

## Original

# Aplicación de la biología molecular a la detección de portadores de fibrosis quística de páncreas

B. Jaume Roig,<sup>\*</sup><sup>\*\*</sup> B. Simon-Bouy,<sup>\*\*</sup>  
A. Taillandier,<sup>\*\*</sup> J. Boué,<sup>\*\*</sup> A. Boué<sup>\*\*</sup>

## Resumen

Desde hace unos años, la tecnología del ADN recombinante ofrece un nuevo camino para investigar las enfermedades genéticas. De una forma discreta pues, las técnicas de la biología molecular van entrando paulatinamente en la medicina práctica, y si su campo de aplicación (prevención, diagnóstico...) es aún limitado, el clínico debe ya interesarse y conocer los diferentes aspectos beneficiosos que esa nueva tecnología puede aportar a la genética humana.

En este trabajo de investigación, se presenta una de sus múltiples aplicaciones, como es la detección de portadores heterocigotos en familias con individuos afectados de fibrosis quística de páncreas o mucoviscidosis.

\* Laboratorio de Genética. Pabellón Materno-Infantil. Hospital Son Dureta. C/ Andrea Doria, 55. 07014 Palma de Mallorca.

\*\* Unité 73. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. Château de Longchamp. Bois de Boulogne. 75016 Paris (Francia).

## Introducción

La fibrosis quística de páncreas (FQ), es una enfermedad monogénica de herencia autosómica recesiva. Es decir, los padres de un individuo afecto FQ son portadores obligados del cromosoma alterado. Su frecuencia en la población caucásica es de 1/2.500 recién nacidos vivos, siendo 1 adulto de cada 25, portador del gen anómalo.

El gen, cuya(s) mutación(es) produce(n) la enfermedad se ha localizado en el brazo largo del cromosoma 7 (7q.31).<sup>1-3</sup> Su defecto bioquímico se desconoce actualmente, creyéndose relacionado con la regulación del transporte de aniones en la membrana epitelial.<sup>4, 5</sup>

Las manifestaciones clínicas de la FQ se caracterizan por ser altamente variables, siendo básicamente de 2 tipos: respiratorias (broncopatía crónica obstructiva) y/o digestivas.<sup>8</sup>

Enfermedad heterogénea, las manifestaciones respiratorias no se encuentran presentes siempre desde el inicio de la enfermedad (que puede ser simplemente digestiva), pero aparecen con el tiempo en la mayoría de los casos (85%) y condicionarán el mal pronóstico en más de un 95% de los afectados. Una sintomatología respiratoria evocadora de FQ será tos crónica, disnea y bronquitis infecciosas y/o asmátiformes, marcadas sobre todo por su carácter recidivante. Las alteraciones digestivas están caracterizadas básicamente por un síndrome de malabsorción con diarrea crónica, responsable del retraso estaturponderal, que contrasta con el apetito voraz largo tiempo conservado. Las deposiciones son abundantes, pastosas, brillantes y malolientes. Otros síntomas digestivos serán: íleo meconial en período neonatal, con cuadro clínico de oclusión intestinal (10-15%),<sup>6, 7</sup> retraso en la eliminación del meconio y prolapso rectal. Si bien, en la mayoría de los casos, el cuadro clínico aparece en los primeros meses de vida o dentro del primer año, hay descritas formas tardías de la enfermedad. Finalmente, varios exámenes paraclínicos

serán de gran utilidad para un claro diagnóstico:

— Test del sudor. Es básica una perfecta técnica y puesta a punto para descartar los falsos positivos, requiriéndose un mínimo de 2-3 tests para confirmar el diagnóstico. En la FQ, se considera valor patológico un valor de cloro superior a 60 mEq/l.

— Esteatorrea. Confirma la maldigestión lipásica (valor normal: <3 gr./24 hrs.; FQ: >4-5 grs./24 hrs.).

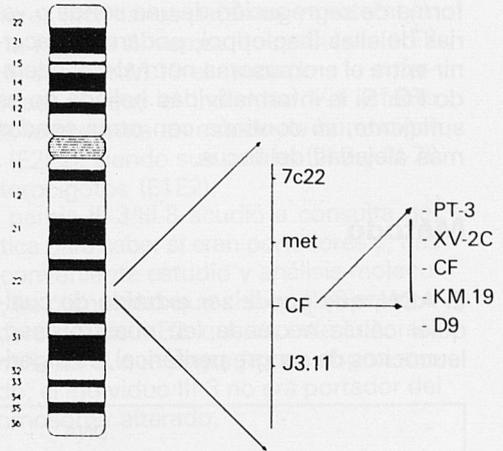
— Determinación neonatal de la tripsina inmunorreactiva.

— Una radiografía torácica permitirá apreciar el estado pulmonar.

Sin embargo, ninguna de dichas manifestaciones y/o pruebas permiten conocer qué individuos, dentro de una familia con un individuo afecto FQ, son portadores del cromosoma alterado. Hay que tener en cuenta que los hermanos de un afecto FQ, tienen un riesgo mayor de ser portadores que la población normal.

Es a partir de la localización en el año 1985, del gen de la FQ, en 7q.31, y gracias a técnicas de genética molecular cuando se realizan más avances en la investigación de la FQ. No ha sido posible hasta ahora conocer el defecto genético responsable de la FQ y no puede realizarse por lo tanto un análisis directo del gen. Sin embargo, puede analizarse de forma indirecta mediante el estudio de sondas moleculares que están muy cerca de dicho locus génico. El estudio con estas sondas moleculares cercanas al gen en familias con un individuo afecto FQ permite, siguiendo la segregación de dichas sondas (marcadores) conocer de que forma se ha transmitido (segregado) la mutación y, con ello, conocer qué individuos dentro de la familia son portadores.

En el esquema 1, se observa el idiograma del cromosoma 7 con algunas de las sondas moleculares que flanquean de uno y otro lado el locus CF (FQ), así como las sondas empleadas en este estudio y las endonucleasas o enzimas de restricción que posibilitan, mediante el reconocimiento de un determinado polimorfismo bialélico, la conveniente interpretación molecular.



CROMOSOMA 7

TABLA I

SONDAS	ENDONUCLEASAS	ALELOS
7c22	Eco RI	1: 7,2 Kb 2: 5,1 Kb
met D	Taq I	1: 5,0 Kb 2: 4,0 Kb
met H	Taq I	1: 7,0 Kb 2: 4,2 Kb
PT-3	Ban II	1: 0,6 Kb 2: 0,5 kb
XV-2c	Taq I	1: 2,1 Kb 2: 1,4 Kb
KM.19	Pst I	1: 7,8 Kb 2: 6,6 Kb
J3.11	Msp I	1: 4,2 Kb 2: 1,8 Kb

Para un estudio familiar dos requisitos son fundamentales:

— Tener un claro diagnóstico clínico de la enfermedad.

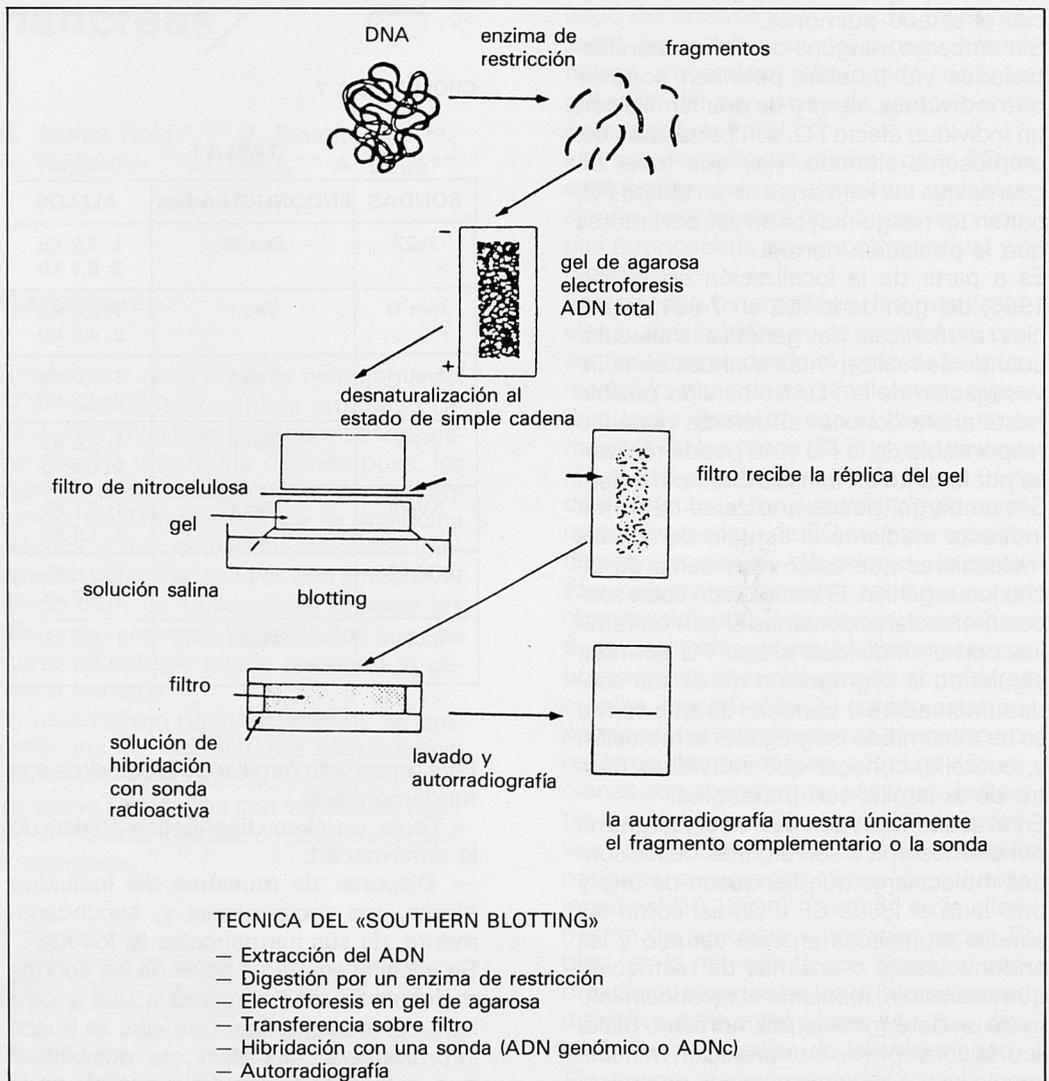
— Disponer de muestras del individuo afecto, sus progenitores y, secundariamente, de sus hermanos/as (si los hay). Se inicia el estudio a partir de las sondas moleculares más cercanas a uno y otro lado del locus génico. Con ello, se busca *informatividad*, es decir, la posibilidad que, mediante el estudio y análisis de la

forma de segregación de una sonda o varias de ellas (haplotipo), podamos discernir entre el cromosoma normal y el alterado FQ. Si la informatividad hallada no es suficiente, se continúa con otras sondas más alejadas del locus.

## Método

El ADN, que puede ser extraído de cualquier célula nucleada (en nuestro caso, leucocitos de sangre periférica), es digeri-

do con las enzimas de restricción Taq I, Pst I, Msp I y Ban II, según técnicas ya descritas.<sup>5</sup> Tras la separación electroforética en geles de agarosa al 0,8%, los fragmentos de ADN son transferidos a un soporte sólido (nylon o nitrocelulosa), y se hibridan con las sondas met D, met H, XV-2c, KM.19, J3.11 y pT-3 marcadas radioactivamente. Tras la conveniente autorradiografía podrán estudiarse los Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (FRLP) que nos permitirán realizar el diagnóstico molecular (Tabla II).



## Resultados

Como ejemplo de aplicación de las técnicas descritas, se presentan en este trabajo, el análisis molecular de 2 familias que tenían, al menos, un caso-índice FQ. Dicho estudio forma parte de un más amplio trabajo de investigación realizado en familias españolas afectas de tal patología, procedentes mayoritariamente de la Cuenca Mediterránea Española (Cataluña, Valencia, Murcia...) así como las poblaciones insulares (Baleares y Canarias).

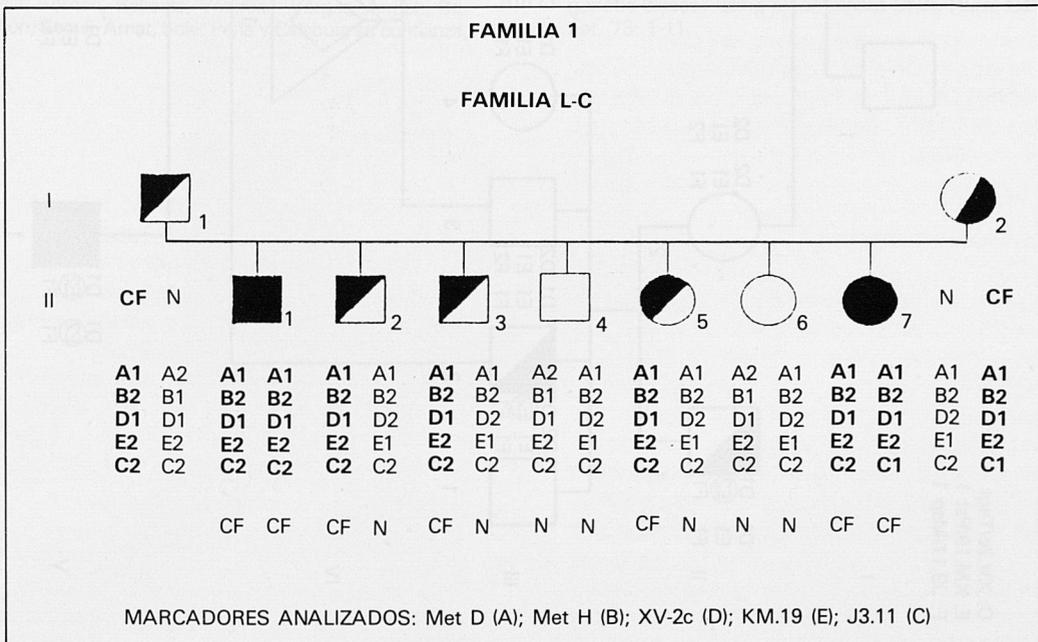
En la **familia 1 (familia L-C)**, la determinación de los haplotipos con 5 sondas moleculares ha permitido identificar, dentro de una misma fratría, los dos cromosomas 7 portadores de la mutación, y en consecuencia, seguir la segregación del gen. Así, los individuos II-1 y II-7 son homocigotos afectados FQ, mientras que los individuos II-2, II-3 y II-5, así como los individuos II-4 y II-6 son heterocigotos paternos y homocigotos sanos respectivamente. Sin embargo, no sólo es importante la detección de portadores del cromosoma mutado en la misma fratría del caso afecto FQ, sino también en las generaciones an-

teriores (hermanos paternos y maternos). En la **familia 2**, vemos que es el alelo E2 de la sonda KM.19 el asociado a la enfermedad, ya que el individuo V-1 (afecto FQ), lo presenta en estado de homocigosis (E2E2), siendo sus padres (III-2 y III-7), heterocigotos (E1E2).

La pareja III-3/III-8 acudió a consulta genética para saber si eran portadores y, tras el conveniente estudio y análisis molecular, se comprobó que si bien III-8 era portadora del alelo E2, que en esta concreta familia es el que segrega con el gen mutado, el individuo III-3 no era portador del cromosoma alterado.

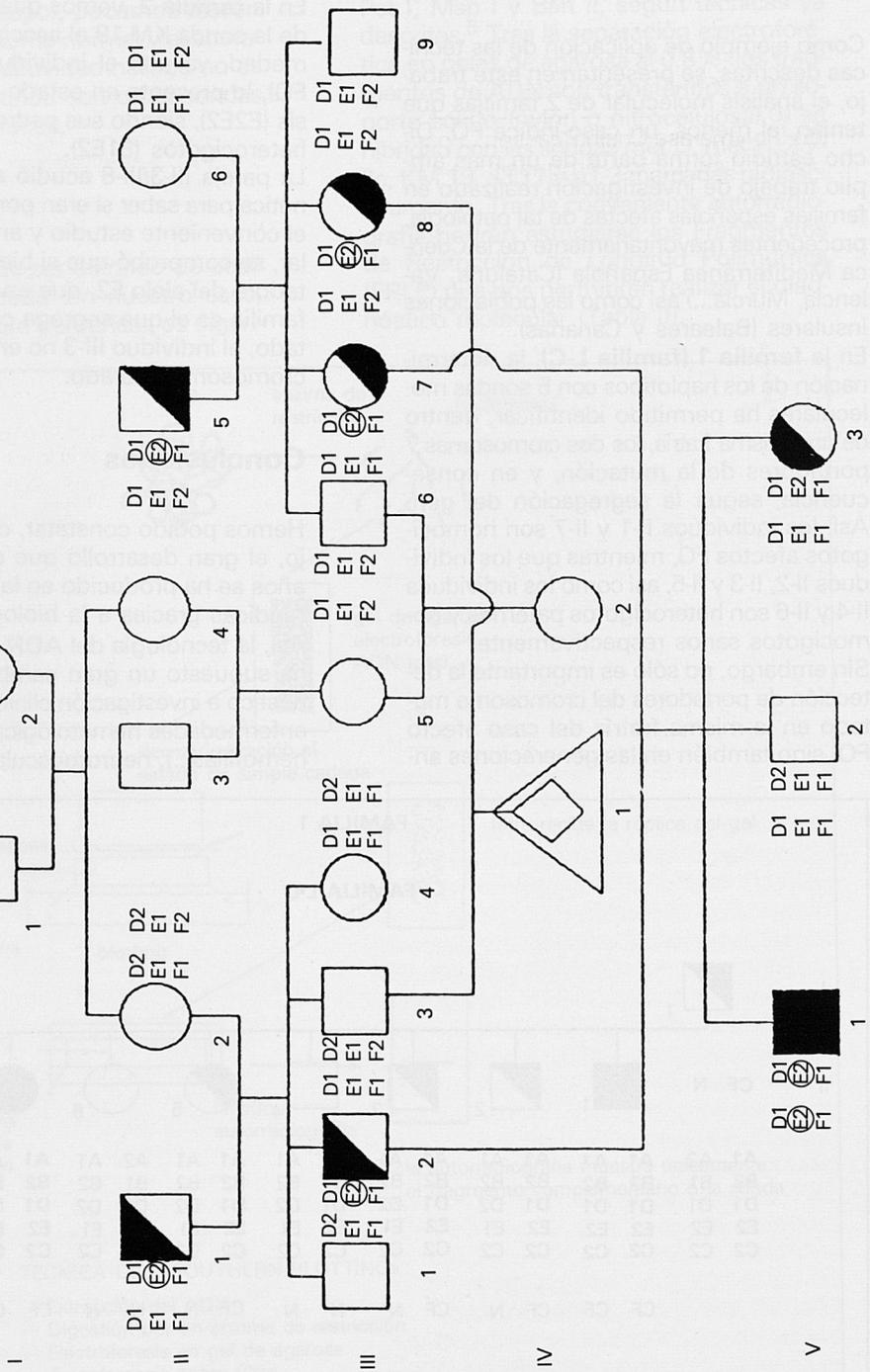
## Conclusiones

Hemos podido constatar, con este trabajo, el gran desarrollo que en los últimos años se ha producido en las ciencias biomédicas gracias a la biología molecular. Así, la tecnología del ADN recombinante ha supuesto un gran cambio en el diagnóstico e investigación clínico-biológica de enfermedades hematológicas (talasemias, hemofilias...), neuromusculares (distrofias



FAMILIA 2

D: XV.2c/TaqI  
 E: KM.19/Pst 1  
 F: J3.11/Msp 1



de Duchenne-Bécker...), oncológicas...<sup>10</sup> Sin embargo, en muchas de ellas (Corea de Huntington, neurofibromatosis, poliquistosis renal, atrofia espino-muscular...), se continúa investigando mediante esta tecnología y otras nuevas que van apareciendo (Polymerase Chain Reaction...) para mejorar el diagnóstico, prognosis y posible terapia, todo ello tendente a mejorar la calidad de vida del paciente.

La genética molecular ha dado, a lo largo de estos años, prueba del gran potencial que representa, de ahí el necesario apoyo, dentro de un marco objetivo de investigación-diagnóstico que a dicha biotecnología debería dársele para su aprovechamiento y desarrollo.

## Agradecimientos

Quiero expresar mi personal agradecimiento a la Obra Social de la Caja de Ahorros de Baleares, Sa Nostra, por su ayuda para la realización de este trabajo en la Unité 73 del Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale en París bajo la dirección del Prf. André Boué. Agradezco asimismo a los Dres. García, Román, Ballesta, Vázquez, Vargas, Antich, Bellón, Seculi, Amat, Solé, Peña y Calabuig su confianza,

interés y dedicación al remitirnos familias afectadas de FQ desde varios puntos de nuestro país para su análisis molecular.

## Bibliografía

1. White R, Woodward S, Leppert M y cols. (1985). A closely linked genetic marker for cystic fibrosis. *Nature* 318: 382-384.
2. Waingwright B, Scambler P, Schmidtke J y cols. (1985). Localization of cystic fibrosis locus to human chromosome 7 cen-q22. *Nature* 318: 384-385.
3. Estivill X, Farrall M, Scambler PJ y cols. (1987a). A candidate for the cystic fibrosis locus isolated by selection for methylation-free islands. *Nature* 326: 840-845.
4. Knowles y cols. (1983). Relative ion permeability of normal and cystic fibrosis nasal epithelium. *J. Clin. Invest.* 71: 1410-1417.
5. Quinton PM y cols. (1983). Higher bioelectric potentials due to decreased chloride absorption in the sweat glands of patients with cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 308: 1185-1189.
6. Mornet E, Simon-Bouy B, Serre JL y cols. (1988). Genetic differences between cystic fibrosis with and without meconium ileus. *Lancet* i: 376-378.
7. Mornet E, Simon-Bouy B, Serre JL y cols. (1989). Genetic heterogeneity between two forms of cystic fibrosis evidenced by familial analysis and linked DNA probes. *Clinical Genetics* 35: 81-87.
8. Lloyd-Still J. (1983). *Textbook of cystic fibrosis*. John Wtight, PSG, Boston.
9. Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. NY, Cold Spring Harbor Laboratory.
10. Cooper DN y Schmidtke J. (1986). Diagnosis of genetic disease using recombinant DNA. *Hum. Genet.* 73: 1-11.