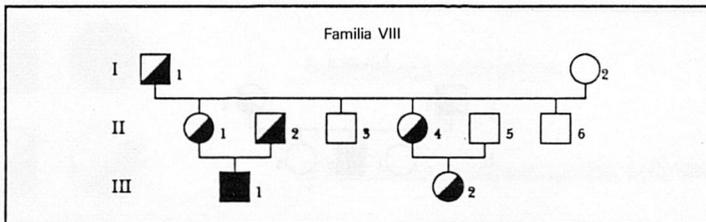
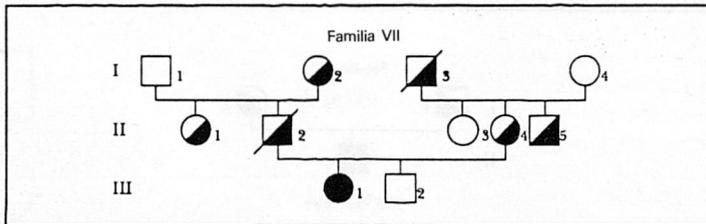


TABLA II
DESCRIPCIÓN DE LAS SONDAS
EMPLEADAS EN EL MÉTODO INDIRECTO

Sondas	Vector de clonación	Longitud insertos (kb)	Enzima clonación
7c.22	pSP64	5,4	EcoRI
met D	pBR322	1	EcoRI
met H	pBR322	1,6	EcoRI/Sall
XV-2c	pUC13	3	HindIII
KM.19	pUC13	1	EcoRI
pMP6d-9	pUC13	2,6	HindIII
pT-3	pSP6	1,1	EcoRI
pJ3.11	pAT153	0,7	EcoRI/HindIII

génicas (estudio indirecto) que permiten definir el conjunto de marcadores (haplotipo) en cada uno de los cromosomas 7, paterno y materno del caso afecto. Ello permitirá, en las familias informativas, a partir del caso índice, conocer qué otros individuos en dicha familia son homocigotos sanos, homocigotos afectados o heterocigotos. Para ciertas sondas aunque están descritos varios polimorfismos fue elegido para cada una de ellas el polimorfismo más informativo, es decir, el polimorfismo para el cual las frecuencias alélicas están equilibradas.

Las sondas fueron suministradas en su totalidad por el Pr. R. Williamson del *St. Mary's Hospital* de Londres (Reino Unido) (Tabla II).

b) Estudio directo: Supone el estudio directo de la patología molecular del gen FQ identificando la posible existencia de ciertas mutaciones FQ descritas previamente

por el *Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (Canadá)*.

Para el estudio directo de las mutaciones FQ son necesarios los oligonucleótidos de síntesis, secuencias que flanquean los extremos 3' y 5' del fragmento a estudiar (que contiene la mutación) y que actúan como inicios de síntesis de dicho fragmento en el método de la Polymerase Chain Reaction o PCR. Estos oligonucleótidos fueron suministrados por el *Institut Pasteur* y por la *Association Française de la Lutte contre la Mucoviscidose* de París (Francia).

Métodos generales

Toda la metodología que se ha empleado en la realización de este trabajo de análisis molecular se ha basado en técnicas previamente descritas y estandarizadas. Han sido de especial relevancia en este estudio la Técnica de Southern, la Reacción en Cadena de la Polimerasa, y la Técnica ASO (Figuras 3 y 4).

En el estudio directo se han analizado las mutaciones ΔF 508, ΔI 507, G542X y S549N que se encuentran en los exones 10° (ΔF 508 y ΔI 507) y 11° del gen FQ (G542X y S549N). Dichas mutaciones han sido analizadas mediante el método ASO (*Allele Specific Oligonucleotide*) tras la correspondiente amplificación por PCR de las secuencias génicas que contienen a estas mutaciones. El método ASO consiste

TABLA III
LISTA DE LAS MUTACIONES ESTUDIADAS CON LOS OLIGONUCLEÓTIDOS DE SÍNTESIS
Y LOS LUGARES O SITIOS ENZIMÁTICOS QUE PERMITEN EL ESTUDIO DIRECTO
DE CIERTAS MUTACIONES FQ

Mutación	Exón	Cebadores 5' -> 3'	Lugares o sitios enzimáticos
ΔI 507	10	GTTGGCATGCTTTGATGACGCTTC GTTTTCTGGATTATGCCTGGCAC	AAATATCATCTTTGGTGTTC AAGAAAATATCTTTGGTGT
ΔF 508	10	C16B: GTTTCTGGATTATGCCTGGGCA C16D: GTTGGCATGCTTTGATGACGCTTC	CACCAAAGATGATATTTT AACACCAATGATATTTTCTT
G542X	11	11i5: CAACTGTGGTTAAAGCAATAGTG 11i3: GCACAGATTCTGAGTAACCATA	CACCTTCTCCAAGAACTA CACCTTCTCAAAGAACTA
S549N	11	11i5: CAACTGTGGTTAAAGCAATAGTG 11i3: GCACAGATTCTGAGTAACCATA	Dde I

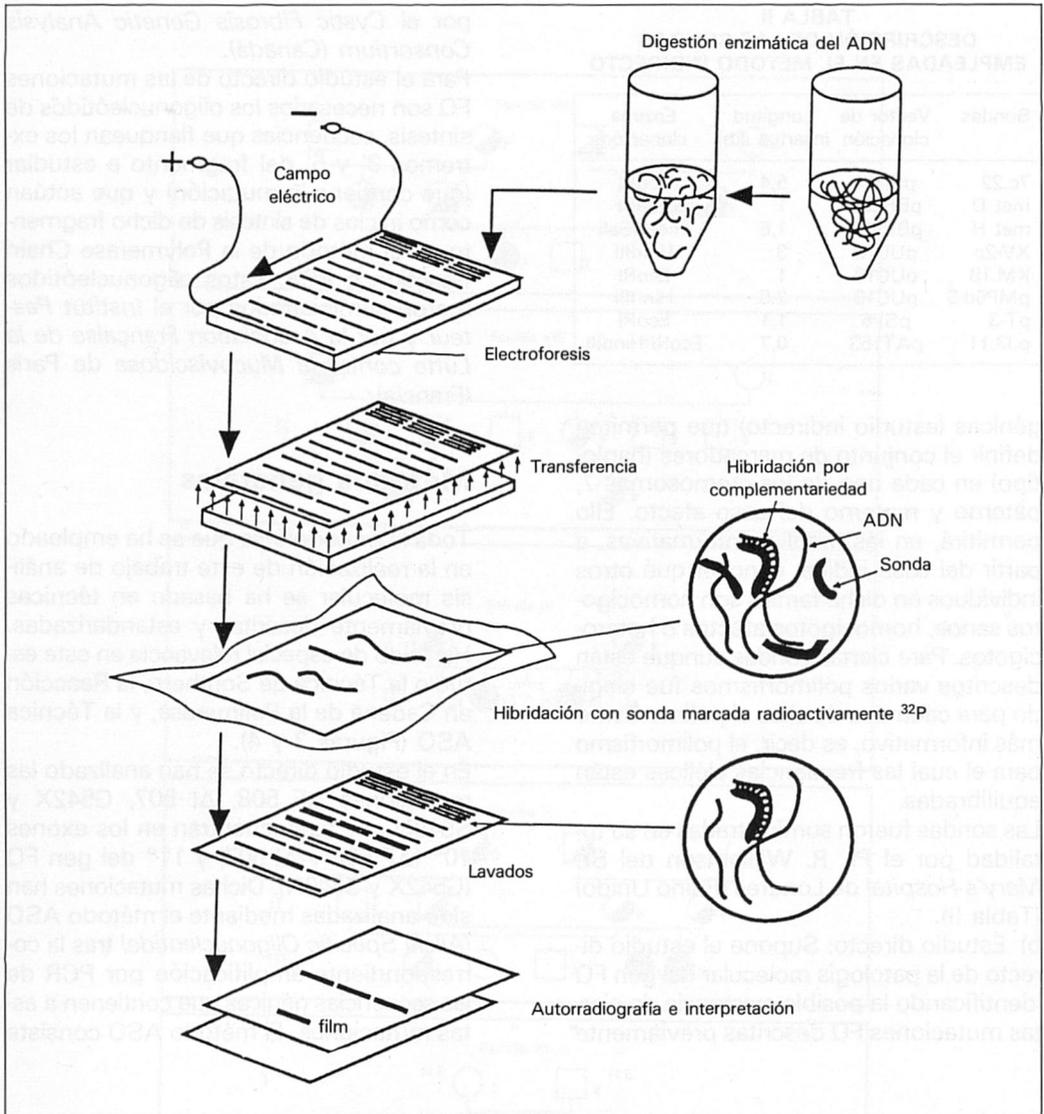


Figura 3. Principio de la técnica de Southern.

en depositar el ADN genómico amplificado y convenientemente desnaturizado sobre una membrana de nylon e hibridarlo sucesivamente con una secuencia específica de la mutación y su correspondiente secuencia normal (Tabla III).

Estudio postnatal

El estudio molecular postnatal (análisis in-

directo y directo) en las familias estudiadas, cuyos árboles genealógicos han sido convenientemente detallados en este trabajo, reveló la presencia de 40 portadores heterocigotos del gen FQ patológico y por lo tanto posibles transmisores del mismo a su descendencia, 22 individuos homocigotos sanos (no transmisores) y 14 individuos homocigotos afectos. De igual forma, 5 de las 12 familias FQ so-

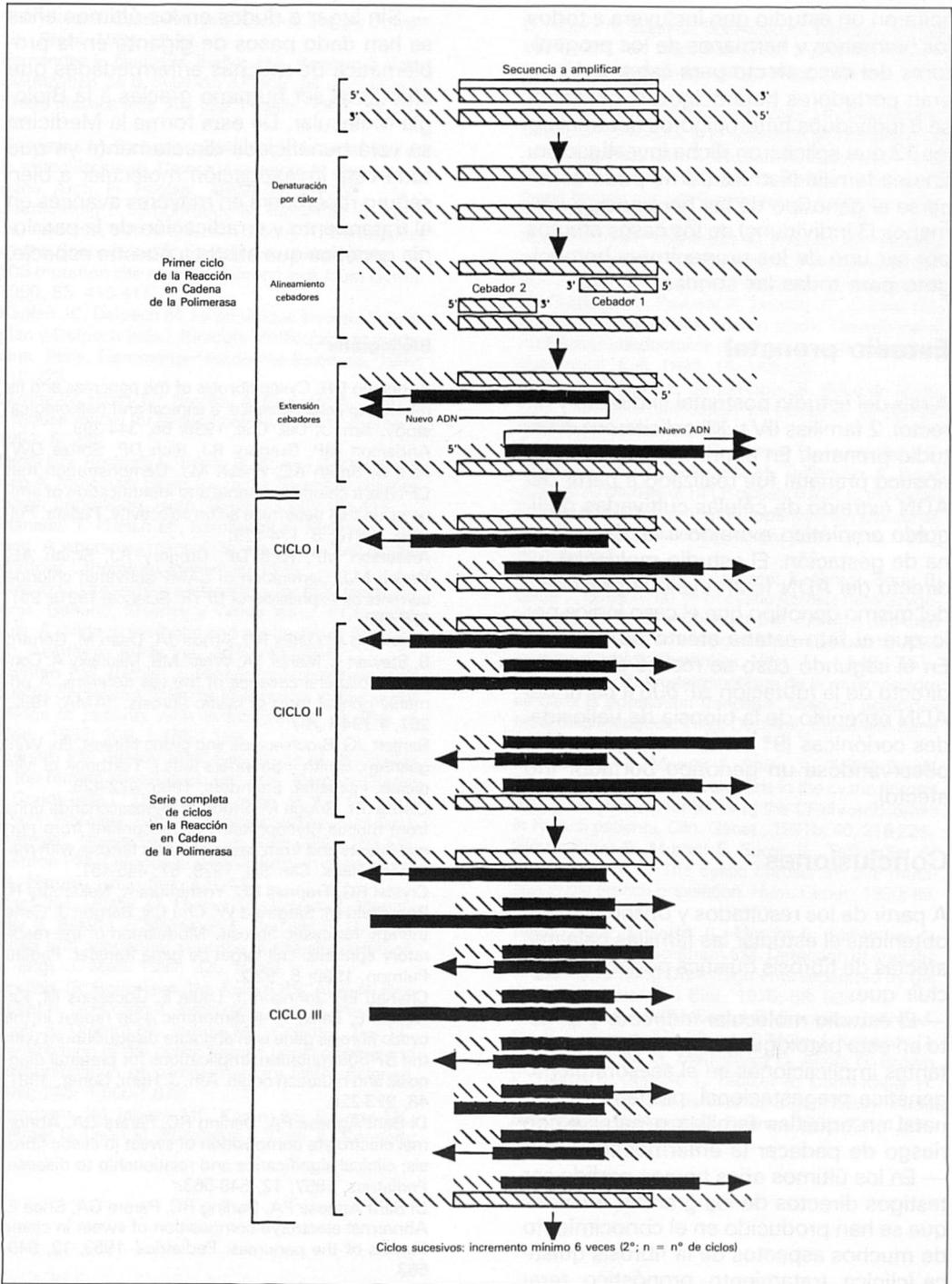


Figura 4. Esquema representativo del método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction o PCR).

licitaron un estudio que incluyera a todos los hermanos y hermanas de los progenitores del caso afecto para saber quiénes eran portadores heterocigotos, hallándose 8 individuos heterocigotos del total de los 12 que solicitaron dicha investigación. En una familia (Familia IX) no pudo conocerse el genotipo de las hermanas y hermanos (3 individuos) de los casos afectos por ser uno de los progenitores homocigoto para todas las sondas.

Estudio prenatal

A raíz del estudio postnatal (indirecto y directo), 2 familias (IV y XI) solicitaron un estudio prenatal. En el primer caso el diagnóstico prenatal fue realizado a partir del ADN extraído de células cultivadas de líquido amniótico extraído a la 15ª semana de gestación. El estudio molecular indirecto del ADN fetal reveló la presencia del mismo genotipo que el caso índice por lo que el feto estaba afecto de FQ.

En el segundo caso se realizó el estudio directo de la mutación $\Delta F 508$ a partir del ADN obtenido de la biopsia de vellosidades coriónicas (9ª semana de gestación) observándose un genotipo portador (no afecto).

Conclusiones

A partir de los resultados y observaciones obtenidas al estudiar las familias baleares afectas de fibrosis quística podemos concluir que:

— El estudio molecular indirecto y directo en esta patología genética tiene importantes implicaciones en el asesoramiento genético pregestacional, prenatal y postnatal en aquellas familias o parejas con riesgo de padecer la enfermedad.

— En los últimos años hemos podido ser testigos directos de los grandes avances que se han producido en el conocimiento de muchos aspectos de la fibrosis quística (clínica, tratamiento, pronóstico, terapia...) gracias en gran parte a la genética molecular.

— Sin lugar a dudas en los últimos años se han dado pasos de gigante en la problemática de muchas enfermedades que afectan al ser humano gracias a la Biología Molecular. De esta forma la Medicina se verá beneficiada directamente ya que toda esta investigación molecular a bien seguro repercutirá en mayores avances en el tratamiento y erradicación de la patología genética que afecta a nuestra especie.

Bibliografía

- Andersen DH. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathological study. *Am. J. Dis. Chil.* 1938; 56, 344-399.
- Anderson MP, Gregory RJ, Rich DP, Souza DW, Paul S, Smith AE, Welsh MJ. Demonstration that CFTR is a chloride channel and identification of amino acids that determine anion selectivity. *Pediatr. Pulmon* 1991b; 6, 174-175.
- Anderson MP, Rich DP, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ. Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR. *Science*, 1991a; 251: 679-682.
- Anguiano A, Oates RD, Amos JA, Dean M, Gerrard B, Stewart C, Maher TA, White MB, Milunsky A. Congenital bilateral absence of the vas deferens. A primarily genital form of cystic fibrosis. *JAMA*, 1992; 267, 1.794-1.797.
- Bartlett JG. Brochiectasis and cystic fibrosis. En: Wingaarden, Smith y Saunders (eds.). *Textbook of Medicine*. Filadelfia, Saunders, 1985; 422-425.
- Clamp JR, Gough M. Study of oligosaccharide units from mucus glycoproteins of meconium from normal infants and from cases of cystic fibrosis with meconium ileus. *Clin Sci*, 1979; 57: 445-451.
- Crystal RG, Trapnell BC, Yoshimura K, Nakamura H, Rosenfeld M, Siegfried W, Chu CS, Bargon J. Gene therapy for cystic fibrosis. Modulation of the respiratory epithelial cell target by gene transfer. *Pediatr Pulmon*, 1990; 5, S2.2.
- Chehab EF, Johnson J, Louie E, Goossens M, Kawasaki E, Erlich H. A dimorphic 4-bp repeat in the cystic fibrosis gene is in absolute disequilibrium with the $\Delta F 508$ mutation: implications for prenatal diagnosis and mutation origin. *Am. J. Hum. Genet.*, 1991; 48, 223-226.
- Di Sant'Agnese PA, Darling RC, Perera GA. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis; clinical significance and relationship to disease. *Pediatrics*, 1957; 12, 549-563.
- Di Sant'Agnese PA, Darling RC, Perera GA, Shea E. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. *Pediatrics*, 1953; 12, 549-563.
- Di Sant'Agnese PA, Davis PB. Cystic fibrosis in adults. *Am. J. Med.* 1979; 66, 121.
- Dodge JA. Management of cystic fibrosis. En: Good-

- fellow (eds.). Cystic Fibrosis. Oxford, Oxford University Press, 1989; 12-23.
- Fernández E, Nunes V, Ibáñez MA, Benítez J. Valor diagnóstico de la delección ΔF 508 del gen de la fibrosis quística (FQ). *An. Esp. Pediatr.*, 1991; 35, 307-308.
- Goossens M. Biologie et pathologie moléculaires de la mucoviscidose. Dewux ans après le clonage du gène. *Arch. Fr. Pediatr.*, 1992; 49, 329-331.
- Jaume-Roig B, Simon-Bouy B, Taillandier A, Serre JL, Antich J, Bellón J, Boué J, Boué A. Genotyping of the Spanish cystic fibrosis population at the ΔF 508 mutation site and RFLP linked loci. *Hum Genet*, 1990; 85: 410-411.
- Kaplan JC, Delpech M. La génétique inverse. En: Kaplan y Delpech (eds.). *Biologie moléculaire et médecine*. Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 1990; 210-223
- Lemna W, Hasty EP, Bradley A, Beaudet A. Toward a mouse model for cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmon.*, 1991; 6, 236.
- Leoni GN, Rosatelli C, Sardu R, Scarpa G, Silvetti M, Cao A. Molecular bases for cystic fibrosis in the Sardinian population. *Hum. Genet.*, 1990; 85: 415.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Nueva York, Cold Spring Harbour Laboratory Publishers 1986.
- Orrego C. Organizing a laboratory for PCR work. En: Innis, Gelfand, Sninsky y White (eds.). *PCR protocols. A guide to methods and applications*. San Diego, Academic Press Inc., 1990; 447-454.
- Quinton PM, Bijman J. Higher bioelectric potentials due to decreased chloride absorption in the sweat glands of patients with cystic fibrosis. *N. Eng. J. Med.*, 1983; 308, 1.185-1.189.
- Quinton PM, Reddy MM. Regulation of absorption in the human sweat duct. En: Tsui, Romeo, Greger y Gorini (eds.). *The identification of the CF gene (Cystic Fibrosis). Recent progress and new research strategies*. Nueva York, Plenum Press, 1991; 159-172.
- Quinton PM. Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature*, 1983; 301, 421-422.
- Rigot JM, Lafitte JJ, Dumur V, Gervais R, Manouvrier S, Biserte J, Mazeman E, Roussel P. Cystic fibrosis and congenital absence of the vas deferens. *N. Engl. J. Med.* 1991; 325, 64-65.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins F, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterisation of complementary DNA. *Science*, 1989; 245: 1.066-1.072.
- Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem BS, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan JR, Tsui LC, Collins FS. Identification of the cystic fibrosis: chromosome walking and jumping. *Science*, 1989; 245: 1.059-1.065.
- Rosenfeld MA, Yoshimura K, Stier LE, Trapnell BC, Stratford-Perricaudet LD, Perricaudet M, Dalemans W, Jallat S, Mercendier A, Pavirani A, Lecocq JP, Guggino WB, Crystal RG. In vivo transfer of the human cystic fibrosis gene to the respiratory epithelium. *Clin. Res.*, 1991; 39: 311A.
- Rosenfeld MA, Yoshimura K, Trapnell BC, Yoneyama K, Rosenthal ER, Dalemans W, Fukayama M, Bargon J, Stier LE, Stratford-Perricaudet L, Perricaudet M, Guggino W, Pavirani A, Lecocq JP, Crystal RG. In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. *Cell*, 1992; 10, 143-155.
- Serre JL, Mornet E, Simon-Bouy B, Boué A. Multiplex PCR co-amplification of exons 4, 7, 10, 11. *ECCFC Newsletter*, 1990; 1, 4.
- Serre JL, Simon-Bouy B, Mornet E, Jaume-Roig B, Balassopoulou A, Schwartz M, Taillandier A, Boué J, Boué A. Studies of RFLP closely linked to the cystic fibrosis locus throughout Europe lead to new considerations in populations genetics. *Hum. Genet.* 1990; 84, 449-454.
- Serre JL, Taillandier A, Mornet E, Simon-Bouy B, Boué J, Boué A. 80 % of cystic fibrosis heterozygotes and 64 % of couples at risk may be detected through a unique screening of four mutations by ASO reverse dot blot. *Genomics*, 1991; 11, 1.149-1.151.
- Simon-Bouy B. *Étude génétique de la mucoviscidose dans la population française. Mise au point des tests diagnostiques*. Tesis Doctoral. Université René Descartes. Paris 1991a.
- Simon-Bouy B, Mornet E, Serre JL, Taillandier A, Boué J, Boué A. Nine mutations in the cystic fibrosis (CF) gene account for 80 % of the CF chromosomes in French patients. *Clin. Genet.*, 1991b; 40, 218-224.
- Simon-Bouy B, Mornet E, Serre JL, Taillandier A, Boué J, Boué A. The cystic fibrosis ΔF 508 mutation in the French population. *Hum. Genet.*, 1990; 85, 431-432.
- Simon-Bouy B, Serre JL, Mornet E, Taillandier A, Boué J, Boué A, Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Mol Biol.*, 1975; 98: 503-717.
- Tsui LC, Buchwald M, Barker D, Braman JC, Knowlton R, Schumm JW, Eiberg H, Mohr J, Kennedy D, Plavsic N, Zsiga M, Markiewicz D, Akots G, Brown V, Helms C, Gravius T, Tediker K, Donis-Keller H. Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science*, 1985; 230, 1.054-1.057.