

---

# Diagnóstico molecular prenatal de Fibrosis Quística. Reporte de tres casos.

*Alisandra Morales-Machín<sup>1,2</sup>, Lisbeth Borjas-Fajardo<sup>1</sup>, Lennie Pineda-Del Villar<sup>1</sup>, Minolfa Prieto-Carrasquero<sup>1</sup>, Sandra González<sup>1</sup>, Melvin Gutiérrez<sup>2</sup>, Wilmer Delgado-Luengo<sup>1</sup>, Francisca Alvarez<sup>1</sup> y Hugo Barrera-Saldaña<sup>3</sup>.*

<sup>1</sup>Unidad de Genética Médica, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela; <sup>2</sup>Unidad de Ginecología y Obstetricia, Hospital Clínico, Maracaibo, Venezuela y <sup>3</sup>Unidad de Laboratorio de Ingeniería y Expresión genética, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Monterrey, México.

**Palabras claves:** fibrosis quística, reacción en cadena de la polimerasa, diagnóstico prenatal.

**Resumen.** La Fibrosis quística (FQ) es una enfermedad autosómica recesiva severa, causada por múltiples mutaciones en el gen RCTFQ. La mutación más frecuente en el mundo es la  $\Delta F508$ , que consiste en la deleción del codón que codifica a la fenilalanina en la posición 508. En este trabajo se presentan los primeros casos venezolanos de diagnóstico prenatal molecular en parejas de alto riesgo para tener descendencia con FQ. El diagnóstico molecular de la mutación  $\Delta F508$  se realizó en ADN extraído directamente de amniocitos o de células cultivadas y la aplicación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) y electroforesis en gel de poliacrilamida. En los dos primeros casos, los fetos fueron homocigotos para el alelo  $\Delta F508$  y el tercer feto presentaba un alelo  $\Delta F508$ , descartándose la homocigosis del alelo normal. El asesoramiento genético prenatal a estas parejas permitió que tomaran decisiones reproductivas objetivas en base al conocimiento del genotipo fetal, lo cual solo es posible con la aplicación de estas técnicas para el análisis directo del genoma.

**Prenatal diagnosis of cystic fibrosis. Report of three cases.**  
*Invest Clin 38(3): 145-153 , 1997.*

**Key words:** Cystic fibrosis, polymerase chain reaction, prenatal diagnosis.

---

**Abstract.** Cystic Fibrosis (CF) is a severe and relatively common autosomic recessive disease caused by a variety of mutations in the CFTR gene. The most frequent mutation worldwide, consists of the deletion of the phenylalanine codon at position 508 ( $\Delta F508$ ). Here we report the first cases of prenatal diagnosis of CF by DNA analysis in couples at risk in Venezuela. The study focused on the detection of  $\Delta F508$  alleles analyzing DNA recovered directly from amniocytes or from their cultures, using the polymerase chain reaction (PCR) and polyacrilamide gel electrophoresis. Two of three fetuses resulted homozygotic for the  $\Delta F508$  allele and the third one turned out to be a  $\Delta F508$  carrier. This information sustained the genetic counseling of the couples and allowed them to take objective reproductive decisions, a direct consequence of the availability of gene analysis at the DNA level.

*Recibido. 26-11-96. Aceptado. 27-7-97.*

## INTRODUCCIÓN

La Fibrosis Quística (FQ) es la enfermedad autosómica recesiva severa más frecuente de la población caucásica, con una incidencia de 1 en 2500 nacidos vivos y una frecuencia de portadores de 1 en 25 (1, 2, 3, 4). En Venezuela, la frecuencia del fenotipo en la población general es de 1 en 42733, y la frecuencia estimada de portadores es de 1 cada 104 personas (5).

La FQ, se caracteriza por ser una enfermedad generalizada de las glándulas exocrinas y cursa acompañada de un incremento de la viscosidad del moco en diferentes órganos, con síntomas de carácter predominantemente gastrointestinal, pulmonar obstructivo crónico y genitourinario, manifestándose en la piel por sudor con alto contenido de sal. Es una enfermedad con variabilidad fenotípica que puede simular varias cuadros clínicos (6, 7).

El gen responsable de la FQ fue localizado en la banda 31 del brazo

largo del cromosoma 7 (7q31), clonado en el año 1989 y codifica a una proteína llamada regulador de la conductancia transmembrana de FQ, (RCTFQ) (8, 9, 10). Han sido reportadas más de 400 mutaciones causantes de la enfermedad, siendo la más frecuente la mutación  $\Delta F508$ , con una frecuencia a nivel mundial de 67% (11, 12).

El objetivo de este trabajo es reportar los tres primeros casos de diagnóstico molecular directo prenatal de FQ en Venezuela.

## DESCRIPCIÓN DE LOS CASOS

**Primer paciente:** Gestante de 35 años de edad, natural de Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela; II gesta, nulipara, dos cesáreas, con embarazo de 22 semanas; antecedente de hija previa afectada con FQ, quien en la actualidad tiene 6 años, a quien a los 4 años se le diagnosticó la homocigosis para el alelo  $\Delta F508$ , cuya presencia fue identificada en ambos progenitores fenotípicamente normales. Su

pareja tiene 35 años de edad y no existe consanguinidad ni isonimia entre ellos.

Se practicó cordocentesis la cual resultó fallida, realizándose por lo tanto amniocentésis con aguja 22x3 bajo control ecográfico (una sola punción) sin complicaciones, obteniéndose 15 cc de líquido amniótico amarillo ámbar. Se realizó cultivo de fibroblastos en sistema de frascos abiertos mediante técnica convencional para estudio citogenético y la obtención de ADN (13).

**Segundo paciente:** Gestante de 21 años de edad, natural de San Sebastián, Buena Vista, Colombia; II gesta, para I, con embarazo de 18 semanas, antecedente de hijo previo, afectado con FQ, quien falleció a la edad de mes y medio, a quien a la edad de 10 días se le diagnosticó la homocigosis para el alelo  $\Delta F508$ . Su pareja tiene 29 años de edad, consanguíneos, son primos hermanos.

Se realizó amniocentésis con aguja 22x3, bajo control ecográfico (una sola punción) sin complicaciones, obteniéndose 15 cc de líquido amniótico. Se extrajo ADN directamente de los amniocitos mediante técnica convencional.

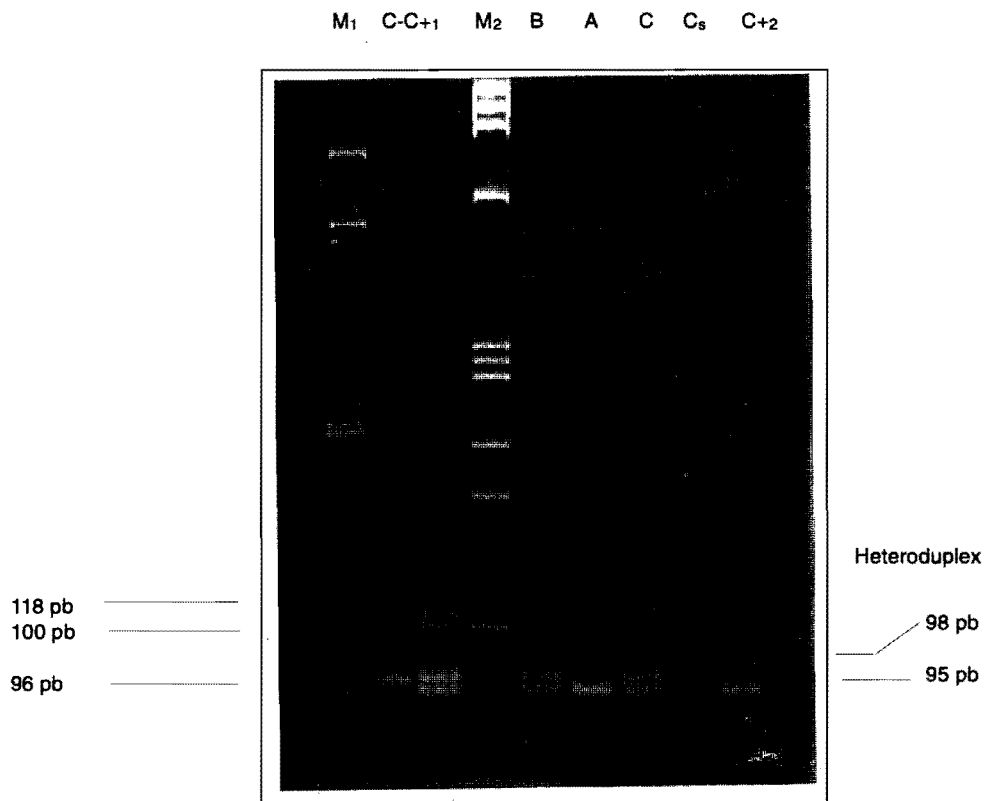
**Tercer paciente:** Gestante de 23 años de edad, natural de Maracabo, Estado Zulia, Venezuela; II gesta, para I, con embarazo de 15 semanas y antecedente de hija previa afectada con FQ, quien falleció a la edad de 19 meses, a quien a esa misma edad se identificó que era heterocigota compuesta para el alelo  $\Delta F508$  y otro alelo no  $\Delta F508$  no caracterizado hasta

este momento. No existe consanguinidad ni isonimia entre ellos.

Se realizó amniocentesis con aguja 22x3, bajo control ecográfico (una sola punción) sin complicaciones, obteniéndose 15 cc de líquido amniótico. Se realizó cultivo de fibroblastos en sistema de frascos abiertos mediante técnica convencional para estudio citogenético y la obtención de ADN.

**Análisis molecular.** El estudio molecular para la detección de la mutación  $\Delta F508$  se realizó a través de la amplificación de parte del exón 10 del gen de FQ mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP). Se utilizaron los iniciadores CF1 y CF2, donados por el Dr. Hugo Barrera, jefe de la Unidad de Laboratorio de Ingeniería y Expresión Genética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Monterrey, México. Constan de 24 bases cada uno y limitan un segmento de 98 pares de bases (pb), en cuyo interior se localiza el codón que codifica para la fenilalanina en la posición 508. El montaje de la RCP se realizó de acuerdo al método descrito por Rojas y col (14).

Los productos de la amplificación se separaron por electroforesis vertical en gel de poliacrilamida al 12% en buffer Tris-EDTA-Borato 1X, en dos fragmentos de 98 pb y 95 pb, correspondientes al alelo normal y al alelo mutado  $\Delta F508$ . Se utilizó como marcador de peso molecular Puc 19 + Alu 1. El gel se coloreó con una solución de Bromuro de Etidio (5 mg/ml) y en un transiluminador de luz ultravioleta (Hoefler Mod. UVTM-25), se vi-



**Fig. 1.** Diagnóstico molecular de la mutación  $\Delta F508$  en fibrosis quística.  
 M<sub>1</sub>: Marcador de Peso Molecular (Puc 19 + AluI); C-: Control Negativo, individuo sin FQ; C + 1: Control Positivo afectado con FQ (Heterocigoto Compuesto  $\Delta F508/X$ );  
 M<sub>2</sub>: Marcador de Peso Molecular ( $\emptyset$  174 DNA Hae III); B: Padre . (Heterocigoto Simple  $\Delta F508/N$ );  
 A: Feto afectado con FQ (Homocigoto  $\Delta F508/\Delta F508$ );  
 C: Madre, (Heterocigoto simple,  $\Delta F508/N$ ); C<sub>s</sub>: Control de Sistema. (Mezcla de Reacción sin ADN);  
 C + 2: Control Positivo afectado con FQ (Homocigoto,  $\Delta F508/\Delta F508$ ).

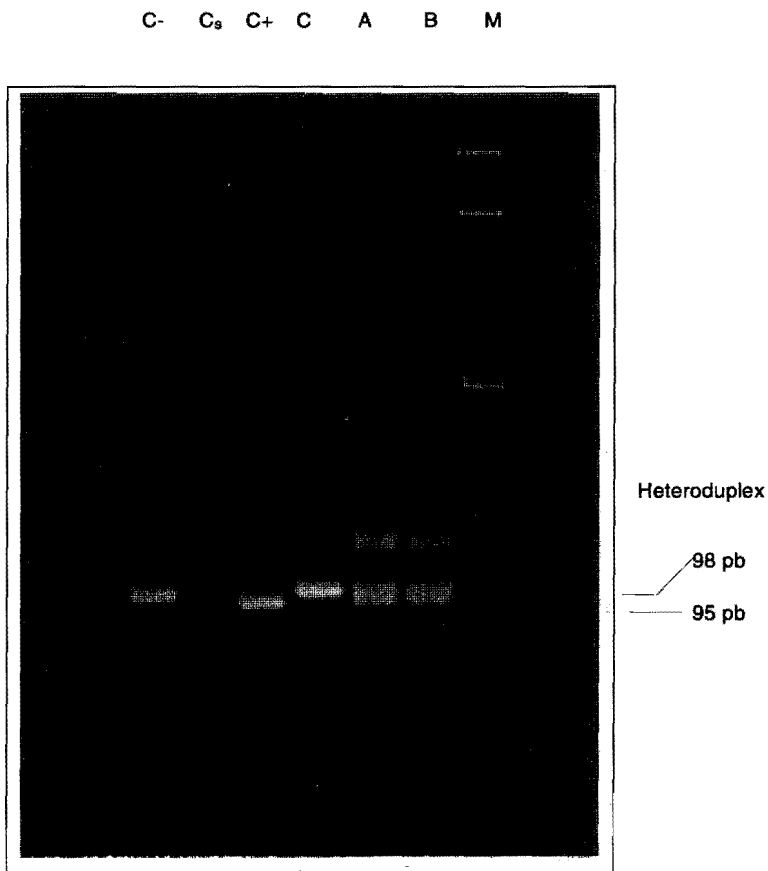


Fig. 2. Diagnóstico molecular de la mutación  $\Delta F508$  en fibrosis quística.

C-: Control Negativo, individuo sin FQ;

C<sub>s</sub>: Control de Sistema (Mezcla de Reacción sin ADN);

C+: Control Positivo, afectado con FQ (Heterocigoto  $\Delta F508/\Delta F508$ );

A: Feto, con un alelo  $\Delta F508$ ;

C: Madre; (Heterocigoto simple. X/N), B: Padre, (Heterocigoto simple  $\Delta F508/N$ );

M: Marcador de Peso Molecular (Puc 19 + Alu).

sualizaron los alelos normales y/o mutados y se tomó fotografía con película Polaroid instantánea 667.

Para el análisis molecular en cada uno de los pacientes se utilizó un control de ADN negativo para la mutación  $\Delta F508$  (C-), proveniente de un individuo fenotípicamente sano, sin antecedentes familiares de FQ. Un control positivo (C+), obtenido de paciente con FQ homocigoto para el alelo  $\Delta F508$  y un control de sistema o mezcla de reacción sin ADN, el cual utilizamos para identificación de contaminación.

## RESULTADOS

En los tres casos, los fetos resultaron cromosómicamente normales.

El estudio molecular reveló que los pacientes 8424 y 8782 eran homocigotos para la mutación  $\Delta F508$  (Fig. 1). Este resultado fue corroborado al nacimiento en ambos casos, en virtud de que las parejas decidieron continuar con el embarazo.

El caso 9434 (Fig. 2), presentó un patrón correspondiente a un individuo heterocigoto, ya sea simple o compuesto. Esta pareja decidió interrumpir el embarazo.

## DISCUSIÓN

El diagnóstico prenatal de FQ ha sido posible desde el año 1983, cuando Brock y col desarrollaron el análisis de la actividad de varias enzimas de microvellosidades intestinales (EMI) en líquido amniótico (15); desde el año 1986 se ha utilizado diagnóstico prenatal indirecto en el primer tri-

mestre por análisis de ADN, utilizando análisis de ligamiento de marcadores de ADN definidos por fragmentos de restricción de longitud polimórfica (FRLP) y por análisis de desequilibrio de ligamiento (16). Desde el año 1989 cuando fue clonado y secuenciado el gen de FQ, fue posible realizar diagnóstico prenatal mutacional directo de FQ por RCP.

La RCP permite producir en el laboratorio, grandes cantidades (varios  $\mu\text{g}$ ) de un segmento del gen que se desea analizar, y que está presente en muy bajas cantidades, en relación a la totalidad del genoma, en el material clínico a investigar.

Desde entonces esta ha sido la alternativa de elección y han sido numerosas las publicaciones tanto en embarazos simples (17, 18), como en gestaciones gemelares (19).

El análisis indirecto se utiliza en las familias donde al menos la mutación de uno o ambos cromosomas no está caracterizada.

Hasta esta fecha, el presente es el primer reporte de diagnóstico molecular directo prenatal de FQ en Venezuela y en latinoamérica que conocemos.

En las familias 8424 y 8782, ambos padres son heterocigotos simples para la mutación  $\Delta F508$ , lo cual hace el diagnóstico prenatal relativamente fácil. Las parejas acudieron a consulta de genética prenatal debido a la ansiedad experimentada por ellos al no conocer el estado de salud de su feto y requerían la información para fundamentar cualquier decisión a tomar, ya sea culminar el embarazo si el diagnóstico era positivo, como con-

tinuar con el mismo, pero mejor informados acerca de la conducta a seguir con el afectado.

La pareja 8424 al conocer el resultado de afectada homocigoto  $\Delta F508/\Delta F508$ , decidió continuar el embarazo y posteriormente la esterilización quirúrgica, a pesar de haber sido informados de otras alternativas tales como: nuevo embarazo, inseminación artificial heterológica, probables riesgos en otras posibles uniones y la adopción.

La pareja 8782 decidió continuar el embarazo, tomar las medidas preventivas necesarias para evitar las complicaciones de la enfermedad en su hijo e incluso pensar intentar un nuevo embarazo.

En la pareja 9434, en la cual sólo se conocía la mutación  $\Delta F508$  que portaba el padre, al conocer el resultado de feto heterocigoto con 50% de probabilidades de ser afectado y 50% de ser portador sano, decidieran culminar el embarazo y buscar nueva gestación cuando la mutación de la madre fuera caracterizada.

El diagnóstico prenatal y posteriormente neonatal precoz conduce a buscar ayuda temprana en la vigilancia del afectado y en la prevención de las complicaciones de esta patología.

El trabajo en equipo y el avance tecnológico en ultrasonido, técnicas invasivas y de la genética molecular han permitido en nuestro medio el diagnóstico cada vez más precoz de enfermedades génicas, lo cual se hace imposible por las técnicas convencionales .

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- CUTTING G., CURRISTIN S., NASH E., ROSENSTEIN B., LERER Y., ABELIOVICH D., HILL A., GRAHAM C.: Analysis of four Diverse Population Groups indicates that a subset of cystic fibrosis mutations occur in common among Caucasian. *Am J Hum Genet* 1992; 50:1185-1194.
- 2- SFERRA T., COLLINS F.: The molecular biology of cystic fibrosis. *Ann Rev Med* 1993; 44:133-144.
- 3- SIMON-BOUY B., MORNET E., SERRE J., TAILLANDIER A., BOUE J., BOUE A.: Nine mutations in the cystic fibrosis (CF) gene account for 80% of the CF chromosomes in French patients. *Clin Genet* 1991; 40: 218-224.
- 4- TSUI L., BUCHWALD M.: Biochemical and Molecular genetics of cystic fibrosis. *Adv Human Genet* 1991; 20:153-263.
- 5- ROLO M.: Experiencia diagnóstica con electrolitos del sudor en homocigotos y heterocigotos de Fibrosis Quística. Frecuencia y distribución de la enfermedad. *Avances en genética. V Congreso Venezolano de Genética*, 109-113. 1994.
- 6- DEAN M., SANTIS G.: Heterogeneity in the severity of cystic fibrosis and the role of CFTR gene mutations. *Human Genet* 1994; 84:364-368.
- 7- SANCHEZ J., GALLEGOS M., MORAN M., FLORES S.: Hete-

- rogeneidad clínica en 4 pacientes homocigotos para F508. IIdo. Congreso Latinoamericano de Genética y 3ro. de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis ambiental. Puerto Vallarta. México, 132. 1994.
- 8- KEREM B., ROMMENS J., BUCHANAN J., MARKIEWICZ D., COX T., CHAKRAVARTI A., BUCHWALD M.: Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245: 1073-1080.
- 9- RIORDAN J., ROMMENS J., KEREM B., ALON N., ROZMAHEL R., GRZELCZAK Z., ZIJELENSKI J., LOK S., PLAVSIC N., CHOU J., DRUMM M., IANNUZZI M., COLLINS F., TSUI L.: Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245:1066-1080.
- 10- ROMMENS J., IANNUZZI M., KEREM B., DRUMM M., MELMER G., DEAN M., ROZMAHEL R., COLE J., KENNEDY D., HIDAKA N., ZSIGA M., BUCHWALD M., RIORDAN J., TSUI L., COLLINS F.: Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Research Articles* 1989; 1059-1065.
- 11- GRADE K., GRUNEWALD I., GRAUPNER I., BEHRENS F., COUTELLE C.: Identification of three novel mutations in the CFTR gene using temperature-optimized non-radioactive conditions for SSCP analysis. *Human Genet* 1994; 84:154-158.
- 12- TSUI L.: Molecular basis of cystic fibrosis. II Congreso Latinoamericano de Genética y 3ro de Mutagenesis, Carcinogénesis y Teratogénesis ambiental. Puerto Vallarta México. 185. 1994.
- 13- OLD J.: Fetal DNA analysis. Chapter I. Human genetic diseases. A practical approach. K.E. Davies. eds. 1987, pp. 1-17.
- 14- ROJAS A., MARTINEZ R., VASQUEZ R., GUSTWCICH S., CANTU J., BARRERA H.: Genética Molecular de la fibrosis quística: el alelo  $\Delta F508$  en familias mexicanas. *Bol. Med Hosp Inf México*. 1992; 49:335-343.
- 15- BROCK D., CLAREE H., BARRON L.: Prenatal diagnosis of cystic fibrosis by microvillar enzyme assay on a sequence of 258 pregnancies. *Human Genet* 1988; 78:271-275.
- 16- ESTIVILL X., FARRAL M., WILLIAMSON R., FERRARI M., SEIA M., GIUNTA A., NOVELLI G., POTENZA L., DALLAPICOLLE B., BORGIO G., GASPARINI P., PIGNATTI P., DE BENEDETTI L., VITALE E., DEVOTO M., ROAFERO G.: Linkage disequilibrium between cystic fibrosis and linked DNA polymorphisms in Italian families: A collaborative study. *Am J Human Genet* 1988; 43:23-28.
- 17- BARANOV V., GORBUNOVA V., IVASCHENKO T., SHWED N., OSINOVSKAYA N., KASCHEEVA T., LEBEDEV V., MIKHALOV A., VAKHARLOVSKY V., KUZNETZOVA T.: Five years experience of prenatal diagnosis of cystic fi-



- brosis in the former U.S.S.R. *Prenatal Diagnosis* 1992; 12:575-586.
- 18- SHRIMPTON A., MCINTOSH I., BROCK D.: The incidence of different cystic fibrosis mutations in the Scottish population: effects on prenatal diagnosis and genetic counselling. *J Med Genet* 1991; 28: 317-321.
- 19- JORGENSEN F., BANG J., TRANEBJAERG L., BERGE L., EIKVES S., SCHWARTZ M.: Early prenatal direct gene diagnosis of cystic fibrosis in a twin pregnancy and subsequent selective termination. Short communication. *Prenatal diagnosis* 1994; 14:149-152.