

F. Palau
E. Monrós
F. Prieto

Diagnóstico genético prenatal de la ataxia de Friedreich

Unidad de Genética
y Diagnóstico Prenatal
Hospital La Fe.
Valencia.

Correspondencia:
Dr. Francisco Palau
Unidad de Genética
y Diagnóstico Prenatal
Hospital La Fe
Avda. Campanar, 21
46009 Valencia.

Prenatal genetic diagnosis of Friedreich's ataxia

RESUMEN

La ataxia de Friedreich (AF) es una enfermedad neurodegenerativa que se hereda con carácter autosómico recesivo. La causa genética y el defecto bioquímico subyacente se desconocen. Por otra parte, el *locus* AF se ha localizado en el brazo largo del cromosoma 9 y se han descrito dos *loci* marcadores, D9S15 Y D9S5, polimórficos de ADN estrechamente ligados al *locus* AF. Ello permite realizar el diagnóstico presintomático y prenatal de la enfermedad en familias donde ya hay un miembro afecto.

Nosotros presentamos el estudio genético molecular de 16 familias con al menos un hijo afecto de AF, con el fin de determinar la informatividad de los marcadores D9S15 y D9S5 en la población española, y con ello diseñar una estrategia para el diagnóstico prenatal. De las 16 familias, doce mostraron informatividad total para alguno de los marcadores y las otras cuatro una informatividad parcial, lo cual indica que las herramientas moleculares de que hoy se dispone permiten el diagnóstico prenatal con elevada fiabilidad de la AF.

PALABRAS CLAVE

Ataxia de Friedreich; Ligamiento genético; Diagnóstico prenatal.

ABSTRACT

Friedrich's ataxia (FA) is a neurodegenerative disorder inherited as an autosomic recessive trait. The genetic cause and the underlying biochemical defect are at present unknown. However, an FA locus has been located on the large arm of chromosome 9, and two marker loci -D9S15 and D9S5 have been closely linked to the FA locus. It is therefore now possible to perform presymptomatic, prenatal diagnosis in families with an affected sib. We have performed a molecular genetic study in 16 families with at least one FA-affected sib in order to define the significance of the D9S15 and D9S5 markers in the Spanish population. Twelve out of the 16 families showed full linkage for some of the markers and the remaining four families showed partial linkage. This suggests that we now have the

194 necessary molecular tools to perform prenatal diagnosis of FA with a high degree of fiability.

KEY WORDS

Friedrich's ataxia; Genetic linkage; Prenatal diagnosis.

INTRODUCCIÓN

La ataxia de Friedreich (AF) es un trastorno neurodegenerativo autosómico recesivo que se caracteriza por la pérdida selectiva de fibras mielinizadas largas de la raíz dorsal y por la degeneración de los tractos espinocerebelosos. Los criterios clínicos de diagnóstico son: edad de inicio antes de los 25 años, normalmente alrededor de la pubertad, ataxia progresiva de la marcha y de los miembros, pérdida de los reflejos osteotendinosos en los miembros inferiores, respuesta plantar extensora, disartria y pérdida de los potenciales de acción sensitivos. Otros síntomas y signos no neurológicos son la escoliosis, el *pes cavus*, una cardiomiopatía y, en un 10 por cien de los afectados, diabetes *mellitus*. La enfermedad presenta una variable incidencia según las escasas series publicadas, pero en la Comunidad Valenciana se ha calculado mediante análisis de consanguinidad en 6 de cada 100.000 individuos con una tasa de heterocigotos de 1 cada 64⁽¹³⁾. El defecto bioquímico se desconoce, así como la naturaleza de la mutación genética. El *locus* AF ha sido localizado en el cromosoma 9 mediante ligamiento genético con marcadores de ADN polimórficos -los fragmentos de restricción de longitud polimórfica o FRLPs⁽²⁾-, concretamente en la región 9q13-21.1⁽¹⁹⁾. La enfermedad presenta, a pesar de cierta variabilidad clínica, una homogeneidad genética^(3, 16). Se ha descrito dos *loci* marcadores estrechamente ligados al gen AF, D9S15 y D9S5, conteniendo ambos varios polimorfismos útiles para el diagnóstico^(2, 6). Entre ambos *loci* la distancia física es menor de 460 Kb^(4, 23) y la distancia genética, dado el escaso número de recombinantes descrito, es de aproximadamente 1,5 cM.

La actual situación de los estudios genéticos, con la disponibilidad de varios marcadores polimórficos ligados al *locus* AF y el escaso número de recombinantes encontrados, ha permitido a Wallis y cols.⁽²¹⁾ realizar el

primer diagnóstico prenatal. Ello también permite la realización de diagnósticos predictivos^(14, 15). Dado que el gen aún no ha sido aislado y, por tanto, no se tiene ningún conocimiento de la(s) mutación(ones) que condiciona la aparición de la enfermedad en los estados homocigotos, el diagnóstico prenatal se basa en establecer la fase de segregación de los alelos de los marcadores ligados en familias que ya tengan al menos un hijo afecto de AF. En definitiva, y al igual que ocurre o ha ocurrido con otras enfermedades, tales como la Distrofia Muscular de Duchenne⁽¹²⁾, la Fibrosis Quística⁽¹⁾, el diagnóstico depende de la informatividad genética que se encuentre para cada polimorfismo y de la construcción de haplotipos en cada familia concreta.

Nosotros presentamos 16 familias españolas en las que hemos realizado el análisis molecular con cuatro marcadores polimórficos estrechamente ligados al *locus* AF, con el fin de determinar la informatividad de los mismos para el diagnóstico prenatal -también predictivo- de la AF. El empleo de estos marcadores, fundamentalmente dos con un alto contenido de información polimórfica (C.I.P.), ha demostrado que había una total informatividad, esto es, ambos padres eran heterocigotos, en 12 familias, y una informatividad parcial para algún marcador en las otras cuatro. Todo ello indica la posibilidad de realizar un diagnóstico genético prenatal con una elevada fiabilidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

El ADN genómico se aisló de leucocitos periféricos de acuerdo con protocolos estándar de extracción félica y precipitación con etanol. Se dirigió cinco µg de ADN con la enzima de restricción apropiada, se fraccionó los fragmentos en un gel de agarosa al 0,8% y se transfirió a una membrana de nylon (Hybond-N, Amersham)⁽²⁰⁾. Las sondas genómicas se marcaron con método de marcaje aleatorio empleando oligocebadores y 32P-dCTP⁽⁵⁾ o digoxigenina-11-dUTP (Boehringer Mannheim). La hibridación se realizó durante la noche a 65° C en tampón Church (PO₄HNa₂ 0,5 M, SDS 7%, EDTA 1mM). Los filtros se lavaron hasta SSC 0,1x, SDS 0,1% a 65° C y la autorradiografía o autoquimioluminografía se llevó a cabo a -70° C durante 1-3 días o a temperatura ambiente durante un día respectivamente. La tabla 1 muestra las características de las sondas utilizadas.

Tabla 1 Características de los marcadores de ADN ligados al locus de la ataxia de Friedreich

Locus	Marcador	Nº alelos	C.I.P. ^a
D9S15	MCT112/MspI	2	0,33
	MCT112/μS ^b	7	0,79
D9S5	DR47/TaqI	2	0,14
	26P/BstXI	3	0,55

a: Contenido de información polimórfica.
b: Secuencia microsatélite

El polimorfismo microsatélite se analizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) con el objetivo de amplificar un segmento aproximado de 200 pb que contiene una secuencia (dC-dA)n.(dG-dT)n polimórfica identificada en el interior de la sonda MCT112⁽²²⁾. Las reacciones de la RCP se llevaron a cabo en un volumen total de 25 μL el cual contenía 20 ng de ADN genómico, 50 pmoles de los oligocebadores, dGTP 200 μM, dCTP 200 μM, dTTP 200 μM, dATP 25 μM (Pharmacia), 10 μCi 35S-dATP a 500 Ci/mM (Du-Pont), Tris-HCl pH 8,3 10 mM, KCl mM, MgCl2 1,5 mM y gelatina 0,01%. Se añadió aceite mineral (Perkin Elmer-Cetus), a las muestras y éstas se procesaron en un termo-ciclador Perkin Elmer-Cetus a lo largo de 35 ciclos de 72° C durante 30 s de fase de elongación, 94° C durante 15 s de desnaturalización y 51° C durante 30 s de anillamiento, con un paso último de elongación de 10 min. Los productos se analizaron en un gel de poliacrilamida al 6% y se visualizaron mediante autoradiografía tras 12-16 horas de exposición a temperatura ambiente.

RESULTADOS

El estudio de ligamiento genético realizado en siete familias con dos o más afectados ha demostrado que la población española presenta una homogeneidad genética con otras poblaciones europeas y norteamericanas. Los valores «lod score» encontrados han sido: D9S15, z = 1,88 (O = 0,04) y D9S5, z = 3,63 (O = 0,00)⁽¹⁶⁾.

En la tabla 2 se muestra la informatividad hallada para cada uno de los marcadores. El contenido de información polimórfica es similar al descrito en la literatura para cada uno de ellos. El marcador más

Tabla 2 Estudio de la informatividad genética (%)

Marcador	Total	Parcial	Ninguna	Nº familias
MCT112/MspI	5 (33)	3 (20)	7 (47)	15
MCT112/μS	9 (75)	1 (8,4)	2 (16,6)	12
DR47/TaqI	0	3 (22,5)	11 (78,5)	14
26P/BstXI	8 (53,3)	6 (40)	1 (6,6)	15

Tabla 3 Análisis global de la informatividad genética (%)

Estudios totales	56*
Familias con alguna informatividad total	12 (75)
Familias con dos o más informatividades totales	8 (50)
Familias con alguna informatividad parcial	4 (25)

*De los 64 posibles

informativo fue la secuencia microsatélite de la sonda MCT112, para la cual se encontró una heterocigosidad en el 75 por cien de las 12 familias en las que se analizó. También fue bastante informativo 26P, que demostró informatividad total en el 50 por cien de las familias. Por el contrario, DR47 resultó ser muy poco informativo, encontrándose sólo informatividad parcial y ésta en un 22,5 por cien de las familias.

Se realizó un total de 56 estudios de los 64 posibles (Tabla 3). En 12 familias (75%) se halló informatividad total en al menos uno de los cuatro marcadores, siendo en ocho de ellas (50%) la informatividad total en dos o más marcadores. En las otras cuatro únicamente se objetivó informatividad parcial, si bien fueron las familias en las que no se analizó la secuencia microsatélite, o sea, el marcador con mayor información polimórfica, por lo que es posible que alguna de estas familias pueda ser informativa para este polimorfismo.

DISCUSIÓN

La metodología de la genética inversa está permitiendo que se aislen los genes causantes de enfermedades hereditarias cuyo defecto bioquímico se desconoce, tal cual ha sido el caso de la distrofia muscular de Duchenne⁽¹²⁾ y la fibrosis quística⁽¹¹⁾. El primer paso consiste en

196 la localización cromosómica del gen mediante ligamiento genético utilizando una batería de marcadores polimórficos. Ello conduce a encontrar uno o varios de estos marcadores estrechamente ligados al gen en cuestión, de modo que se pueda definir en cada familia la fase de segregación del alelo mutante a partir del genotipo del probando en función del marcador ligado. Este hecho permite determinar en los familiares del probando bien el estado de afecto presintomático, bien de portador sano o bien de no portador. La utilidad clínica de estos marcadores, específicos para cada enfermedad en la que se haya establecido su localización cromosómica, depende del contenido de información polimórfica (CIP), su cercanía al gen de que se trate -lo cual viene definido por la fracción de recombinación para la cual se obtiene el valor más alto de «lod score» que nos mide el ligamiento genético- y el número de marcadores disponibles y su localización, proximal o distal, respecto al gen.

Los dos *loci* marcadores ligados al *locus* AF, D9S15 y D9S5, se encuentran separados entre sí un máximo de 460 kilobases⁽²³⁾, siendo la distancia genética de 1,4 cM⁽¹⁷⁾. Se ha descrito muy pocos recombinantes entre estos dos marcadores y el *locus* AF⁽¹⁶⁾, de modo que resultan muy útiles para el diagnóstico genético.

En nuestra serie no hemos encontrado ninguna familia no informativa para todos los marcadores, esto es, al menos algún padre era heterocigoto para alguno de los marcadores. Resultados similares han sido presentados por el grupo francés de Estrasburgo⁽⁷⁾. El hecho de que un 75 por cien de nuestras familias presente informatividad total para algún marcador y que en las cuatro familias (25%) que sólo muestran informatividad parcial no se haya analizado el marcado con mayor contenido polimórfico, nos indica que el diagnóstico prenatal se puede ofrecer a las parejas que lo soliciten, con un porcentaje muy elevado -mayor del 99%⁽⁷⁾- de obtener un diagnóstico genético y que éste sea correcto.

A priori son tres las causas principales de error diagnóstico en la AF. En primer lugar, cabe destacar en diagnóstico incorrecto del probando dado que la AF tiene criterios diagnósticos clínicos y neurofisiológicos⁽⁸⁾, sin que se haya encontrado ningún marcador biológico que lo confirme. Con todo, un neurólogo experto generalmente es capaz de reconocer la enfermedad en el contexto de su historia natural y diferenciar las formas atípicas y/o frustradas⁽⁹⁾. En segundo lugar, el fenómeno de la recombinación meiótica puede inducir a error, pero en el caso de la AF este riesgo es mínimo, menor del 1 por cien. Finalmente, la falsa paternidad es difícil por tratarse de un proceso que se hereda con carácter recesivo y la tasa de portadores sanos en la población general es relativamente baja, alrededor de 1 cada 100^(13, 18, 24).

Por otra parte, mientras que en principio es posible detectar entre los hermanos de los pacientes cuál de ellos es heterocigoto portador, esto tiene escaso valor práctico, excepto en los matrimonios consanguíneos o cuando ambos padres tienen un familiar cercano afecto. Dado que la prevalencia de heterocigotos es aproximadamente de 1 en 100, un portador tiene un riesgo de 1 en 400 de tener un hijo afecto, y este riesgo no se puede valorar correctamente hasta que el gen no sea aislado y las mutaciones causales no sean analizadas directamente.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración de los doctores Y. Nakamura, A.J. Driesel y J.-L. Mandel por cedernos las sondas empleadas, y a los pacientes y familiares y a la Fundación de Ataxias Hereditarias «Adriana de Luz Caballer» por su apoyo. Este trabajo ha sido financiado, en parte, con cargo a los proyectos del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) 89/1932 y 91/0445.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Casals T, Nunes V, Giménez FJ, Badía H, Bosch A, Chillón M, Morral N, Gallano P, Estivill X. Fibrosis quística: detección de portadores en población española utilizando RFLPs. *Prog Diag Pren* 1990;2:189-195.
- 2 Chamberlain S, Shaw J, Rowland S, Wallis J, South S, Nakamura Y, Gabain A von, Farrall M, Williamson R. Mapping of the mutation causing Friedreich's ataxia to chromosome 9. *Nature* 1988;334:248-250.
- 3 Chamberlain S, Shaw J, Wallis J, Rowland A, Chow L, Farrall M, Keats B, Ritcher A, Roy M, Melancon S, Deufel T, Berciano J, Williamson R. Genetic homogeneity at the Friedreich's ataxia locus on chromosome 9. *Am J Hum Genet* 1989;44:518-521.

- 4 Chamberlain S, Shaw J, Wallis J, Wilkes D, Palau F, Williamson R. Progress towards the isolation of the genetic mutation causing Friedreich's ataxia. *J Neurol Sci* 1990;98(Suppl):8.
- 5 Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983;132:6-13.
- 6 Fujita R, Agid Y, Trouillas P, Seck A, Tommasi-Davenas C, Driesel AJ, Olek K, Grzeschik K-H, Nakamura Y, Mandel JL. Confirmation of linkage of Friedreich ataxia to chromosome 9 and identification of a new closely linked marker. *Genomics* 1989;4:110-111.
- 7 Hanauer A, Fujita R, Trouillas P, Tommasi-Davenas, Agid Y, Seck A, Mandel J-L. Prenatal diagnosis of Friedreich's ataxia. *Lancet* 1990;1:1102.
- 8 Harding AE. Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain* 1981;104:589-620.
- 9 Harding AE. *The hereditary ataxias and related disorders*. Churchill-Livingstone. Edimburgo, 1984.
- 10 Hodgson SV, Bobrow M. Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy. En: *Molecular genetics of muscle disease: Duchenne and other dystrophies*. *Br Med Bull* 1989;45:719-744.
- 11 Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA y cols. Identification of the Cystic Fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989;245:1073-1080.
- 12 Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987;50:509-517.
- 13 López Arlandis JM. *Análisis clínico y genético de los síndromes espinocerebelosos*. Tesis Doctoral. Universitat de València, 1991.
- 14 Palau F, Vilchez JJ, Beneyto M, López Arlandis JM, Martínez Castellano F, Badía L, Prieto F. Análisis genético de la ataxia de Friedreich con marcadores de ADN polimórficos. *Med Clin* 1990;94:651-654.
- 15 Palau F, Monrós E, Prieto F, Vilchez JJ, López Arlandis JM. Presymptomatic genetic diagnosis of Friedreich's ataxia. *Lancet* (enviado para publicación).
- 16 Palau F, Carvajal J, Vilchez J, López Arlandis J, Prieto F, Williamson R, Chamberlain S. Friedreich's ataxia in the Spanish population: linkage disequilibrium and recombination which determine the location of the disease locus (Manuscrito en preparación).
- 17 Pandolfo M, Sirugo G, Antonelli A, Weitnauer L, Ferretti L, Leone M, Dones I, Cerino A, Fujita R, Hanauer A, Mandel JL, DiDonato S. Friedreich ataxia in Italian families: Genetic homogeneity and linkage disequilibrium with the marker loci D9S5 and D9S15. *Am J Hum Genet* 1990;47:228-235.
- 18 Romeo G, Menozzi P, Ferlini A, Fadda S, Di Donato S, Uziel G, Lucci B, Capodaglio L, Filla A, Campanella G. Incidence of Friedreich ataxia in Italy estimated from consanguineous marriages. *Am J Hum Genet* 1983;35:523-529.
- 19 Shaw J, Litcher P, Driesel AJ, Williamson R, Chamberlain S. Regional localisation of the Friedreich ataxia locus to human chromosome 9q13-q21.1. *Cytogenet Cell Genet* 1990;53:221-224.
- 20 Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975;98:503-517.
- 21 Wallis J, Shaw J, Wilkes D, Farrall M, Williamson R, Chamberlain S, Skare JC, Milunsky A. Prenatal diagnosis of Friedreich ataxia. *Am J Med Genet* 1989;34:456-461.
- 22 Wallis J, Williamson R, Chamberlain S. Identification of a hyper-variable microsatellite polymorphism within D9S15 tightly linked to Friedreich's ataxia. *Hum Genet* 1990;85:98-100.
- 23 Wilkes D, Shaw J, Anand R, Riley J, Winter P, Wallis J, Driesel AG, Williamson R, Chamberlain S. Identification of CpG islands in physical map encompassing the Friedreich's ataxia locus. *Genomics* 1991;9:90-95.
- 24 Winter RM, Harding AE, Baraitser M, Bravery MB. Intrafamilial correlation in Friedreich's ataxia. *Clin Genet* 1981;20:419-427.