

# Avances moleculares en la fibrosis quística

Carlos J. Trujillo

---

La fibrosis quística es la enfermedad autosómica recesiva más común en la raza caucásica; afecta a uno de cada 2.000 nacidos y una de cada 22 personas es heterocigota o portadora de una copia del gene afectado. La enfermedad compromete principalmente el tracto respiratorio y el páncreas. El diagnóstico se puede sospechar ante la presencia de enfermedad pulmonar crónica, infección pulmonar persistente (especialmente por *Pseudomonas*), íleo meconial e insuficiencia pancreática. Hasta hace muy pocos años no se sabía cuál era la alteración molecular que causaba esta enfermedad, y el diagnóstico se basaba en la determinación de cloruro en el sudor, mayor de 60 meq/l. Recientemente se ha caracterizado el defecto a nivel molecular y se ha podido deter-

minar con exactitud la proteína que se encuentra alterada, a la cual se le ha dado el nombre de CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Receptor). Esto ha contribuido a mejorar el diagnóstico de la enfermedad haciéndolo más preciso y ha abierto a corto plazo un gran número de posibilidades terapéuticas.

## INTRODUCCION

El promedio de vida de los pacientes con fibrosis quística en Estados Unidos es 27.6 años (1); en otros países también se ha visto un incremento en la sobrevivencia (2,3), lo cual hace que este tipo de pacientes, con frecuencia creciente, sean vistos por el médico internista. La probabilidad de que una mujer heterocigota se case con un hombre heterocigoto es igual a  $1/22 \times 1/22$ , o sea, a  $1/484$ , esto quiere decir que aproximadamente uno de cada 484 matrimonios en la raza caucásica ocu-

---

Dr. Carlos José Trujillo Botero: Profesor asociado, Departamento de Pediatría y Ginecología, Instituto de Ciencias de la salud (CES).

rren entre heterocigotos para el gen de la fibrosis quística; a su vez, la probabilidad de que este matrimonio tenga un hijo afectado, o sea, un homocigoto, es de uno en cuatro, lo cual nos da una frecuencia aproximada de uno de cada 2.000 nacimientos en la población caucásica general.

En 1985 se asignó el locus de la fibrosis quística al brazo largo del cromosoma siete, banda q 31. Esto fue realizado mediante análisis de ligamiento, basados en un gran número de marcadores polimórficos (4). Haber encontrado el locus, no necesariamente significaba que se hubiera descubierto el defecto a nivel molecular y, mucho menos, que se hubiera hallado la proteína normal y la anormal responsable de la enfermedad; cuatro años más tarde, después de un arduo e intenso trabajo, investigadores de la Universidad de Michigan, dirigidos por Francis Collins, y del Hospital de Niños de Toronto, dirigidos por Lap C. Tsiu, identificaron con exactitud el gen y su secuencia (5); de esta manera pudieron deducir la estructura de la proteína que se encontraba alterada. A esta proteína se le dio el nombre de CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). El gen tiene aproximadamente 250 kb de ADN, con 27 exones o regiones codificadoras, que forman un ARN mensajero de 6.2 kb de largo, el cual codifica un polipéptido o proteína final de 1.480 aminoácidos. Una delección de tres pares de bases del gen, que codifican una fenilalanina en la posición 508 de la proteína CFTR (parte del exón número 10), es la causa de la fibrosis quística en 70 a 80% de los caucásicos afectados. Dependiendo de la población estudiada, este porcentaje puede variar grandemente, por ejemplo, en judíos ashkenazis que padecen la enfermedad, solamente 10% tienen la mutación en este lugar, a la cual se le conoce como "delta F 508" (F por fenilalanina).

Seis mutaciones producen más de 85% de los casos, pero se han descrito más de 150 mutaciones asociadas con la enfermedad. Ha sido posible correlacionar las mutaciones con el fenotipo, v.g. la mutación delta F 508 en forma homocigótica se asocia con una enfermedad severa, que incluye insuficiencia pancreática.

### **Expresión del gen**

Se ha determinado el ARN mensajero en tejidos de rata por medio de técnicas histoquímicas de hibridación *in situ*, que involucran el uso de moléculas de ARN contrasentido marcadas con S35, y se ha demostrado que esta proteína está presente en las células ductales del páncreas y en las glándulas salivares. En las células vellosas del intestino se han observado gradientes decrecientes de la expresión del gen CFTR. Esta expresión es consistente con que la proteína CFTR sea responsable del transporte bidireccional de cloro y que en las criptas intestinales se secrete y en las glándulas salivares se excrete el cloro. En el pulmón, a nivel de la mucosa y la submucosa de bronquio y el bronquiolo se ha detectado la expresión; también se ha sugerido que el gen CFTR desempeña un papel importante en la espermatogénesis (6). Son precisamente los tejidos en los cuales se ha encontrado mayor expresión de la proteína, los que presentan las manifestaciones clínicas características de la enfermedad.

### **Funciones de la proteína CFTR**

El gen CFTR produce una proteína que tiene la capacidad de bombear cloro fuera de la célula. Se cree que todos los síntomas de la enfermedad son debidos a la falta de secreción del cloro. Las células de la piel, las vías respiratorias y el tracto digestivo no pueden movilizar cloro apropiadamente a través de sus membranas, y como resultado secretan menos agua de lo normal. Esto causa el sabor salado de la piel y las consecuencias más severas a nivel respiratorio, por la inadecuada excreción de agua (que espesa el moco), ello hace que no sea expulsado apropiadamente, y se favorezcan las infecciones por bacterias como la pseudomona, hallada con gran frecuencia en estos pacientes.

Se ha planteado que la proteína CFTR tenga más funciones, como la de regular la inserción y remoción de membranas en la superficie de la célula pancreática, uno de los grupos celulares afectados en la fibrosis quística. Un defecto en este proceso podría causar una serie de cambios en las células y en su ambiente, porque la inserción

y remoción de membranas es una manera importante de controlar la excreción de proteínas de la célula. Es posible especular que la CFTR participa en la regulación de la exocitosis y la endocitosis, un proceso muy seguramente estimulado por las concentraciones de AMP cíclico (7, 8).

### **Posibilidades diagnósticas**

Antes el diagnóstico se basaba en la medición de electrólitos en el sudor, ahora se puede hacer mediante hibridización de oligo sondas de DNA específicas para el alelo normal y para el alelo mutante. El DNA extraído de los pacientes se puede amplificar previamente a la hibridización mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estas técnicas han permitido por primera vez hacer el diagnóstico de heterocigotos sanos y ya se está planeando en algunos países hacer tamizajes de la población para detectar prematrimonialmente las personas heterocigotas y ofrecerles la posibilidad de una consejería genética adecuada antes del embarazo y la posibilidad de un diagnóstico prenatal precoz y adecuado, cuando así lo desee la pareja a riesgo (9).

Con los métodos mencionados es posible detectar 85% de los casos, o sea, que algunas mutaciones escapan a esta posibilidad diagnóstica. En familias que no son informativas al análisis de estas mutaciones comunes, es posible usar RFLPs (fragmentos de restricción de longitud polimórfica) que pueden aportar información adicional, con la desventaja de que es necesario analizar varios miembros de la familia y necesariamente se debe tener uno o varios miembros afectados.

Recientemente se ha descrito una técnica que modifica la reacción en cadena de la polimerasa (10), conocida como sistema de amplificación de mutaciones refractarias (ARMS). Este sistema tiene varias ventajas: es rápido, confiable y no es isotópico. Ha sido utilizado en el diagnóstico de otras enfermedades que se deben a distintas mutaciones dentro del mismo gene, como la fenilcetonuria, las beta talasemias, la deficiencia de alfa-1-antitripsina, etc.

Esta técnica ha demostrado una gran utilidad en el diagnóstico de la fibrosis quística (11).

### **Diagnóstico prenatal**

El diagnóstico prenatal para fibrosis quística se viene ofreciendo desde mediados de la década de los ochenta, a parejas que ya poseen un hijo afectado. Es posible extraer DNA de células del trofoblasto o de las células del líquido amniótico y luego amplificarlo mediante la técnica de la PCR; este trofoblasto se puede obtener desde la semana octava del embarazo, y las células de líquido amniótico mediante amniocentesis temprana desde la semana 10 u 11 de gestación. Algo aún más interesante es que se ha demostrado que es posible amplificar el gene CFTR a partir de una sola célula tomada por biopsia de un cigoto en estadio de cuatro a ocho células, y aun aislando el cuerpo polar de un óvulo no fecundado se puede amplificar del gene, por medio de la técnica de la PCR (12); en caso de ser normal el cuerpo polar y la madre ser heterocigota, el óvulo debe estar afectado; en caso de ser anormal el cuerpo polar, el óvulo debe ser normal. La gran limitante es que solamente sería disponible en programas de fertilización *in vitro* (IVF), los cuales no son muy efectivos aún (13). Recientemente, se ha comprobado un hecho sospechado desde hace muchos años (14, 15): células fetales pasan a la sangre materna (16, 17). Se están desarrollando métodos para que el aislamiento de dichas células sea aplicable a grandes grupos de población (18), y luego mediante el empleo de la PCR se podrá hacer un diagnóstico prenatal muy rápido (aún desde la semana siete de embarazo se han demostrado células fetales en circulación materna), certero y no invasivo, de fibrosis quística, de otras enfermedades mendelianas caracterizadas a nivel molecular, de Síndrome de Down y otras anomalías cromosómicas (16).

### **Mutaciones del gene CFTR en infertilidad masculina**

Otro aspecto importante del diagnóstico molecular de mutaciones del gene de la fibrosis quística es que se han detectado en individuos infértiles de sexo masculino, sin ninguna sintomatología pulmonar o pancreática, que presentan obstrucción de los túbulos seminíferos (19).

La mayoría de los hombres con fibrosis quística tienen aspermia como resultado de la ausencia de vasos deferentes, la puede constituir hasta 2% de los casos de infertilidad masculina en la población general. Se han descrito casos esporádicos y otros familiares, que siguen un claro patrón de herencia autosómica recesiva y se ha sugerido que en algunas personas existen formas leves de fibrosis quística en que fenotípicamente sólo se presenta la infertilidad (20).

También se ha registrado la asociación de azoospermia y aplasia del epidídimo y vasos deferentes con sinusitis crónica, presentándose una alta incidencia de heterocigocidad para la mutación delta F 508. En estos pacientes se ha sospechado que puedan existir mutaciones en la otra copia del gene CFTR, que hasta el momento no se puedan detectar (19, 21).

### Posibilidades terapéuticas

Como se conoce la proteína CFTR y el gene que normalmente la codifica, se ha especulado que éste se puede insertar en un vector viral apropiado, que infecte la mucosa del epitelio respiratorio (adenovirus) y después de integrarse al genoma de la célula bajo la acción de un promotor adecuado, se empiece a sintetizar la proteína CFTR normal, curando sólo temporalmente la enfermedad respiratoria, pues cada vez que se recambie el epitelio habría que "nebulizar" de nuevo el virus (22):

Existen dos estrategias para implementar la terapia genética en el pulmón: la primera consiste en modificar las células tomadas del paciente en un medio de cultivo y luego implantarlas en el organismo. La segunda consiste en introducir los vectores que portan el gene normal, y esperar que las células se infecten *in vivo* (23). Todas estas técnicas están dirigidas hacia el mejoramiento de ciertos grupos de células somáticas, y, por lo tanto, las células germinales no tendrán modificaciones que pasen a la descendencia (24). Habría que buscar la manera de mandar el gene de la proteína normal a otros órganos, como el páncreas y el colon. Además, se debería controlar su expresión para que no se produzca la proteína en lugares

donde normalmente no se sintetiza, como el cerebro. Probablemente, al finalizar el siglo se habrán tratado las primeras personas; ya se está empezando a hacer con otras enfermedades como la inmunodeficiencia severa combinada, debida a un defecto en la enzima adenina deaminasa (25). Estas modalidades terapéuticas serán más racionales que las utilizadas ocasionalmente, como trasplantes de pulmón (26).

En un futuro, tal vez la terapia más lógica será a nivel de la línea germinal, logrando introducir el gene normal en todas las células del individuo en las futuras generaciones y de esta manera corregir de una vez por todas este problema.

### AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Alberto Restrepo Mesa y al Dr. Jorge Julián Osorio por sus valiosos comentarios.

### REFERENCIAS

1. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry Preliminary Data. Cystic Fibrosis Foundation Bethesda, 1990.
2. **Quezada R, Hernández N, Sada E.** Fibrosis quística en pancreas en mayores de 15 años en población mexicana. *Rev Invest Clin* 1990; **42**: 174-179.
3. **Vásquez C, Idígoras G, Galardi MS, et al.** Aumento de la supervivencia en niños con fibrosis quística. *An Esp Pediatr* 1990; **32**: 407-412.
4. **Tsui LC, Buchwald M, Barker D, et al.** Cystic fibrosis locus defined by genetically linked polymorphic DNA marker. *Science* 1985; **203**: 1.054.
5. **Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, et al.** Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989; **245**: 1.059.
6. **Modell B.** Cystic fibrosis and community genetics. *J Med Genet* 1990; **27**:45.
7. **Welsh MJ, Smith PL, Fromm M, et al.** Crypts are the site of intestinal fluid and electrolyte secretion. *Science* 1982; **218**: 1.219-1.221.
8. **Bradbury N, Kirk K, Bridges R, et al.** Regulation of plasma membrane recycling by CFTR. *Science* 1992; **256**:530-531.
9. **Mennie ME, Gilfillan A, Compton M, et al.** Prenatal screening for cystic fibrosis. *Lancet* 1992; **340**: 214-216.
10. **Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, et al.** Analysis of any point mutation in DNA: the amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acid Res* 1989; **17**: 2.503- 2.516.
11. **Ferie RM, Schwarz MJ, Robertson NH, et al.** Development, multiplexing, and application of ARMS tests for common mutations in the CFRT gene. *Am J Hum Genet* 1992; **51**: 251-262.
12. **Liou J, Lissens W, Devroey P, et al.** Efficiency and accuracy of polymerase chain reaction assay for cystic fibrosis allele F 508 in single cell. *Lancet* 1992; **339**: 1.190-1.192.
13. **Treize AE, Buchwald M.** In vivo cell-specific expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature* 1991; **353**: 434-436.
14. **Douglas GW, Thomas L, Carr M, et al.** Trophoblast in the circulating blood during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1959; **78**: 960-969.
15. **Attwood HD, Park WW.** Embolism to the lungs by trophoblast. *Br J Obstet Gynecol* 1961; **68**: 611-617.

16. **Mueller UW, Hjawed CS, Wright AE.** Isolation of fetal trophoblast cells from peripheral blood of pregnant women. *Lancet* 1990; **336**: 197.
17. **Adinolfi M.** On a non-invasive approach to prenatal diagnosis based on the detection of fetal nucleated cells in maternal blood. *Prenat Diagn* 1990; **11**:799.
18. **Bruch JF, Metezas P, Garcia-Fonknechten A, et al.** Trophoblast like cells sorted from maternal blood using flow cytometry. A multiparametric study involving transmission electron microscopy and fetal DNA amplification. *Prenat Diagn* 1991; **11**: 787.
19. **Jequier AM, Ansell ID, Bullimore NJ.** Congenital absence of the vas deferens presenting with infertility. *J Androl* 1985; **6**: 15-19.
20. **Anguiano A, Oatoes RD, Amon JA, et al.** Congenital bilateral absence of the vas deferens: a primarily genital form of cystic fibrosis. *Jama* 1992; **267**: 1.794-1.797.
21. **Dumar V, Gervais R, Rigot JM, et al.** Abnormal distribution of CF delta F 508 allele in azoospermic men with congenital aplasia of epididymis and vas deferens. *Lancet* 1990; **336**: 512.
22. **Trujillo C.** Terapia medica fetal. *Revista CES Medicina* 1991; **5**: 164.
23. **Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, et al.** Gene transfer into humans : immunotherapy of patients with advanced melanoma using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *NEngl J Med* 1990; **322**: 570-578.
24. **Rosenfeld MA, Yoshimura K, Trapnell BE, et al.** In vivo transfer of the human transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. *Cell* 1992; **65**:143-185.
25. **Cournoyer DC, Caskey CT.** Gene transfer into humans (editorial). *N Engl J Med* 1991; **323**: 601-603.
26. **Kerem E, Reisman J, Corey B, et al.** Prediction of mortality in patients with cystic fibrosis. *N Eng J Med* 1992; **326**: 1.187-1.191.