

CARACTERIZACION DE TRES MICROSATELITES DEL GEN DE FIBROSIS QUISTICA EN FAMILIAS ARGENTINAS

ALICIA A. VISICH, CRISTINA Z. BARREIRO, LILIE P. CHERTKOFF

Laboratorio de Biología Molecular, Servicio de Genética, Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan, Buenos Aires

Resumen La población de Argentina es altamente heterogénea para las mutaciones del gen regulador de la conductancia de transmembrana de la fibrosis quística (CFTR). El estudio de 14 mutaciones reportadas entre las más frecuentes, detectó ambos alelos mutados (genotipo completo) en sólo el 51% de los pacientes. Este estudio confirmó el diagnóstico de Fibrosis Quística de estos pacientes y posibilitó detectar entre sus familiares, individuos portadores asintomáticos. Sin embargo, en el resto de los pacientes, el análisis molecular directo, no aportó la información necesaria para el asesoramiento familiar. Con el objetivo de establecer la transmisión de los alelos mutados, en las familias afectadas negativas para las mutaciones más comunes, se estudiaron tres microsatélites (IVS17bTA, IVS8CA y IVS17bCA) localizados en regiones intrónicas del gen CFTR. En las 40 familias FQ analizadas, se detectaron diferentes variantes alélicas, 15 para IVS17TA, 10 para IVS8CA y 4 para IVS17bCA. El contenido de información polimórfica y de heterocigosis de estos marcadores fue elevado, a excepción de IVS17bCA que resultó poco polimórfico. A través del análisis simultáneo de estos tres microsatélites se pudo asesorar al 100% de las familias. Nuestros resultados demuestran que estos microsatélites, constituyen un excelente grupo de marcadores, útiles para realizar estudios de ligamiento en familias fibroquísticas de población Argentina.

Palabras clave: fibrosis quística, análisis de ligamiento, población de Argentina

Abstract *Characterization of three microsatellites of the cystic fibrosis gene in Argentine families.* The Argentine population is highly heterogeneous for the cystic fibrosis (CF) transmembrane regulator (CFTR) gene mutations. The study of 14 more common mutations identified both mutated alleles in only 51% of patients. This study confirmed the diagnosis of cystic fibrosis in these patients and enabled the detection of asymptomatic carriers in their families. However, in the remaining patients the direct molecular assay did not provide the necessary information for genetic counselling. To establish the mutated allele transmission in the affected families, negative for the most common mutations, three microsatellites (IVS17bTA, IVS8CA and IVS17bCA) located in intronic regions of CFTR gene were studied. In the 40 CF families analyzed, different allelic variants were detected: 15 for IVS17bTA, 10 for IVS8CA and 4 for IVS17bCA. Polymorphism information content and heterozygosity were high, except for IVS17bCA. By the simultaneous analysis of the three microsatellites we could counsel 100% of the families. Ours results show that these microsatellites are an excellent group of markers for linkage studies in cystic fibrosis families of the Argentine population.

Key words: cystic fibrosis; linkage analysis, Argentine population

A pesar de que la fibrosis quística (FQ) es la enfermedad hereditaria letal más frecuente en la población blanca, en los países latinoamericanos es todavía una enfermedad relativamente rara probablemente debido a su subdiagnóstico. En los últimos años con el desarrollo de centros especializados en diagnóstico y tratamiento de la FQ, el número de casos diagnosticados se

incrementó notablemente. En población argentina, si bien no existen datos definitivos, los primeros estudios realizados indican una incidencia de 1/3468 recién nacidos vivos¹. De estos datos se puede inferir una frecuencia de portadores asintomáticos en la población general de alrededor de 1 en 30. Por lo tanto 1 cada 900 familias está en riesgo de tener un niño afectado.

La enfermedad está causada por más de 800 mutaciones en el gen regulador de la conductancia de transmembrana de la fibrosis quística (CFTR)². Sin bien existe una mutación mayoritaria, DF508, presente en promedio el 67% de los alelos FQ analizados a nivel mundial³, las otras mutaciones poseen frecuencias marcadamente inferiores. Sólo un grupo de no más de

Recibido: 20-IX-2000

Aceptado: 6-X-2000

Dirección postal: Dra. Lilien P. Chertkoff, Laboratorio de Biología Molecular, Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan, Combate de los Pozos 1881, 1245 Buenos Aires, Argentina.

Fax: (54-11)4308-5325

e-mail: lchertko@garrahan.gov.ar

20 mutaciones alcanza frecuencias entre el 0.1% y 3%, mientras que las restantes son consideradas raras ya que han sido reportadas en una o dos familias⁴.

El número e incidencia de las mutaciones varía de acuerdo al origen étnico y la localización geográfica de cada población. En poblaciones genéticamente homogéneas como los Judíos Ashkenazi⁵ o los Huterites⁶, el análisis de un pequeño grupo de mutaciones permite la identificación de más del 97% de los alelos mutados; mientras que en poblaciones heterogéneas, como España⁷ o Italia⁸, estudios de más de 40 mutaciones permiten la caracterización de apenas el 74% al 78% de los alelos FQ.

La población Argentina, al igual que las del sur de Europa, mostró ser altamente heterogénea para las mutaciones del gen CFTR. El estudio de DF508 y 9 de las mutaciones reportadas como las más frecuentes, permitió detectar el 67% de los alelos mutados⁹. En consecuencia, en sólo el 51% de los pacientes se identificaron ambos alelos mutados (genotipo completo). Esta información confirmó la enfermedad en estos pacientes y permitió establecer el carácter de portador o afectado en todos los familiares que así lo requirieron. Sin embargo, en una importante proporción de familias, el análisis molecular directo, no aportó la información necesaria para el asesoramiento familiar; ya que, en el 22% de los pacientes se identificó solamente un alelo mutado y en el 27% de los casos ambos alelos mutados resultaron desconocidos.

En distintas poblaciones, varios segmentos polimórficos ubicados en las cercanías del gen CFTR o en sus regiones intrónicas (marcadores dialélicos y microsatélites) han sido utilizados como marcadores genéticos para los estudios de ligamiento en familias FQ. En particular, los microsatélites IVS17bTA¹⁰, IVS8CA¹¹ y IVS17bCA¹² además de ser más polimórficos que los marcadores dialélicos, poseen la ventaja de estar ubicados dentro del gen afectado y de presentar, en consecuencia, frecuencias de recombinación muy bajas¹³. El análisis de estos microsatélites en población española, ha revelado un alto grado de polimorfismo que permite alcanzar una informatividad cercana al 99%, cuando se combina con el estudio de las 6 mutaciones más frecuentes en esa población¹⁴.

Con el propósito de brindar un asesoramiento genético adecuado y oportuno a las familias FQ negativas para las mutaciones más comunes, implementamos el análisis de los microsatélites: IVS17bTA, IVS8CA y IVS17bCA en 40 familias FQ de Argentina. En este trabajo reportamos la distribución alélica de estos microsatélites y los diferentes haplotipos observados. Establecimos el grado de heterocigosis y la informatividad de los mismos para su aplicación en futuros estudios de ligamiento en nuestra población.

Materiales y métodos

Población analizada

Se estudiaron 40 familias (168 individuos) de población argentina, no emparentadas, con al menos un niño afectado, que recibieron atención en el Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan". Los pacientes fueron diagnosticados en base a sus manifestaciones clínicas y/o elevadas concentraciones de cloruros en sudor (>60 meq/l)¹⁵. Todos los pacientes presentaban uno o dos alelos FQ negativos para 14 mutaciones analizadas previamente: $\Delta F508$, DI507, G551D, G542X, 1717+1G→A, R553X, S549N, S549I, 621+1G→T, 1811+1.6KbA→G, 3849+10KbG→T, R1162X, W1282X y N1303K.

Estudio de microsatélites

Se extrajo el ADN de leucocitos de sangre periférica de los pacientes y su grupo familiar según protocolos convencionales. Luego se amplificaron los microsatélites mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a partir de 200 ng de ADN, utilizando los oligonucleótidos iniciadores descriptos por Morral y colaboradores¹⁴. Los oligonucleótidos correspondientes a la secuencia directa, fueron marcados en su extremo 5', con 75 mC de [γ -³²P]ATP (3000 Ci/ mmol) y 5 unidades de la enzima polinucleótido quinasa. Se realizó la amplificación simultánea de los tres microsatélites en 30 ciclos de reacción de PCR: 30" a 94 °C, 30" a 50 °C, 1' a 72 °C. En algunos casos se realizaron amplificaciones de cada uno de los microsatélites por separado. Los fragmentos finalmente fueron resueltos por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes al 6%. El tiempo de migración fue de 4 horas a 1500V. Los geles fueron secados y expuestos en placas autoradiográficas durante 1 hora.

Para establecer los tamaños en pares de bases de cada microsatélite, se utilizaron microsatélites de un número de repeticiones establecido previamente por secuenciación.

Análisis de haplotipos

Los haplotipos de ambos cromosomas parentales (alelos mutados, n=80 y normales, n=80) fueron determinados a partir de los alelos recibidos por el individuo afectado de cada familia para establecer la fase. En algunos casos, se tuvo en cuenta la información obtenida durante el análisis directo de las mutaciones; mientras que en otros casos, fue necesario el análisis de varios miembros familiares para la determinación.

Análisis estadístico

Se realizó la estimación del grado de polimorfismo de cada microsatélite, mediante el cálculo del índice de contenido polimórfico (PIC) y del contenido de heterocigosis (HET) de cada marcador, utilizando el programa estadístico LINKAGE version 5.1¹⁶.

Resultados

Se determinó el tamaño de alelos y las frecuencias alélicas que cada microsatélite presentó en la población de estudio. Con esos resultados se hicieron los cálculos de los parámetros PIC y HET.

El microsatélite IVS17bTA, localizado en el intrón 17b del gen CFTR, resultó el más variable e informativo de

TABLA 1.– Distribución de las variantes alélicas observadas

variante alélica	IVS17bTA		Microsatélites			IVS17bCA		
	número de alelos	frecuencia	variante alélica	número de alelos	frecuencia	variante alélica	número de alelos	frecuencia
7	36	0.22500	14	5	0.03125	11	1	0.00625
24	4	0.02500	16	75	0.46875	13	136	0.85000
25	4	0.02500	17	30	0.18750	14	2	0.01875
29	10	0.06250	18	1	0.00625	17	21	0.12500
30	16	0.10000	19	2	0.01250			
31	37	0.23125	20	1	0.00625			
32	29	0.18125	21	2	0.01250			
33	4	0.02500	22	2	0.01250			
34	1	0.00625	23	38	0.23750			
35	1	0.00625	24	4	0.02500			
38	3	0.01875						
44	2	0.01250						
45	6	0.03750						
46	4	0.02500						
47	3	0.01875						
Total	160	1.00000	Total	160	1.00000	Total	160	1.00000

los tres analizados; identificamos 15 de las 30 variantes alélicas descritas previamente en otras poblaciones de origen caucásico^{10, 17}. El microsatélite IVS8CA, ubicado en el intrón 8 del gen CFTR, presentó 10 variantes alélicas de las 20 conocidas^{11, 17} (Tabla 1). En ambos casos las frecuencias alélicas estuvieron uniformemente distribuidas en la población, de manera que el contenido de información polimórfica (PIC) de estos marcadores alcanzó valores elevados (Tabla 2).

El microsatélite IVS17bCA, también ubicado en el intrón 17b, fue muy poco polimórfico, ya que detectamos sólo 4 de las 10 variantes alélicas ya publicadas^{12, 17} y dos de ellas, los alelos 11 y 14, estuvieron presentes en muy baja frecuencia (una y dos familias respectivamente). A pesar de que el PIC resultó bajo, la inclusión de este marcador en los estudios de ligamiento, contribuyó a la identificación del haplotipo relacionado a la enfermedad.

El análisis de los 40 grupos familiares permitió confirmar la herencia mendeliana codominante de estos marcadores. No se observó la aparición de ningún alelo nuevo en todas las familias analizadas. El análisis de ligamiento en cada núcleo familiar permitió determinar los diferentes haplotipos y definir aquellos que segregan con la enfermedad (Figura 1). Este estudio resultó informativo en el 100% de las familias: entre los 48 hermanos de pacientes FQ analizados, identificamos 34 portadores y 14 sanos no portadores. También se realizó el asesoramiento a otros individuos relacionados, como tíos y primos que así lo requirieron.

Identificamos en total 36 haplotipos diferentes, doce de ellos se encontraron asociados a la mutación DF508. En particular el haplotipo 31-23-13 (IVS17bTA-IVS8CA-IVS17bCA) fue el más frecuente en los cromosomas con la mutación DF508 (11/30), poco frecuente en los cromosomas con otras mutaciones del gen CFTR dife-

TABLA 2.– Características de los microsatélites analizados

Microsatélites	Tamaño del producto de PCR	Variantes alélicas	Número de repeticiones	Contenido de información polimórfica	Grado de Heterocigosis
IVS17bTA	201-281 pb	15	7-47	0.83	0.84
IVS8CA	176-196 pb	10	14-24	0.66	0.69
IVS17bCA	73-81 pb	4	11-17	0.25	0.26

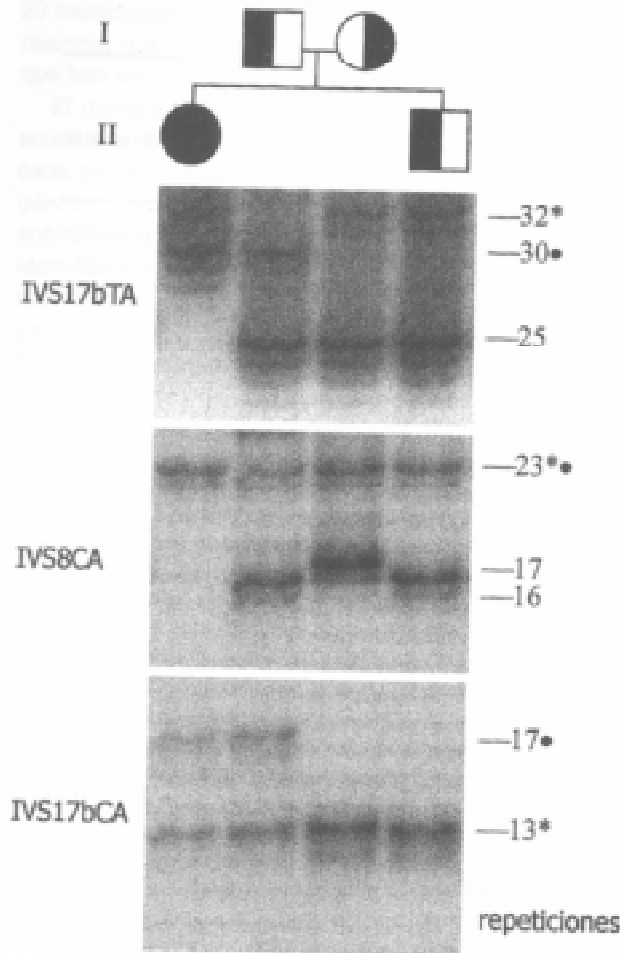


Fig. 1.- Análisis de Ligamiento Familiar. El haplotipo de origen paterno 30-23-17 (⁰) y el haplotipo de origen materno 32-23-13 (*), están asociados a la enfermedad. Por lo tanto, el individuo II.2 resulta portador del alelo mutado de la madre.

rentes a $\Delta F508$ (2/50) y estuvo ausente en los 80 cromosomas normales. Los alelos mutados G542X (n=1), N1303K (n=1), 621+1G→T (n=1) y W1282X (n=1) fueron identificados en los haplotipos 33-23-13, 31-23-13, 31-21-13 y 7-17-17 respectivamente. Estos resultados, coinciden con los datos obtenidos en población española. Por el contrario, el haplotipo 45-23-16 que se observó asociado a la mutación 3849+10KbC→G, fue diferente a los descriptos previamente¹⁷.

Discusión

Asesoramiento Genético

Se estima que 1 cada 30 individuos de la población argentina es portador de una mutación en el gen CFTR. Sin embargo, cuando existe historia familiar, el riesgo de ser portador aumenta según el grado de parentesco

con el individuo afectado. Por ejemplo un hermano tiene una probabilidad *a priori* del 67%, un sobrino del 50% y un tío del 33%. Si un individuo posee un hermano afectado por FQ y su pareja no tiene historia familiar, el riesgo de tener un niño afectado es 1/151, es decir casi 20 veces superior al riesgo teórico de la población general (1/3000). En estos casos, es donde el análisis molecular adquiere relevancia, ya que no existe ninguna prueba bioquímica que permita detectar portadores sanos.

Recientemente, se realizó el análisis exhaustivo de todos los exones del gen CFTR en más de 200 pacientes FQ de Argentina. Este estudio permitió caracterizar el 83% de los alelos mutados. Se detectaron 39 mutaciones diferentes distribuidas a lo largo de todo el gen; el 49% de ellas podrían considerarse raras, ya que fueron identificadas en un único individuo afectado¹⁸. Estos resultados, confirman la gran heterogeneidad genética de esta población, y revelan que un importante número de alelos FQ escaparían a la identificación, por los sistemas diseñados para el análisis de las mutaciones más comunes. Por ello, la utilización de marcadores genéticos constituye una alternativa para poder observar la transmisión de los alelos mutados en los grupos familiares, independientemente del conocimiento de las mutaciones responsables de la enfermedad.

En este trabajo, se estudiaron tres microsatélites intragénicos IVS17bTA, IVS8CA y IVS17bCA en 40 familias FQ de Argentina, con el propósito de validar el uso de estos marcadores en estudios de ligamiento en nuestra población. Para ello se evaluó el grado de polimorfismo de cada marcador, a través de la determinación del número de alelos y su distribución en la población de estudio. Se obtuvieron valores elevados de HET y PIC para los microsatélites IVS17TA y IVS8CA mientras que los mismos resultaron bajos para IVS17bCA. El análisis conjunto de estos tres microsatélites, en combinación con el estudio directo de 14 mutaciones comunes, permitieron establecer en cada familia las diferentes variantes alélicas asociadas a la enfermedad.

El análisis de ligamiento permitió también confirmar el diagnóstico de FQ de forma presintomática. Se identificaron los haplotipos asociados a la enfermedad en dos recién nacidos, hermanos de pacientes cuyos alelos mutados permanecían desconocidos. Esto permitió, tomar medidas de prevención y realizar un tratamiento más específico, sobre todo para evitar el deterioro pulmonar que es la causa más frecuente de muerte en los pacientes fibroquísticos.

En conclusión estos microsatélites constituyen un excelente grupo de marcadores genéticos útiles para observar la transmisión de los alelos mutados en familias FQ donde no se pudo establecer el genotipo completo. Resultan también muy apropiados para la realización de estudios prenatales.

Asociación haplotipo-genotipo

El estudio de estos marcadores en otras poblaciones como España e Italia, mostró que existe una fuerte asociación entre ciertos haplotipos y mutaciones específicas del gen CFTR¹³. Este conocimiento, también podría ser utilizado para identificar los alelos mutados aún desconocidos en esas poblaciones, ya que la determinación del haplotipo podría orientar acerca de que tipo de mutación se trata. Esto finalmente, permitiría proveer al paciente de la información molecular necesaria para la aplicación de futuras terapias mutación específicas como la farmacoterapia (cuyos ensayos clínicos ya están en fase clínica I y II) y la terapia génica¹⁹.

Nuestros resultados muestran que los alelos DF508 estuvieron en su mayoría asociados al haplotipo 31-23-13, G542X al 33-23-13 y N1303K al 31-23-13, coincidiendo por ahora, con los datos publicados en otras poblaciones de origen caucásico¹⁷. Sin embargo, el alelo 3849+10KbC→T fue encontrado asociado a un haplotipo diferente (45-16-13) a los descritos previamente para esta mutación¹⁷. Esperamos que futuros estudios de un mayor número de alelos, permitan encontrar nuevas asociaciones que reflejen el perfil propio de nuestra población e incluso nos ayuden a comprender el origen y la naturaleza de las mutaciones del gen CFTR en población argentina.

Agradecimientos: A la Lic. María Witis por las extracciones de ADN. Al Dr. Horacio Cardozo y al Lic. Gerardo Luzardo, quienes gentilmente cedieron los controles de tamaño molecular. A la Dra. Diana Iglesias que colaboró en el análisis estadístico.

Bibliografía

1. Segal E, Grenoville M, Macri C et al. Consenso de Fibrosis Quística. *Arch argent pediatr* 1999; 97: 188- 224.
2. Base de datos del Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (CFGAC); <http://www.genet.sickkids.on.ca>.
3. Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Worldwide survey of the DF508 mutation. Report from the Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. *Am J Hum Genet* 1990; 47: 354- 9.
4. Tsui L-C. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 547-53.
5. Abeliovich D, Lavon IP, Lerer Y, et al. Screening for five mutations detects 97% of cystic fibrosis (CF) chromosomes and predicts a carrier frequency of 1: 29 in the Jewish Ashkenazi population. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 951- 6.
6. Zielenski J, Fujiiwara TM, Markiewicz D et al. Identification of the M1101K mutation in the CFTR gene and complete detection of cystic fibrosis mutations in the Hutterite population. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 609-15.
7. Chillón M, Casals T, Giménez J et al. Analysis of the CFTR gene confirms the high genetic heterogeneity of the Spanish population: 43 mutations account for only 78% of CF chromosomes. *Hum Genet* 1994; 3: 447- 51.
8. Gasparini P, Marigo C, Bisceglia G et al. Screening of 62 mutations in the cohort of cystic fibrosis patients from north eastern Italy: their incidence and clinical features of defined genotypes. *Hum Mut* 1993; 2: 389- 94.
9. Chertkoff L, Visich A, Bienvenu T et al. Spectrum of CFTR mutations in argentine cystic fibrosis patients. *Clin Genet* 1997; 51: 43-7.
10. Zielenski J, Markiewicz D, Rininsland F, Rommens J, Tsui L-C. A cluster of highly polymorphic dinucleotide repeats in intron 17b of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 1256-62.
11. Morral N, Nunes V, Casals T, Estivill J. CA/GT Microsatellite alleles within 17b of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene are not generated by unequal crossingover. *Genomics* 1991; 10: 692-8.
12. Morral N, Girbau E, Zielenski J et al. Dinucleotide (CA/GT) repeat polymorphism in intron 17b of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Hum Genet* 1992; 88: 356.
13. Morral N, Nunes V, Casals T et al. Microsatellite haplotypes for cystic fibrosis: mutation frameworks and evolutionary tracers. *Hum Molec Genet*, 1993; 2: 1015-22.
14. Morral N, Estivill J. Multiplex PCR amplification of three Microsatellites within the CFTR Gene. *Genomics* 1992; 13: 62-4.
15. Gibson L, Cooke R. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine iontophoresis. *Pediatrics*, 1959; 23: 545.
16. Ott J. Analysis of Human Genetic Linkage. Baltimore: The John Hopkins University Press, 1991.
17. Morral N, Dork T, Llevadot R et al. Haplotype analysis of 94 cystic fibrosis mutations with seven polymorphic CFTR DNA markers. *Hum Mut*, 1996; 8: 149-59.
18. Visich A, Marino R, Castaños C et al. Screening completo del gen CFTR en pacientes con fibrosis quística de población argentina. *IX Congreso Latinoamericano de Fibrosis Quística. Buenos Aires. Argentina*, 1999. Libro de resúmenes, pág. 81.
19. Davies J, Geddes D, Alton E. Prospects for the gene therapy for cystic fibrosis. *Molecular Medicine Today* 1998; 2: 292-9.

La vieillesse nous attache plus de rides a l'esprit qu' au visage.

La vejez nos aporta más arrugas al espíritu que a la cara.

Montaigne (1533-1592)
Essais III (1588)