

## Tesis de Posgrado

# Poliquistosis renal autosómica dominante : Diagnóstico mediante análisis de ligamiento familiar y detección de mutaciones en pacientes portadores de la enfermedad

Iglesias, Margarita Diana

1999

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Iglesias, Margarita Diana. (1999). Poliquistosis renal autosómica dominante : Diagnóstico mediante análisis de ligamiento familiar y detección de mutaciones en pacientes portadores de la enfermedad. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3113\\_Iglesias.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3113_Iglesias.pdf)

#### Cita tipo Chicago:

Iglesias, Margarita Diana. "Poliquistosis renal autosómica dominante : Diagnóstico mediante análisis de ligamiento familiar y detección de mutaciones en pacientes portadores de la enfermedad". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3113\\_Iglesias.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3113_Iglesias.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**AÑO 1999**

**TESIS DOCTORAL**

**POLIKUISTOSIS RENAL AUTOSÓMICA DOMINANTE:  
DIAGNÓSTICO MEDIANTE ANÁLISIS DE LIGAMIENTO FAMILIAR Y  
DETECCIÓN DE MUTACIONES EN PACIENTES PORTADORES DE LA  
ENFERMEDAD.**

**AUTOR:** Lic. Diana Margarita Iglesias

**DIRECTOR:** Dra. Mariana Herrera

**CO-DIRECTOR:** Dr. Rodolfo S. Martín

**LUGAR DE TRABAJO:** Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular,  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Laboratorio de Riñón, Instituto de Investigaciones Médicas  
Alfredo Lanari  
Biología Molecular Diagnóstica

**POLIQUISTOSIS RENAL AUTOSÓMICA DOMINANTE:  
DIAGNÓSTICO MEDIANTE ANÁLISIS DE LIGAMIENTO FAMILIAR  
Y DETECCIÓN DE MUTACIONES EN PACIENTES PORTADORES DE  
LA ENFERMEDAD.**

Palabras clave: ADPKD, análisis de ligamiento, heterogeneidad genética, diagnóstico molecular, detección de mutaciones.

**AUTOSOMAL DOMINANT POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE:  
DIAGNOSIS BY PERFORMING LINKAGE ANALYSIS IN AFFECTED  
FAMILIES AND MUTATION DETECTION IN AFFECTED PATIENTS.**

Key words: ADPKD, linkage analysis, genetic heterogeneity, molecular diagnosis, mutation detection.

## Resumen

La poliquistosis renal autosómica dominante (ADPKD) es una enfermedad genética hereditaria que afecta aproximadamente a 1 en 1000 individuos. Cada hijo de un progenitor afectado posee un 50% de probabilidad de heredar el gen defectuoso y de éstos, aproximadamente el 50% desarrolla insuficiencia renal crónica. La característica patológica de esta enfermedad es el desarrollo progresivo de múltiples quistes de contenido líquido en ambos riñones y presentándose con distinta frecuencia en hígado, páncreas y bazo. La manifestación clínica de los quistes aparece entre los 20 y 30 años, aunque existe una gran variabilidad entre la población afectada. Al menos tres genes son responsables del desarrollo de la enfermedad: PKD1 localizado en la región cromosómica 16p13.3, PKD2 en 4q21-23 y PKD3, aún no localizado. La PKD1 constituye aproximadamente el 85% de los casos; un 10% presenta la forma PKD2 y el 5% restante se asociaría a la forma denominada PKD3. Los objetivos de este trabajo fueron:

1. Desarrollar un diagnóstico precoz de la enfermedad que permita detectar enfermos y portadores asintomáticos para la forma PKD1, utilizando marcadores microsatélite ya descriptos como cercanos al locus responsable de la misma.
2. Buscar y analizar las mutaciones presentes en el gen PKD1 en las familias afectadas con esta forma.
3. Desarrollar un diagnóstico precoz de la enfermedad que permita detectar enfermos y portadores asintomáticos para la forma PKD2, utilizando marcadores microsatélite ya descriptos como cercanos al locus responsable de la misma.
4. Determinar en forma fina la ubicación del gen PKD2 por medio del análisis de eventos de recombinación entre los marcadores descriptos y la enfermedad en las familias analizadas en este estudio.
5. Detectar y analizar mutaciones en el gen PKD2.
6. Analizar otras formas de poliquistosis renal.
7. Aplicar las herramientas hasta aquí desarrolladas en otras patologías quísticas hereditarias.

## **Abstract**

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is an inherited genetic disease that affects approximately 1 in 1000 individuals. Each descendent from an affected parent has 50% probability of receiving the affected gene. 50% of patients with ADPKD develop end stage renal disease as a result of progressive cyst formation in both kidneys. Cysts can also occur in other organs, for example the liver, pancreas and spleen. Clinical manifestations may first be detected between 20-30 years of age, although there may be significant variability in an affected population. At least three different genes are known to cause ADPKD: PKD1 is located at chromosome 16p13.3, while PKD2 has been mapped to 4q21-23. PKD1 accounts for about 85% of ADPKD, while in most of the remaining families the disease maps to PKD2. A small number of families (PKD3) have been reported that are unlinked to either of these loci. The major aims of this work were:

1. To develop linkage analysis for early diagnosis of ADPKD by using microsatellite markers for the PKD1 loci.
2. To determine and characterize the mutations present in the PKD1 gene in affected families.
3. To develop linkage analysis for early diagnosis of ADPKD by using microsatellite markers for the PKD2 loci.
4. To refine the localization of the PKD2 gene by analyzing recombination events between the markers used in this study and the disease in affected families.
5. To determine and characterize the mutations present in the PKD2 gene in affected families.
6. To study other forms of ADPKD.
7. To introduce linkage analysis in the study of other hereditary cystic diseases.

## **Gracias!**

- A Rodolfo Martín *por haberme presentado formal y amistosamente a la poliquistosis renal, haberme brindado la posibilidad de trabajar con ella y haberme enseñado todo sobre ella.*
- A Elvira Arrizurieta *por su apoyo académico y su trato amistoso.*
- A Alberto Kornblihtt *por brindarme la oportunidad y los medios de hacer lo que más me gusta: investigar; por su apoyo y su guía.*
- A Leo Satz *por haberme convencido en largas charlas en los atardeceres de Villa Gesell de que lo mío era la Biología; por haberme metido en este "mundo".*
- A Vivi y Mariana *por ser de lo mejor; por haberme enseñado todo lo que sé de Biología Molecular y no limitarse solo a eso;. por haberme mostrado otro "mundo" y por haberme acompañado en los momentos importantes de mi vida fuera del Laboratorio. Cada una a su manera me brindó lo mejor. Espero poder retribuirlo alguna vez y seguir el ejemplo que Uds. me marcaron. Gracias!!*
- A Daniel Grinberg *por ser una fuente de consulta fiel tanto en España como aquí y haberme enseñado todo lo que sé sobre ligamiento. Las charlas por mail o las de café aquí (aunque cortitas) fueron valiosísimas.*
- A Claudia, Rosa, Fernanda, Carmen y Mónica *por darme muchas manos técnicas (aún las que no saben nada de eso) y muchas charlas mundanas.*
- Al Laboratorio de Medicina *por darme un lugarcito y permitirme conocerlos y sentirme como en casa.*
- Al Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular *por hacerme sentir enseguida parte del mismo y poder disfrutar de muchas horas de buena onda, intercambios científicos y no tanto. En particular gracias a Santi y Claudio (que me toleraron como vecina de mesada, que no es poco), Federico, Omar, Susana, Paula, Gustavito, Demián, Sebastián y Guadalupe.*
- A Biosidus *por colaborar -los chicos de purificación y de sistemas- con esta tesis en forma directa, ya sea con mis llamadas, mis preguntas o con mis problemas científico-técnicos.*

A Beteinu *por cuidar de mis hijos de forma tal que pudiera dedicarme a esto, sabiendo que ellos están en las mejores manos.*

A Lili Daín *por las valiosas charlas sobre técnicas y proyectos.*

A Nestor Arrúa *por haber hecho maravillas con la fotografía.*

A Mariana Manrique *por haberme acompañado en forma activa en los últimos tramos de este trabajo.*

A Ariel y Daniel *por apoyar a "las chicas" en este proyecto y por lo tanto a mí en este crecimiento. A Daniel en particular por "alimentar mi espíritu".*

A Rafael, Graciela, Mariana y Oscar

*Por estar siempre ahí y hacer un esfuerzo en entender algo de todo este trabajo; por ser muy buenos amigos, de esos con los que uno puede contar para todo en todo momento.*

A Silvina *por ser mi amiga, fiel desde que empezamos a transitar estos caminos de la Biología; por poder contar siempre con vos.*

A Bella *por compartir en estos últimos tiempos (luego de una prolongada pausa) nuestro tiempo como mamás y como biólogas.*

A Marisa *por ser mi confidente en largas charlas y poder compartir conmigo una variada lista de temas (a veces un poco interrumpida!). Gracias por tu amistad!*

A Oma, Mun, Juan, Nati *por estar a mi lado en todo momento.*

*Agradezco especialmente y dedico esta tesis*

a Mami y Pá *por haberme dado todo lo que tenían y tienen a su alcance para ser hoy lo que soy. Por ser gente de bien que se preocupa por el bienestar de los suyos y los demás. Porque a Uds. les debo mi educación, mi formación en todo nivel, mi tezón, mis ganas de decir: adelante. No soy más que un reflejo de lo que son Uds. **Gracias!***

a Pato *por ser una super hermana, preocupada por todo, acompañándome en todo, estando en todo momento. Espero enseñar a mis hijos lo que significa ser hermanos usando nuestro vínculo como ejemplo.*

Y a

**Rubén**

*por ser mi compañero, porque sin tu ayuda, cariño, compañía y dedicación, esta tesis no podría haber sido lo que es: el fruto de un largo trabajo lleno de dedicación e incursiones en temas antes desconocidos. Gracias por tus opiniones, discusiones sobre temas técnicos y por sobre todo, gracias por estar a mi lado en todo momento!*

**Tini, Fede y Rodri**

*Uds. son **todo** en mi vida.*

# ÍNDICE

<b>PRÓLOGO</b>	<b>1</b>
----------------	----------

---

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
---------------------	----------

---

<b>CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA ENFERMEDAD</b>	<b>4</b>
<b>LOCALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN PKD1</b>	<b>6</b>
<b>LOCALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN PKD2</b>	<b>9</b>
<b>INTERACCIÓN PKD1-PKD2</b>	<b>10</b>
<b>LOCALIZACIÓN DEL GEN PKD3</b>	<b>11</b>
<b>CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD</b>	<b>11</b>
<b>COMPARACIÓN ENTRE LOS TIPOS PKD1, PKD2 Y PKD3</b>	<b>11</b>

<b>OBJETIVOS DE LA TESIS</b>	<b>13</b>
------------------------------	-----------

---

<b><u>CAPÍTULO 1: CARACTERIZACIÓN DE MARCADORES MICROSATÉLITE LIGADOS A PKD1 Y PKD2</u></b>	<b>14</b>
---	-----------

---

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>14</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>15</b>
<b>MARCADORES MICROSATÉLITE</b>	<b>15</b>
<b>ADN GENÓMICO</b>	<b>16</b>
<b>PURIFICACIÓN A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA</b>	<b>16</b>
<b>DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN, PUREZA E INTEGRIDAD DEL ADN</b>	<b>17</b>
<b>AMPLIFICACIÓN POR PCR</b>	<b>18</b>
<b>VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS</b>	<b>19</b>
<b>CÁLCULO DE PIC Y HET PARA CADA MARCADOR</b>	<b>20</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>21</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>23</b>

<b><u>CAPÍTULO 2: ESTUDIO DE HETEROGENEIDAD GENÉTICA EN NUESTRA POBLACIÓN</u></b>	<b>24</b>
---	-----------

---

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>24</b>
<b>DETERMINACIÓN DE LIGAMIENTO FAMILIAR</b>	<b>24</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>30</b>
<b>PACIENTES</b>	<b>30</b>
<b>ANÁLISIS GENÓMICO</b>	<b>30</b>
<b>MARCADORES MICROSATÉLITE</b>	<b>30</b>
<b>CÁLCULOS ESTADÍSTICOS</b>	<b>30</b>
<b>ANÁLISIS DE PARÁMETROS CLÍNICOS</b>	<b>32</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>33</b>
<b>ANÁLISIS DE LA SEGREGACIÓN DE LOS ALELOS DE MARCADORES MICROSATÉLITE LIGADOS A LA ENFERMEDAD Y DETERMINACIÓN DE LOD SCORE FAMILIAR.</b>	<b>33</b>
<b>FAMILIA 16001</b>	<b>33</b>

FAMILIA 16002	34
FAMILIA 16003	36
FAMILIA 16004	37
FAMILIA 16005	38
FAMILIA 16006	39
FAMILIA 16007	40
FAMILIA 16008	41
FAMILIA 16009	42
FAMILIA 16010	43
FAMILIA 16011	44
ANÁLISIS DE UNA FAMILIA SIN LIGAMIENTO AL LOCUS 16P13-23.	45
Familia 16012	45
ANÁLISIS DE LIGAMIENTO AL LOCUS 4Q21-23 EN LA FAMILIA 16012.	46
DETERMINACIÓN DE HETEROGENEIDAD GENÉTICA EN NUESTRA POBLACIÓN.	49
ANÁLISIS CLÍNICO DE LAS FAMILIAS	50
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>51</b>

### **CAPÍTULO 3: ESTUDIO DE MUTACIONES EN EL GEN PKD1** **54**

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>54</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>55</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>55</b>
PACIENTES	55
AMPLIFICACIÓN DE MUESTRAS POR PCR	55
ANÁLISIS POR SINGLE STRAND CONFORMATION POLIMORPHISM	58
SECUENCIACIÓN	60
<b>RESULTADOS</b>	<b>61</b>
ANÁLISIS DE LOS EXONES	62
ANÁLISIS DEL EXÓN 45	62
ANÁLISIS DE LOS EXONES 43 Y 44	63
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>68</b>

### **CAPÍTULO 4: ESTUDIO DE MUTACIONES EN EL GEN PKD2** **70**

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>70</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>70</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>71</b>
PACIENTES	71
AMPLIFICACIÓN DE MUESTRAS POR PCR	71
ANÁLISIS POR MEDIO DE FORMACIÓN DE HETERODÚPLEX	72
SECUENCIACIÓN	73
<b>RESULTADOS</b>	<b>74</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>76</b>

### **CAPÍTULO 5: FAMILIA CON POLIQUISTOSIS TIPO 3 (PKD3)** **77**

<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>78</b>
PACIENTES	78
EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO	78
AMPLIFICACIÓN POR PCR	78
CÁLCULOS ESTADÍSTICOS	78
<b>RESULTADOS</b>	<b>79</b>

ANÁLISIS GENÉTICO	79
DISCUSIÓN	81

---

**CAPÍTULO 6: POLIQUISTOSIS HEPÁTICA.** **83**

INTRODUCCIÓN	83
OBJETIVOS	84
MATERIALES Y MÉTODOS	84
PACIENTES	84
EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO	84
AMPLIFICACIÓN POR PCR	84
CÁLCULOS ESTADÍSTICOS	85
RESULTADOS	86
DISCUSIÓN	89

---

**CONCLUSIONES** **90**

---

**REFERENCIAS** **91**

---

**APÉNDICE** **98**

A.1.	98
A.2.	102

## PRÓLOGO

Los estudios que componen esta tesis se iniciaron en 1994. Nueve años antes, Reeders había descrito un marcador de ADN en el cromosoma 16, que era co-heredado con la poliquistosis renal. Se iniciaba así la era molecular del estudio de la enfermedad autosómica dominante más frecuente y de una de las causas de insuficiencia renal y diálisis crónica. Debido a que la enfermedad no tiene un correlato experimental estricto en la naturaleza, la búsqueda del gen dependió del empleo de la técnica del clonado posicional en familias afectadas. Con esta técnica se prueban grados de ligamiento y recombinación de marcadores polimórficos cercanos al gen y se acota así la distancia cromosómica donde éste está localizado. En la época que empezamos estos estudios no estaba descrita su secuencia, pero sí se sabía que existían 2 loci cromosómicos distintos (cromosomas 16 y 4), llamados PKD1 y PKD2 respectivamente. Con el objeto de contribuir a esa búsqueda, caracterizamos la distribución alélica poblacional de distintos marcadores polimórficos (microsatélite) en la Argentina y demostramos que –salvo leves variantes- correspondía a lo descrito en otras poblaciones caucásicas. Con esta metodología y la aplicación de un análisis estadístico avanzado de ligamiento, estudiamos 142 individuos de 12 familias afectadas. Como resultado de ello, se encontraron 11 familias con el tipo PKD1, se posibilitó el diagnóstico precoz de la enfermedad por primera vez en Argentina y se caracterizó una de las raras familias con la forma menos frecuente (PKD2). Entre diciembre de 1994 y abril de 1995 otros autores caracterizaron el gen PKD1, pero seguía la búsqueda del gen PKD2. El estudio de nuestra familia PKD2 permitió –por medio del hallazgo de recombinaciones- acotar la distancia publicada, si bien coincidió el momento (marzo de 1996) con la publicación por otros de la caracterización del gen PKD2. Con esta nueva información distintos grupos comenzaron con el estudio de las mutaciones del gen. Nosotros empleamos técnicas de "screening" (SSCP y heterodúplex) y de secuenciación para analizar exones de parte del gen PKD1 (no todo el gen puede estudiarse por encontrarse porciones repetidas en otros lugares del cromosoma) y de exones del gen PKD2. De esta manera pudimos caracterizar una sustitución puntual (cambio de C por T) en el exon 44 del gen PKD1, con la aparición de un sitio de restricción y una inserción de una T en el exón 13 del gen PKD2, con la eliminación de un sitio de restricción. Estos hallazgos contribuyeron-junto a los de otros autores- a crear un mapa de los sitios y tipos de mutaciones presentes en esta enfermedad, que se encuentra ahora en pleno desarrollo en nuestro y en otros laboratorios. Del análisis de ligamiento de familias también surgieron 2 ejemplos interesantes, con la potencialidad para contribuir a la caracterización de nuevos genes. Se trata de una familia con poliquistosis renal que no corresponde a los genes caracterizados (sexta familia descrita hasta el momento) y de otra con poliquistosis hepática hereditaria sin quistes renales (cuarta descrita hasta el momento). Con estas familias se ha comenzado una colaboración con otros grupos en su mejor caracterización y en la búsqueda de sus genes. En resumen, los estudios aquí

presentados han contribuido al diagnóstico precoz de la enfermedad, al estudio de sus mutaciones y a crear un enfoque molecular para el tratamiento futuro de numerosas familias afectadas.

**Publicaciones presentadas durante el desarrollo de esta investigación:**

**"Gen de la poliquistosis renal: punto de llegada o de partida?"** Editorial, *Medicina* 55: 181-182. (1995).

**"Poliquistosis renal: Diagnósticos en Argentina por técnicas de Biología Molecular"**, *Rev. Nefrol. Diál. y Transpl.* 38: 19-23. (1995).

**"Genetic heterogeneity in adult polycystic kidney disease in Argentina"** DM Iglesias, RS Martín, A Fraga, M Virginillo, AR Kornblihtt, E Arrizurieta, M Viribay, JL San Millán, M Herrera, V Bernath. *Journal of Medical Genetics* 1997; 34: 827-830.

**"Atrial mixoma in a woman with autosomal dominant polycystic kidney disease type 2"** Iglesias D., Gagliardi J.A., Fraga A.R., Herrera M., Gallo A., Arrizurieta E., Baldi J., Bernath V., Martín R.S. *Am J Kidney Diseases* 1997; 29: 164- .

**"Severe fetal malformations associated with trisomy 16 confined to the placenta"** Sánchez J.M., Díaz S., Panal M.J., Moya G., Kenny A., Iglesias D., Wolstenholme J. *Prenatal Diagnosis* 1997; 17; 8: 777-779.

**"Isolated polycystic liver disease unlinked to polycystic kidney disease 1 and 2"** Diana M. Iglesias, Juan A. Palmitano, Elvira Arrizurieta, Alberto R. Kornblihtt, Mariana Herrera, Viviana Bernath, Rodolfo S. Martín. *Digestive Diseases and Sciences* en prensa.

## INTRODUCCIÓN

*The cystic degeneration of the kidneys,  
once it reaches the point where it can be recognized  
or suspected during life, is an illness without cure.  
(Rayer 1841)*

En el año 460 AC, Hipócrates describió 4 tipos de enfermedades del riñón. Dos de ellas se ajustan a la descripción de cálculos renales asociados a obstrucción renal. Las dos restantes son más difíciles de identificar, aunque una se asemeja en su descripción a la poliquistosis renal. Eustaquio puede haber sido el primero que en 1564 describió anatómicamente la poliquistosis renal, a juzgar por uno de sus dibujos. Recién en el siglo XIX, con la evolución de la anatomía patológica, es posible obtener descripciones de riñones poliquísticos. En el *Traité des maladies des reins* publicado en 1841 aparecen detalladas ilustraciones de la *transformación quística* (Cruveilhier) ó *degeneración* (Rayer) de los riñones. La naturaleza hereditaria de la poliquistosis es descrita por primera vez por Steiner en 1899 y luego demostrada claramente por Cairns en 1925 y Dalgaard en 1957. Este último establece el carácter autosómico dominante de la enfermedad y la diferencia claramente de otras que también presentan quistes renales (Dalgaard O.Z., 1957). A pesar del gran número de publicaciones sobre aspectos clínicos y patológicos de la enfermedad que aparecieron durante los siglos XIX y XX, hasta hace poco no existían esperanzas de cambiar la opinión de Rayer relacionada con la ausencia de cura para esta enfermedad. En los últimos 15 años, a partir de la evolución de la genética molecular y la fisiología celular, es posible pensar en el desarrollo de un diagnóstico precoz y renovar las esperanzas de soluciones reales para la enfermedad.

La poliquistosis renal autosómica dominante (ADPKD) es una enfermedad genética hereditaria que afecta aproximadamente a 1 en 1000 individuos y lleva en el 50% de los casos a insuficiencia renal crónica. En Argentina el 9,9% de los aproximadamente 7.000 pacientes en diálisis crónica padece la enfermedad. Esta prevalencia ocasiona un gasto a la Seguridad Social de alrededor de 10 millones de dólares anuales (Comité del Registro Latinoamericano de Diálisis y Transplante renal, 1997). Siguiendo un patrón de herencia autosómico dominante, cada hijo de un progenitor afectado posee un 50% de probabilidad de heredar el gen defectuoso y de éstos, aproximadamente el 50% desarrolla insuficiencia renal crónica. La característica patológica de esta enfermedad es el desarrollo progresivo de múltiples quistes de contenido líquido en ambos riñones y presentándose con distinta frecuencia en hígado, páncreas y bazo (Gabow, 1993). La manifestación clínica de los quistes aparece entre los 20 y 30 años, aunque existe una gran variabilidad entre la población afectada (Bear et al., 1984; Milutinovic et al.,

1992). Los síntomas y signos más frecuentes son: hipertensión arterial, dolores abdominales agudos o crónicos, tumor abdominal, infecciones urinarias, nefrolitiasis, aneurismas cerebrales (Chapman et al., 1992), hipertrofia ventricular, anormalidades cardíacas, etc. Si bien estos síntomas y signos no son exclusivos de la poliquistosis, la presencia de alguno de ellos en individuos con antecedentes familiares de la enfermedad constituye un "llamado de atención" y hace considerar la realización de un diagnóstico por imágenes mediante ecografías, tomografías o resonancia magnética nuclear. Estas técnicas surgieron en las décadas del '70 y '80 y son aún los métodos no invasivos más eficaces para diagnosticar la enfermedad. Sin embargo, las ecografías sólo detectan quistes de un tamaño mayor a 1 cm y las tomografías –si bien detectan quistes más pequeños- no permiten un barrido como la ecografía. Ambos métodos muestran una incidencia importante de falsos negativos; así un 14% de los individuos que heredan el gen defectuoso no muestran quistes por esos métodos entre los 20 y 30 años de edad, desarrollándolos posteriormente (Bear et al., 1984). Solamente el análisis genético molecular permite el diagnóstico precoz en todos los casos.

### **CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA ENFERMEDAD**

La introducción de la biología molecular en el terreno de la ADPKD es bastante reciente. Los objetivos principales en el estudio de esta enfermedad fueron la localización de el o los genes responsables de la enfermedad y el desarrollo de métodos de diagnóstico precoz. Se inició así la búsqueda de marcadores genéticos ligados a la enfermedad. En 1985, Reeders de la Universidad de Oxford, describió un marcador de ADN localizado en el brazo corto del cromosoma 16, que era co-heredado con la enfermedad. Se trataba de una región hipervariable o polimórfica asociada al gen de la alfa-globina que resultaba útil en la identificación de los afectados (Reeders et al., 1985). A partir de este evento se describieron un gran número de marcadores polimórficos asociados a ADPKD. El análisis se realizaba por Southern Blot, relacionando la variabilidad en la diferencia de corte de un determinado fragmento de ADN por parte de las enzimas de restricción con la herencia de la enfermedad en el grupo familiar (Harris et al., 1990; Germino et al., 1990). Más tarde se comenzó con el análisis de marcadores denominados microsatélites (Weber y May, 1989).

Un marcador microsatélite es un fragmento de ADN que contiene repeticiones de di- tri o tetranucleótidos en un número variable y particular para cada individuo (por ejemplo ACAC... o TCATCA...). Cada microsatélite posee diferentes alelos definidos por el número de

repeticiones. Cada individuo posee 2 alelos para cada microsatélite y estos se heredan siguiendo las leyes de Mendel. Si tomamos un determinado microsatélite y observamos el número de alelos que existe en la población podremos definir la variabilidad alélica de ese marcador. Cuanto más alta es su variabilidad alélica en la población, mayor es el polimorfismo que presentan estos marcadores y por lo tanto más útiles resultarán en el diagnóstico. Estos marcadores permiten realizar lo que se denomina "prueba de ligamiento", en la cual se analiza la herencia conjunta de la enfermedad y un alelo particular de un determinado microsatélite en un grupo familiar cerrado. Este análisis se realiza en cada familia afectada y en forma independiente. La co-herencia de un determinado marcador y la enfermedad se relaciona directamente con la proximidad física del marcador al locus de interés. A mayor separación física, mayor es la probabilidad de un evento de "crossing-over" (recombinación) entre ambos y por lo tanto menor será el ligamiento. A mayor proximidad, más difícil será su separación por un evento de recombinación y mayor será el ligamiento. Si se utilizan marcadores flanqueantes, es decir localizados a ambos lados del locus, se aumenta enormemente la precisión de la prueba. Es conveniente utilizar un gran número de marcadores para que en su conjunto sean informativos en la mayoría de las familias. Es importante en estos ensayos analizar a varios miembros de la familia a estudiar. La prueba no puede realizarse sobre el individuo afectado únicamente, ya que es necesario poder determinar en la familia cuales alelos acompañan a la enfermedad y cuales a los individuos sanos y así analizar su herencia entre los miembros. Deben analizarse al menos dos miembros afectados y en lo posible tres generaciones, establecer las relaciones biológicas entre los individuos en forma fehaciente y caracterizar clínicamente a los individuos mediante ecografías abdominales, determinación de parámetros de función renal, etc.

El uso de los marcadores microsatélite se difundió y actualmente se utilizan rutinariamente en el estudio de familias afectadas (Harris et al., 1991).

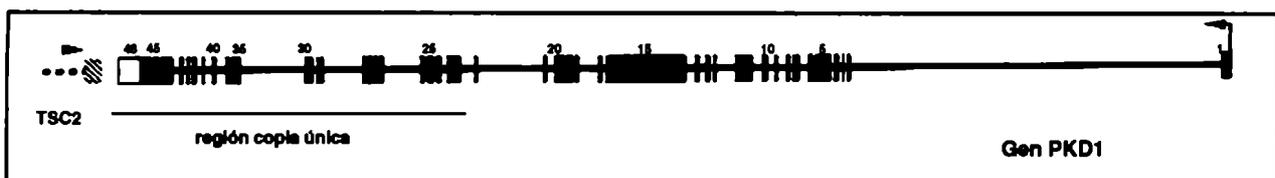
En 1988 se analizaron dos familias con poliquistosis que no presentaban ligamiento a marcadores del cromosoma 16 (Kimberling et al., 1988; Romeo et al., 1988). A partir de este hallazgo y la descripción posterior de otras familias, se caracterizó un segundo tipo de poliquistosis, PKD2, con características clínicas levemente diferentes a la PKD1 y cuyo locus se localizó en el cromosoma 4. La poliquistosis tipo 1 es la más frecuente, constituyendo aproximadamente el 85% de los casos con una edad de comienzo de insuficiencia renal terminal promedio de 56 años. Un 10% presenta la forma PKD2 con una edad de comienzo de IRC promedio de 70 años.

Desde 1993 hasta la fecha se publicaron 5 casos que no presentan ligamiento a los

marcadores caracterizados para PKD1 y PKD2 (Daoust et al, 1993; Almeida et al., 1995; Bogdanova et al., 1995; Turco et al., 1996; Ariza et al., 1997). A esta nueva forma se la denomina PKD3.

## LOCALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN PKD1

En diciembre de 1994 el Consorcio Europeo para la Poliquistosis Renal Autosómica Dominante publicó en la revista *Cell* parte de la secuencia del gen PKD1 (The European Polycystic Kidney Disease Consortium, 1994). Previamente el Consorcio Europeo de Esclerosis Tuberosa había ubicado al gen TSC2 en el cromosoma 16 en una región cercana a la candidata para la localización del gen PKD1 (European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium, 1993). Los genes TSC se caracterizan por ser genes supresores de tumores y supresores de crecimiento. El Consorcio encontró una familia portuguesa que presentaba las dos patologías: poliquistosis renal autosómica típica y esclerosis tuberosa. Madre e hija sufrían poliquistosis renal y presentaban una translocación balanceada entre los extremos de los cromosomas 16 y 22. Es decir, existía intercambio de pequeños segmentos entre cromosomas no homólogos. Otro hijo presentaba las dos enfermedades, poliquistosis renal y esclerosis tuberosa, pero la translocación no era balanceada; se había perdido el extremo del cromosoma 16 sin ser ocupado por un trozo de otro cromosoma. Así, estos rearrreglos evidenciaban la desaparición del gen de la esclerosis tuberosa –que al no estar presente producía la enfermedad por su carácter supresor- y resaltaba el locus probable del gen de la poliquistosis renal, ya que el punto de ruptura se hallaba en la zona candidata y por lo tanto la enfermedad en este individuo podía ser atribuible a la ruptura del gen tan buscado.



Esquema del gen PKD1. Las líneas representan los intrones; los rectángulos, los exones. Sobre los mismos se indica el número de exón.

Se trata de un gen ubicado adyacente al locus TSC2 en una orientación “cola con cola” en la región 16p13.3. Tres cuartas partes del gen se encuentran duplicados en un sitio vecino al locus 16p13.1. Esta región duplicada contiene tres genes de gran homología con el gen PKD1 los

cuales se transcriben a RNA mensajero. Es por ello que solo se pudo en un principio clonar y secuenciar la región no duplicada. En esta región se encuentra un marcador microsatélite denominado KG8. Al ser este un marcador intragénico, brinda gran información cuando se lo incluye conjuntamente con el resto de los marcadores microsatélites vecinos al gen PKD en los estudios de ligamiento.

En abril del año 1995, se publicó la secuencia completa del gen (The International Polycystic Kidney Disease Consortium, 1995). Es un gen compuesto por 46 exones de un tamaño de 52 kb. El transcrito primario contiene aproximadamente 14,1 kb y codificaría para una proteína de 4.302 aminoácidos. Solamente unas 3,5 kb del extremo 3' del transcrito provienen de la región del gen en copia única. El resto se repite en genes homólogos que son en un 75% idénticos al gen PKD1.

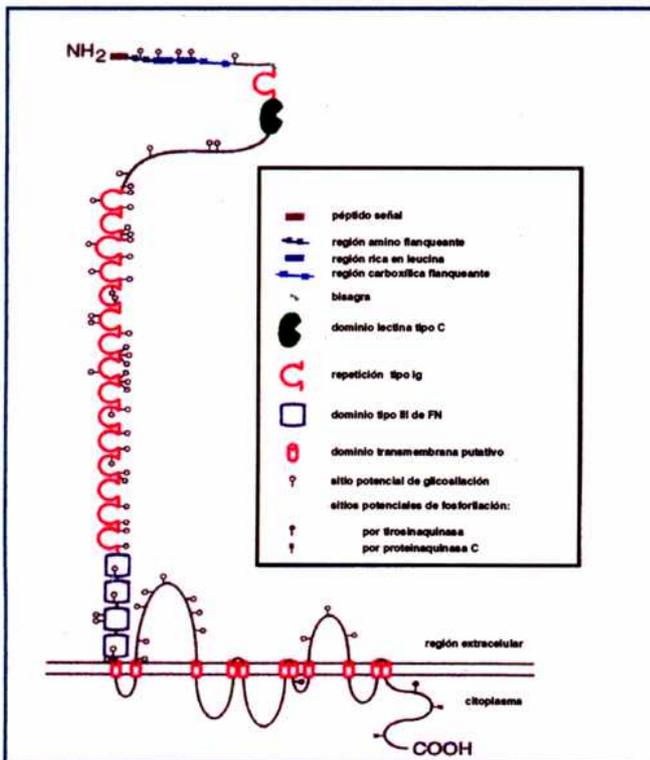


Figura I.2. Estructura propuesta para la policistina 1.

23 aa y conteniendo un mosaico de dominios: repeticiones ricas en leucina flanqueadas por estructuras ricas en cisteína, dominios tipo LDL-A y lectina tipo C, 16 dominios tipo inmunoglobulina, cuatro dominios tipo III de fibronectina y 14 dominios de 80 aminoácidos aún no descriptos.

El análisis de esta estructura sugiere que la policistina es una proteína integral de membrana, involucrada en interacciones célula-célula y/o célula matriz extracelular (Hughes et al., 1995). Sin embargo, esta proteína no ha podido ser aún aislada y caracterizada.

A partir de la secuencia nucleotídica se puede predecir que el producto de este gen, la policistina, sería una glicoproteína compuesta por: una región aminoterminal que se extendería en unos 2.500 aminoácidos de localización extracelular, múltiples dominios transmembrana y una cola citoplasmática en el extremo carboxiterminal. El extremo aminoterminal de la proteína PKD1 presentaría una señal hidrofóbica de clivaje de

---

Hasta el momento las mutaciones encontradas en el gen resultaron de diversos orígenes (deleciones en diferentes sitios, defectos de "splicing", traslocaciones de novo, etc.) (Peral et al., 1995; Peral et al, 1996a y b; Peral et al., 1997; Rossetti et al., 1996; Turco et al.,1995; Neophytou et al., 1996; The European Polycystic Kidney Disease Consortium, 1994).

Todos los esfuerzos siguen dirigidos a comprender el origen de esta enfermedad. Una de las preguntas más difíciles de responder es por qué una mutación germinal produce quistes solamente en algunos nefrones. Germino y colaboradores aislaron epitelio de quistes renales individuales (Qian et al., 1996). Para ello tomaron quistes aislados y trabajaron con el epitelio de cada uno analizando el patrón de inactivación del cromosoma X en las mujeres afectadas. Determinaron que en todas las células que componen este epitelio, el patrón de inactivación es el mismo. Esto sugiere que el origen del quiste es monoclonal. Comparando el genotipo de los quistes y el genotipo de las células somáticas de cada individuo se observó que en los quistes se había alterado el haplotipo del cromosoma que no se hallaba afectado en la línea germinal. Esto sugiere que en los quistes se produciría una nueva mutación de novo. Este evento sería el responsable de la variabilidad fenotípica que se observa en PKD1. El número absoluto de eventos de mutación debe ser extremadamente alto en comparación a otras enfermedades renales donde también se dan mecanismos de doble evento mutacional, como por ejemplo la enfermedad tumoral de Wilms o en la enfermedad de von Hippel-Lindau o en algunos angiomiolipomas en la esclerosis tuberosa. Germino y colaboradores postulan que la presencia de un segmento de 2,5 kb de polipirimidinas presente en el intrón 21 es la causa de la tendencia a producir mutaciones. Este segmento contiene un 95% de citosinas y timinas y está presente en la cadena de ADN codificante. Este tipo de secuencias forman estructuras de tipo triple hélice, que podrían ser responsables de ciertos mecanismos de mutagénesis (Wang et al., 1996). Cuando estas estructuras son insertadas en forma experimental en células, se observa un aumento de uno o dos órdenes de magnitud en la tasa de mutación. Sorprendentemente, los eventos de mutagénesis no ocurren en células incapaces de reparar genes transcripcionalmente activos. Por lo tanto, los autores proponen que la estructura triple hélice dispararía mecanismos de reparación errónea del ADN. Así, el riesgo de que se produzca una mutación no requiere de un evento de duplicación celular sino que puede darse en cualquier momento en el que las hebras de ADN se separen para permitir la transcripción del gen. De esta forma, a lo largo de la vida, se acumulan cambios incorrectos a una tasa baja que tal vez no tengan efecto fenotípico. Pero si alguno de ellos tiene efecto y la célula presenta previamente un alelo anormal, el resultado sería la formación de quistes (Germino, 1997). Esta teoría se ve apoyada por el hecho de que la presencia de quistes únicos en individuos normales es muy frecuente y

aumenta con la edad. Aproximadamente el 25% de la población mayor de 50 años presenta quistes únicos en sus riñones.

## LOCALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN PKD2

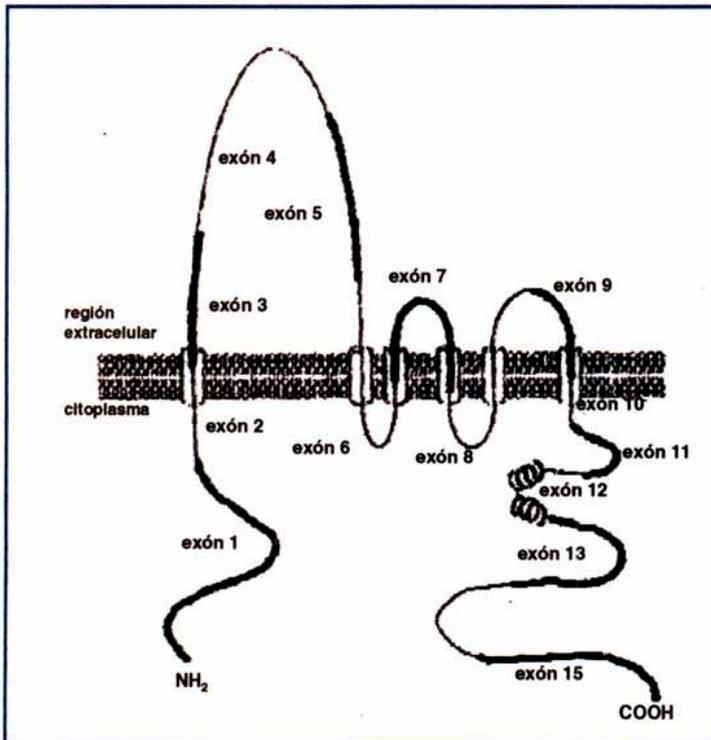


Figura I.3. Estructura propuesta para la polycistina 2.

Los estudios de ligamiento realizados con marcadores microsatélite ligados al cromosoma 16 evidenciaron la existencia de un gran número de familias que no presentaban ligamiento a ese cromosoma. Por lo tanto debía existir un segundo locus responsable de la enfermedad. Kimberling y colaboradores y Peters y colaboradores mostraron que en ciertas familias enfermas

de ADPKD, la enfermedad se heredaba ligada a marcadores ubicados en la región cromosómica 4q21-23 (Kimberling et al., 1993; Peters et al., 1993). Mochizuki y colaboradores identificaron una región con alta homología en su secuencia aminoacídica al gen PKD1 (Mochizuki et al., 1996). El estudio de esta región en tres familias afectadas permitió presentarla como la región candidata para la localización del gen PKD2 ya que se identificaron en ella diferentes mutaciones tipo "nonsense" que segregaban con la enfermedad. A partir del conocimiento de la secuencia del gen se estudiaron las mutaciones presentes en familias afectadas que presentaban ligamiento a PKD2. El gen codificaría para un único transcripto de aproximadamente 5,4 kb y un producto de 968 aminoácidos que corresponde a una proteína integral de membrana constituida de seis dominios transmembrana y extremos amino y carboxiterminales intracelulares. Existe un 15% de identidad y un 25 % de similitud entre esta proteína y una región de 450 aminoácidos de PKD1 que contiene varios dominios transmembrana. El producto

proteico del gen PKD2 presenta un gran grado de similitud con aproximadamente 270 residuos del canal de  $\text{Ca}^{2+}$   $\alpha 1\text{E}$  activado por voltaje (VACC  $\alpha 1\text{E}-1$ ), el cual pertenece a la familia de proteínas de canales activados por voltaje de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^{+}$   $\alpha 1$ . Esta región incluye cinco dominios transmembrana y parte de la región carboxiterminal que presenta un dominio putativo EF-hand que posee actividad de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  en varias proteínas. Si bien no se conoce la función de la proteína PKD2, se ha propuesto que puede funcionar como un canal de iones o bien formar un complejo homo o heteromultimérico formador de poro. El parecido estructural que poseerían las proteínas PKD1 y PKD2 sumado al patrón clínico similar que presentan ambos tipos de poliquistosis sugiere que ambas proteínas podrían interactuar en mecanismos paralelos o bien formar complejos.

## **INTERACCIÓN PKD1-PKD2**

Existen evidencias de que la policistina 1 y la policistina 2, los putativos productos proteicos de PKD1 y PKD2 respectivamente, podrían interactuar directamente a través de sus extremos carboxílicos citoplasmáticos (Tsiokas et al., 1997).

Para analizar esta hipótesis, se realizaron experimentos utilizando el sistema de doble-híbrido en levaduras (Qian et al., 1997). En ellos, el extremo carboxiterminal de la policistina 1 fue fusionado en una construcción al dominio de "binding" al ADN del factor de transcripción GAL4. El gen híbrido resultante fue transfectado en levaduras que ya portaban una construcción que contenía el extremo carboxiterminal de la proteína PKD2 fusionada al dominio transactivador de GAL4. Separado de esta forma, el factor de transcripción GAL4 sólo sería activo si sus respectivas partes se unen por interacción física entre la policistina 1 y la policistina 2. Esto es lo que sucedió, contemplando los valores positivos para la actividad GAL4, lo que sugiere que los productos de PKD1 y PKD2 interactúan directamente.

Teniendo en cuenta este dato y considerando lo descrito para el modelo de doble evento mutacional propuesto por Germino y colaboradores, un segundo evento de mutación en PKD2 podría estar relacionado a PKD1. Tal vez la regulación normal del crecimiento y diferenciación del epitelio renal requiera de una interacción de los productos de PKD1 y PKD2. Así, si la disponibilidad de policistina 2 se ve disminuida por una mutación en uno de los alelos, la pérdida de uno de los alelos PKD1 a nivel somático sería suficiente para permitir la formación de quistes. En una persona sin mutaciones germinales en PKD1 o PKD2, un quiste

requerirá en algunas células renales de la inactivación de ambas copias del gen PKD1 o bien una de PKD1 y una de PKD2. Si la probabilidad de una mutación aislada a lo largo de la vida en cualquier sitio fuese de una en mil, la probabilidad de una doble mutación sería de una en un millón. Los riñones poseen millones de nefrones y es un hecho que los individuos adquieren quistes con la edad. Es por ello que como criterio se define la poliquistosis como la presencia de un quiste en un riñón y por lo menos dos en el otro, de acuerdo al criterio propuesto por Bear y colaboradores (Bear et al., 1984).

### **LOCALIZACIÓN DEL GEN PKD3**

Hasta el presente se han localizado y caracterizado dos genes relacionados con la poliquistosis renal: PKD1 y PKD2. Para ambos existen numerosos marcadores genéticos que permiten determinar un haplotipo ligado a la enfermedad en cada familia. Sin embargo, continúan describiéndose familias con poliquistosis que no muestran ligamiento ni a PKD1 ni a PKD2 (Daoust et al, 1993; Almeida et al., 1995; Bogdanova et al., 1995; Turco et al., 1996; Ariza et al., 1997). En estos casos se hace referencia a ellas como portadoras de poliquistosis de tipo 3 o PKD3. Hasta el momento no se ha identificado a el o los genes responsables y se desconoce su localización cromosómica.

### **CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD**

#### **Comparación entre los tipos Pkd1, Pkd2 y Pkd3**

El 85% de los casos de poliquistosis serían causados por alteraciones en el gen PKD1 (Peters y Sandkuijl, 1992) y un 10% por el gen PKD2. El 5% restante correspondería a la forma PKD3. Los fenotipos asociados a las mutaciones en PKD1, PKD2 y PKD3 son muy similares. Las pequeñas diferencias existentes entre los mismos no son suficientes para distinguir clínicamente entre las 3 formas de la enfermedad.

Existe una gran heterogeneidad fenotípica entre distintas familias con el mismo tipo de PKD y una gran variabilidad clínica intrafamiliar (Milutinovic et al., 1992). En general la forma PKD2 se presenta como una forma más benigna (Parfrey et al., 1990; Ravine et al., 1992). Si bien

existe menos información en familias con PKD2, pareciera que los quistes se desarrollan a edades más tardías. En un estudio realizado por Parfrey y colaboradores, se estudiaron 125 individuos menores de 30 años pertenecientes a familias con poliquistosis tipo 1 y portadores del gen defectuoso. Se observó que el 46,6% presentaban quistes. Paralelamente se analizaron 27 individuos menores de 30 años portadores de poliquistosis tipo 2 y sólo el 11,1% presentaron quistes, lo que sugiere un desarrollo tardío en PKD2 (Parfrey et al., 1990).

Se define como penetrancia al porcentaje de individuos genéticamente afectados que desarrollan la enfermedad. En el caso de la poliquistosis, los síntomas pueden aparecer en diferentes edades, con lo cual la penetrancia es dependiente de la edad en esta enfermedad, a diferencia de otras enfermedades, en las cuales la penetrancia puede ser del 100% desde el nacimiento (es decir, todos los individuos genéticamente afectados desarrollan la enfermedad desde el momento del nacimiento). Para la poliquistosis se asume una penetrancia del 99% a partir de los 30 años de edad (Parfrey et al., 1990).

El riesgo mayor en la poliquistosis renal es el desarrollo de insuficiencia renal. La presencia de un gen defectuoso no lleva necesariamente a este desenlace.

La aparición temprana de quistes (sobre todo en niños) está asociada a una entrada más temprana en edad a IRCT. En un estudio se describió que 10 de 11 chicos diagnosticados con poliquistosis por ecografía in útero sufrieron hipertensión antes de los 5 años de edad y 3 de los 11 desarrollaron insuficiencia renal (Fick et al., 1993).

Respecto al sexo, algunos estudios demuestran que los hombres presentan una progresión más rápida a IRCT respecto a las mujeres (Dalgaard, 1957; Gabow et al., 1992).

Desde principio de siglo se ha notado un aparente aumento en la sobrevida de pacientes con poliquistosis con insuficiencia renal crónica terminal (IRCT). En el estudio clásico de Dalgaard (1957), la edad promedio de fallecimiento era de 51,5 años. En un estudio reciente se demuestra un aumento de la edad promedio a  $59 \pm 2$  años (Fick et al., 1994). Una mayor atención sobre las complicaciones cardíacas y las infecciones, como así también un intensivo cuidado y tratamiento de las manifestaciones renales y extrarenales asociadas a la enfermedad parecen aumentar la sobrevida de los pacientes.

## OBJETIVOS DE LA TESIS

Los objetivos de esta tesis fueron:

1. Desarrollar un diagnóstico precoz de la enfermedad que permita detectar enfermos y portadores asintomáticos para la forma PKD1, utilizando marcadores microsatélite ya descriptos como cercanos al locus responsable de la misma.
2. Buscar y analizar las mutaciones presentes en el gen PKD1 en las familias afectadas con esta forma.
3. Desarrollar un diagnóstico precoz de la enfermedad que permita detectar enfermos y portadores asintomáticos para la forma PKD2, utilizando marcadores microsatélite ya descriptos como cercanos al locus responsable de la misma.
4. Determinar en forma fina la ubicación del gen PKD2 por medio del análisis de eventos de recombinación entre los marcadores descriptos y la enfermedad en las familias analizadas en este estudio.
5. Detectar y analizar mutaciones en el gen PKD2.
6. Analizar otras formas de poliquistosis renal.
7. Aplicar las herramientas hasta aquí desarrolladas en otras patologías quísticas hereditarias.

## CAPÍTULO 1: CARACTERIZACIÓN DE MARCADORES MICROSATÉLITE LIGADOS A PKD1 Y PKD2

### INTRODUCCIÓN

En esta etapa se analizaron y caracterizaron los marcadores ubicados en las regiones cromosómicas 16p13.3 y 4q21-23. Los marcadores genéticos pueden ser más o menos polimórficos dependiendo del número de alelos y sus frecuencias poblacionales. El grado de polimorfismo de un marcador puede ser estimado de la proporción de individuos en la población que son heterocigotas para ese marcador. En otras palabras: la probabilidad de que un individuo al azar sea heterocigota permite estimar el grado de polimorfismo. Esta probabilidad puede ser calculada a partir de una muestra de individuos no relacionados entre sí tomados al azar. Luego de poner a punto la amplificación por PCR de los marcadores microsatélite y realizar el análisis en un número determinado de individuos normales de nuestra población, se determinaron dos índices de información: el contenido de heterocigosis (HET) y el índice de contenido polimórfico (PIC).

El valor de HET es simplemente la cantidad de heterocigosis  $H$  observada y representa la proporción de individuos heterocigotas observados en la muestra. Se calcula como:

$$H = [1 - \sum (p_i)^2] n / (n - 1)$$

donde  $n$  es el número de alelos observado en el muestreo y  $p_i$  la frecuencia del  $i$ -ésimo alelo.

Este cálculo es importante ya que alelos que se presentan en homocigosis no permiten separar cromosomas sanos de cromosomas enfermos y por lo tanto si bien puede haber una asociación de un alelo en particular a la enfermedad en un estudio familiar, no se puede distinguir el cromosoma en el cual se encuentra el gen alterado. Este valor varía entre 0 (cero) y 1 (uno), indicando este último valor que todos los alelos se presentan prácticamente en heterocigosis en la población.

El PIC es un estimador de mayor precisión y se basa en asumir que los genotipos se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg (HWE). Se calcula como:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2 p_i p_j^2$$

donde  $p_j$  es el alelo subsiguiente al  $p_i$ .

El PIC da una idea de cuán polimórfico es un marcador, si posee un gran número de alelos y sus frecuencias se encuentran uniformemente distribuidas en la población. Esto es particularmente importante en estudios de ligamiento ya que se intenta asociar para cada

familia un alelo en particular con la presencia de la enfermedad. Si existen pocos alelos, la probabilidad de que tanto afectados como sanos presenten el mismo alelo es mayor. El valor de este parámetro varía de 0 (cero) a 1 (uno), indicando este último valor que existe para ese marcador un gran número de alelos con frecuencias similares para cada uno de ellos (Ott, 1991; Terwilliger y Ott, 1994).

## OBJETIVOS

1. Poner a punto la amplificación de marcadores microsatélite ligados a los loci de interés.
2. Analizar los valores de H y PIC para cada uno de ellos y validar su uso en el análisis de ligamiento en familias afectadas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Marcadores microsatélite

Se analizaron 6 marcadores para PKD1 y 4 marcadores para PKD2. Las secuencias fueron tomadas de la literatura (Breuning et al., 1990; Harris et al., 1991; Thompson et al., 1992; Snarey et al., 1994; Peral et al., 1994; Mills et al., 1992; Dib et al., 1996)(Tabla 1.1.)

**Tabla 1.1.** Descripción de primers utilizados

Locus	Primer	Marcador	Secuencia	
PKD1	D16S21 F	D16S21	5'GAG CGA GAC TCC GTC TAA A 3'	
	D16S21 R	D16S21	5'CAG CAG CCT CAG GGT T 3'	
	KG8 F		5'CTC CCA GGG TGG AGG AAG GTG 3'	
	KG8 R		5'GCA GGC ACA GCC AGC TCC GAG 3'	
	AC 2.5 (GT)	D16S291	5'GCA GCC TCA GTT GTG TTT CCT AAT C 3'	
	AC 2.5 (AC)	D16S291	5'AGT GCT GGG ATT ACA GGC ATG AAC C 3'	
	CW2 A	D16S663	5'GTC TTT CTA GGA ATG AAA TCA T 3'	
	CW2 B	D16S663	5'ATT GCA GCA AGA CTC CAT CT 3'	
	SM7 (GT)	D16S283	5'ACA TAT GTA GTC TTC TGC AGG 3'	
	SM7 (AC)	D16S283	5'ACA AGA GTG AAT CTC TGA CAG 3'	
	SM5B (AC)	D16S284	5'GGC CAA CCT GGG TGA CAG AAC 3'	
	SM5B (GT)	D16S284	5'GAG CCA GTG CTC CTG GCC TGT 3'	
	PKD2	D4S231 F	D4S231	5'AGA TGA GTA TGT TAT TAT ACC 3'
		D4S231 R	D4S231	5'TGC TAG AGT TCC CTA GTG 3'
ΔFM 155 A		D4S1534	5'ACC AGC CCA AGG TAG AGG 3'	
ΔFM 155 B		D4S1534	5'ATT CAG TTT CAG CCC CAT 3'	
ΔFM 248 A		D4S1563	5'ACT ATT GCT GTT GCT GAC CC 3'	
ΔFM 248 B		D4S1563	5'GCT GCC TGA CAC ACT GG 3'	
D4S423 F		D4S423	5'TTG AGT AGT TCC TGA AGC AGC 3'	
D4S423 R		D4S423	5'CAA AGT CCT CCA TCT TGA GTG 3'	

La ubicación cromosómica de los marcadores elegidos se muestra en la Figura 1.1.

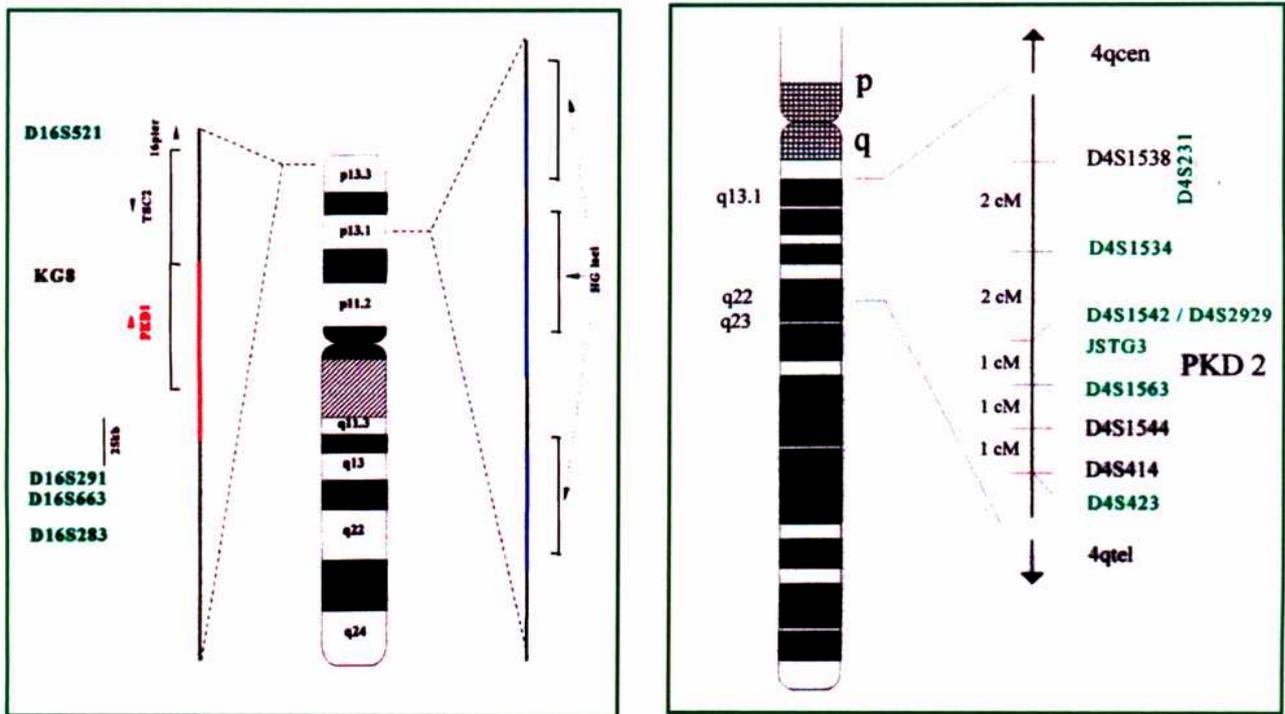


Figura 1.1. Ubicación cromosómica de los marcadores seleccionados en este estudio. Se muestran los 2 cromosomas analizados. Los marcadores elegidos se resaltan en verde.

## ADN Genómico

Se tomaron individuos al azar clínicamente sanos pertenecientes a la población argentina y se determinaron los tamaños de los alelos correspondientes para cada marcador.

## Purificación a partir de Sangre periférica

### 1. Soluciones:

#### a) Buffer TE (Tris-EDTA)

- Tris-HCl 10 mM
- EDTA 1 mM (pH 8,0)

#### b) Buffer Proteinasa K

- KCl 100 mM
- Tris-HCl 0,2 mM
- MgCl<sub>2</sub> 5 mM

- Tween 20 0,005% (v/v)
- c) SDS 20% (p/v)
- d) Proteínasa K (20 mg/ml)
- e) NaCl 3 M
- f) Etanol 70%
- g) Etanol absoluto

## 2. Procedimiento:

- ◆ Se resuspenden 350  $\mu$ l de sangre anticoagulada con EDTA (concentraci3n final 5 mM) en 1 ml de buffer TE
- ◆ Se centrifuga 30 segundos a 10.000 rpm
- ◆ Se extrae el sobrenadante y se resuspende el pellet de gl3bulos blancos en 1 ml de buffer TE
- ◆ Se repite el 3ltimo paso hasta obtener un sobrenadante limpio y un pellet blanco
- ◆ Se resuspende el pellet en 300  $\mu$ l de agua destilada y se agregan 80  $\mu$ l de buffer proteínasa K, 20  $\mu$ l de SDS 20% y 4  $\mu$ l de proteínasa K
- ◆ Se incuba a 55° C por 30 minutos
- ◆ Se agregan 120  $\mu$ l de NaCl. Se agita con vortex y se centrifuga 10 minutos a 10.000 rpm
- ◆ Se toma el sobrenadante y se le agrega un volumen de etanol absoluto
- ◆ Se mezcla y se coloca en hielo durante 20 minutos
- ◆ Se centrifuga 4 minutos a 10.000 rpm
- ◆ Se descarta el sobrenadante y se agregan 500  $\mu$ l de etanol 70%
- ◆ Se centrifuga 4 minutos a 10.000 rpm
- ◆ Se descarta el sobrenadante y se deja secar el pellet
- ◆ Se resuspende en 200  $\mu$ l de agua destilada

## **Determinaci3n de la Concentraci3n, Pureza e Integridad del ADN**

Se toma una al3cuota de 2  $\mu$ l de la soluci3n de ADN purificado y se lo lleva a un volumen de 250  $\mu$ l con agua destilada. Se mide absorci3n a 260 y 280 nm para determinar la concentraci3n y pureza del mismo. Dado que una unidad de DO corresponde a 50  $\mu$ g/ml, se calcula la concentraci3n y cantidad de ADN purificado. La relaci3n de absorbancia a 260/280 nm permite determinar el grado de contaminaci3n proteica de la muestra.



### Visualización de los Productos

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (6% (p/v) acrilamida, 7,6 M urea). En todos los casos se utilizaron marcadores cuyos tamaños fueron determinados por secuenciación.

#### A) Preparación de geles de poliacrilamida

#### B) Electroforesis

Se realizaron las corridas en un sistema de electroforesis vertical con buffer TBE 0,5X en el reservorio superior y 1X en el inferior.

#### Soluciones

##### a) TBE 10X (pH 8,0) (para 1 litro)

- Tris base 108 g
- Acido bórico 55 g
- EDTA 0,5M (pH 8,0) 40 ml

##### b) Buffer de siembra

- Formamida 98%
- 0,2 mM EDTA (pH 8,0)
- 0,025% (p/v) xilencianol (XC)
- 0,025% (p/v) azul de bromofenol (BPB)

#### C) Autorradiografía

#### Procedimiento

- ◆ Luego de separar los vidrios se cubre al gel con la solución fijadora (10% metanol, 10% acético glacial) durante unos 3 minutos, se enjuaga con agua destilada y se lo pasa a papel Whattmann. Se cubre el gel con film adherente y se lo coloca en la secadora durante 2 horas a 80°C
- ◆ Una vez que el gel está seco se lo coloca en un cassette junto con una película radiográfica y pantalla amplificadora durante un mínimo de 4 horas a -20°C
- ◆ Las placas se revelan por medio de un proceso fotográfico convencional

### **Cálculo de PIC y HET para cada Marcador**

Se realizaron utilizando el programa LINKAGE versión 5.1 gentilmente cedido por el Dr. Jurg Ott. Se trata de un programa estadístico de valoración en análisis de ligamiento genético.

## Capítulo 1: Caracterización de marcadores microsatélite ligados a Pkd1 y Pkd2 -21-

### RESULTADOS

A continuación (Tablas 1.3. y 1.4.) se detallan los resultados obtenidos en el estudio poblacional de los marcadores microsatélites ligados a los loci 16p13.3 y 4q21-23. Se determinaron el tamaño de los alelos y la frecuencia que cada alelo presenta en la población para cada marcador.

Tabla 1.3. Detalle del análisis de los marcadores ligados al locus 16p13.3

<b>Marcador D16S521</b>			<b>Marcador D16S291</b>		
Alelo	tamaño en pb	Frecuencia	Alelo	tamaño en pb	Frecuencia
1	154	0,008	1	156	0,040
2	158	0,357	2	158	0,176
3	160	0,016	3	160	0,088
4	166	0,024	4	162	0,080
5	168	0,103	5	164	0,200
6	170	0,293	6	166	0,264
7	172	0,135	7	168	0,117
8	174	0,047	8	170	0,020
9	176	0,008	9	172	0,010
10	182	0,008	10	174	0,010

<b>Marcador KG8</b>			<b>Marcador D16S284</b>		
Alelo	tamaño en pb	Frecuencia	Alelo	tamaño en pb	Frecuencia
1	96	0,026	1	115	0,016
2	104	0,052	2	117	0,960
3	106	0,026	3	119	0,016
4	110	0,800			
5	112	0,052			
6	116	0,052			

<b>Marcador D16S283</b>			<b>Marcador D16S663</b>		
Alelo	tamaño en pb	Frecuencia	Alelo	tamaño en pb	Frecuencia
1	85	0,014	1	107	0,014
2	87	0,051	2	111	0,051
3	89	0,030	3	113	0,030
4	91	0,200	4	117	0,200
5	93	0,507	5	119	0,507
6	95	0,080	6	121	0,080
7	97	0,030	7	123	0,030
8	99	0,051	8	125	0,051
9	101	0,036	9	127	0,036
10	103	0,007	10	131	0,007

Tabla 1.4. Detalle del análisis de los marcadores ligados al locus 4q21-23

Marcador D4S423			Marcador D4S231		
Alelo	tamaño en pb	Frecuencia	Alelo	tamaño en pb	Frecuencia
1	103	0,023	1	158	0,074
2	107	0,023	2	160	0,260
3	109	0,047	3	162	0,330
4	111	0,142	4	164	0,130
5	113	0,214	5	166	0,074
6	115	0,310	6	168	0,092
7	117	0,083	7	170	0,018
8	119	0,120	8	172	0,018
9	121	0,023			
10	125	0,011			

Marcador D4S1534			Marcador D4S1563		
Alelo	tamaño en pb	Frecuencia	Alelo	tamaño en pb	Frecuencia
1	144	0,250	1	210	0,650
2	146	0,180	2	212	0,050
3	148	0,045	3	214	0,016
4	150	0,045	4	216	0,081
5	152	0,068	5	218	0,114
6	154	0,227	6	220	0,016
7	156	0,136	7	222	0,032
8	158	0,045	8	224	0,032

Con los resultados presentados se hicieron los cálculos de los parámetros PIC y HET con el programa PIC del LINKAGE package versión 5.1. A continuación se detallan los resultados obtenidos.

Tabla 1.5. Análisis de tamaño y frecuencias alélicas de los marcadores analizados. Determinación de PIC y Heterocigosis

Locus	Número de alelos	Tamaño alelos (pb)	PIC	HET	Número de cromosomas analizados
D16S521	10	154-182	0,71	0,75	126
KG8	6	98-116	0,35	0,36	38
D16S291	10	156-174	0,80	0,82	102
D16S663	10	107-131	0,80	0,82	101
D16S283	10	85-103	0,66	0,68	136
D16S284	3	115-119	0,06	0,06	62
D4S231	8	158-170	0,74	0,77	53
D4S1534	8	144-158	0,79	0,82	44
D4S1563	8	210-224	0,52	0,54	61
D4S423	10	103-125	0,78	0,81	84

## DISCUSIÓN

Se caracterizaron los diferentes marcadores microsátélites ligados a PKD1 y PKD2. En cada caso se determinó el número de alelos presentes en nuestra población, el tamaño en pares de bases de cada alelo, el porcentaje de heterocigosis y el índice de contenido polimórfico. Esto se realizó con el fin de utilizar datos locales en el análisis de ligamiento familiar. Como puede observarse en la Tabla 1.5., de todos los marcadores analizados, sólo uno de ellos, el D16S284 resultó no informativo para estudios de ligamiento. Este marcador presenta sólo 3 alelos en nuestra población y uno de ellos se encuentra en el 95% de los individuos analizados lo que se traduce en un muy bajo PIC y HET y fue descartado para el análisis de ligamiento en las familias afectadas. El KG8, presenta valores de PIC y HET muy bajos. Sin embargo se lo incluye en el análisis de ligamiento ya que por ser un marcador intragénico puede resultar muy informativo. Por lo tanto no se descarta su uso en caso de requerirse un mayor número de marcadores.

Las características de los marcadores analizados no varía significativamente de las publicadas para otras poblaciones caucásicas (Breuning et al., 1990; Harris et al., 1991; Thompson et al., 1992; Snarey et al., 1994; Peral et al., 1994; Mills et al., 1992; Dib et al., 1996). La población argentina es, en su mayoría, de origen caucásico, predominantemente europea. Esto explicaría la ausencia de diferencias entre lo publicado para estas poblaciones y lo que se observa en la nuestra.

Luego de confirmar el valor de estos marcadores para el análisis de ligamiento, se procedió al estudio de los mismos en las familias afectadas con poliquistosis.

## CAPÍTULO 2: ESTUDIO DE HETEROGENEIDAD GENÉTICA EN NUESTRA POBLACIÓN

### INTRODUCCIÓN

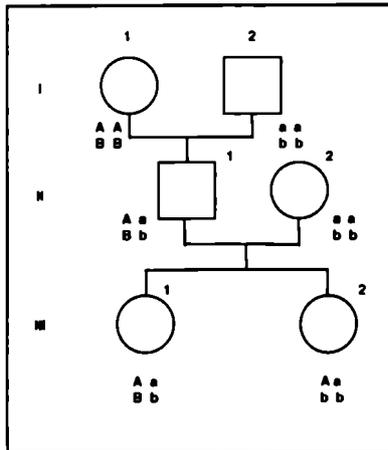
El análisis de ligamiento se basa en el concepto de que los alelos correspondientes a loci cercanos tienden a ser transmitidos en bloque durante la meiosis, sin producirse eventos de recombinación que separen alelos que se encuentran ligados en la línea parental en 2 gametas diferentes. Cuanto más cercanos se hallan 2 loci genéticos más fuerte es el ligamiento. Por lo tanto la "fuerza" de ligamiento se correlaciona con la distancia física real entre 2 loci. Esta correspondencia no es exacta ya que la frecuencia de recombinación no es uniforme a lo largo de cada cromosoma ni en todo el genoma. Sin embargo, se han podido establecer algunas definiciones y equivalencias aproximadas. Sir Thomas Morgan fue el primero en observar eventos de crossing-over o intercambio en *Drosophila melanogaster*. A partir de sus estudios se definió a 1 Morgan como la distancia entre dos loci de un mismo cromosoma en la que, en promedio, ocurre una recombinación por cada evento meiótico. Por lo tanto 1 cM es la distancia genética en la que en 1 de cada 100 meiosis ocurre un evento de recombinación (1% de recombinación). En base al número de quiasmas vistos en la meiosis I, se calculó que la longitud genética del genoma humano es de 3.000 cM. Como el genoma haploide posee aproximadamente  $3 \times 10^9$  pares de bases, se considera que 1cM equivale a 1megabase aproximadamente. Como cada cromosoma posee entre 100 y 300 cM, se esperan entre 1 y 3 eventos de recombinación por cromosoma y por meiosis. La función de Haldane nos permite transformar en forma sencilla fracciones de recombinación en cM:

$$\text{Distancia (cM)} = -0,5 [\ln (1- 2\theta)]$$

siendo  $\theta$  la frecuencia de recombinación entre dos loci.

### Determinación de Ligamiento Familiar

Dados dos genes ubicados en el mismo cromosoma, uno con alelos **A** y **a** y otro con alelos **B** y **b**, en el grupo familiar a continuación podemos observar que:



Una hija (III1) de la tercera generación hereda los haplotipos parentales A-B y a-b (no recombinante) y la otra (III2) los haplotipos A-b y a-b. En el haplotipo heredado del padre (II1) en III2, se observa un evento de recombinación, ya que el alelo A aparece ahora ligado al alelo b (recombinante). Cuando dos genes están en cromosomas distintos o suficientemente alejados en el mismo cromosoma se heredan independientemente. De esta forma, en este

grupo familiar y para los loci a y b, la relación entre recombinantes y no recombinantes es 1:1 y por lo tanto la fracción de recombinación  $\theta$  es igual a 0,5. Cuando dos genes están muy cercanos, la probabilidad de que se produzca una recombinación entre ellos es menor y por lo tanto la fracción de recombinación  $\theta$  es menor a 0,5. Cuando se analiza el ligamiento genético entre 2 loci, lo que se intenta es determinar si  $\theta = 0,5$  (loci no ligados) ó  $\theta < 0,5$  (loci ligados).

Para explorar la significación de este análisis se realiza un tratamiento estadístico que consiste en comparar la probabilidad de que los datos (fases deducidas) observados sean verdaderos en caso que los loci estuviesen ligados a una fracción de recombinación ( $\theta$ ) determinada con respecto a la probabilidad de que los datos observados sean verdaderos en caso que los loci no estuviesen ligados ( $\theta = 0,5$ ).

Se estudian razones de probabilidades a distintas  $\theta$  (entre 0,00 y 0,5)

$$\frac{L(\theta)}{L(1/2)} = \frac{\text{probabilidad de los datos si están ligados a } \theta = x}{\text{probabilidad de los datos si no están ligados } (\theta = 0,5)}$$

donde la fórmula que se utiliza es:  $\frac{L(\theta)}{L(0,5)}$

Se define como lod score al logaritmo de este cociente:

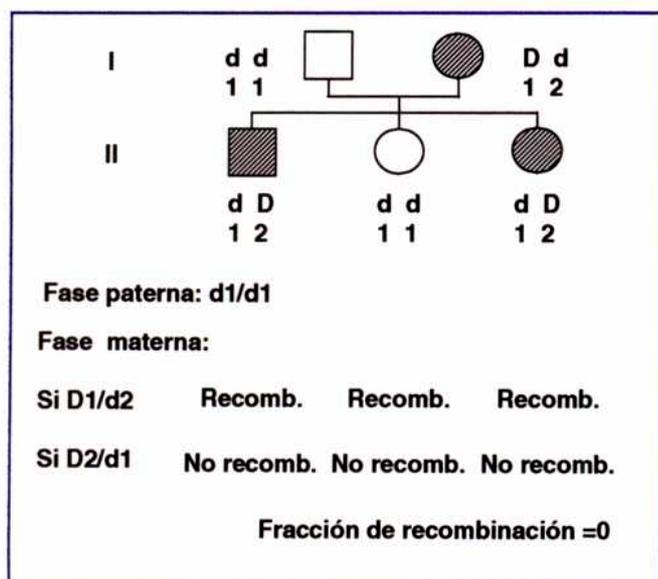
Lod score = logarithm of the odds ó logaritmo de las razones.

donde Lod score = Z

Estos cálculos se realizan para cada familia en particular. La utilización de logaritmos hace que los valores sean aditivos y se puedan sumar familias. **Valores positivos** de Z sugieren **loci ligados** y **valores negativos** sugieren una alta probabilidad de **loci no ligados**.

Por convención, valores de lod score **mayores o iguales a 3** indican una **probabilidad de ligamiento** de 1000 a 1. Se considera el valor de  $\theta$  para el que Z alcanza un valor máximo como el mejor estimador de la fracción de recombinación (estimador de máxima verosimilitud). Valores de lod score **menores o iguales a 2** son **prueba definitiva de exclusión o no ligamiento entre 2 genes**.

¿Como se realizan estos cálculos? Supongamos el siguiente caso:



Si asumimos que la fase materna (que nos es desconocida) es D1/d2, los 3 hijos presentarían haplotipos recombinantes. Si asumimos la fase materna como D2/d1, los 3 hijos presentarían haplotipos no recombinantes. En este caso, la fracción de recombinación sería igual a cero.

¿Cual es la probabilidad de obtener este resultado si **ambos loci se encuentran totalmente ligados**?

Si están ligados, entonces se formarán únicamente dos tipos de gametas:

D	y	d
1		2

si la fase es D1/d2.

Por lo tanto la probabilidad es:

$$L(\theta) = 1/2 \times (1/2 \times 1/2 \times 1/2) = 1/16$$

¿Cual es la probabilidad de obtener este resultado si **ambos loci no están ligados**?

Si no están ligados, entonces se formarán cuatro tipos de gametas:

D	D	d	d
1	2	1	2

y la probabilidad será:

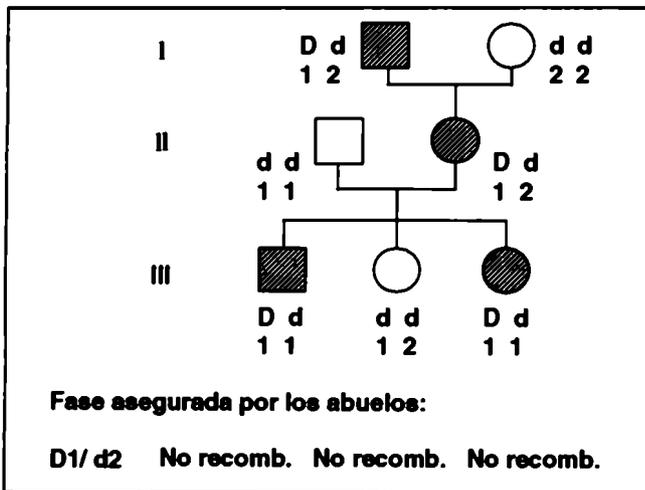
$$L(\theta=0,5) = 1/4 \times 1/4 \times 1/4 = 1/64$$

Por lo tanto el lod score será igual a:

$$Z = \log \frac{\text{probabilidad de los datos si están ligados } (\theta=0)}{\text{probabilidad de los datos si no están ligados } (\theta=0,5)}$$

$$Z = \log \frac{1/16}{1/64} = \log 4 = 0,602$$

Supongamos este otro caso en el cual podemos asegurar la fase gracias al análisis de los abuelos:



Nuevamente, ¿cual es la probabilidad de obtener este resultado si **ambos loci se encuentran totalmente ligados?**

Si están ligados, entonces se formarán únicamente dos tipos de gametas:

D	d
1	2
	y

si la fase es D1/d2.

Por lo tanto la probabilidad es:

$$L(\theta) = (1/2 \times 1/2 \times 1/2) = 1/8$$

¿Cual es la probabilidad de obtener este resultado si **ambos loci no están ligados?**

Si no están ligados, entonces se formarán cuatro tipos de gametas:

D	D	d	y	d
1	2	1	y	2

y la probabilidad será:

$$L(\theta=0,5) = 1/4 \times 1/4 \times 1/4 = 1/64$$

Por lo tanto el **lod score** será igual a:

$$Z = \log \frac{\text{probabilidad de los datos si están ligados } (\theta=0)}{\text{probabilidad de los datos si no están ligados } (\theta=0,5)}$$

$$Z = \log \frac{1/8}{1/64} = \log 8 = 0,903$$

En este ejemplo se observa que el hecho de poder asegurar fases en una línea familiar permite aumentar enormemente la estimación de la probabilidad obteniendo un valor de lod score más cercano al valor 3; de allí la necesidad en este tipo de estudios de analizar el mayor número de individuos posible.

Para el caso en que el pedigree familiar presente un gran número de individuos y varias generaciones, los cálculos estadísticos se tornan dificultosos. Existen programas estadísticos como el LINKAGE que facilitan los cálculos matemáticos. En el caso arriba planteado, si se aplica la fórmula a varios valores de  $\theta$ , obtendríamos una tabla de la siguiente forma:

Valores de lod score (Z) a distintos valores de $\theta$									
Tipo de pedigree	0,00	0,01	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	$Z_{\text{máx}}$	$\theta_{\text{máx}}$
Fase desconocida	0,602	0,589	0,533	0,465	0,318	0,170	0,049	<b>0,602</b>	<b>0,00</b>
Fase conocida	0,903	0,890	0,837	0,765	0,612	0,438	0,237	<b>0,903</b>	<b>0,00</b>

donde el  $\theta_{\text{máx}}$  es el límite de la recombinación real cuando el número de meiosis tiende a infinito.

La fórmula aplicada es:

$$L(\theta) = \frac{1}{2^n} \theta^r (1-\theta)^q$$

donde  $n$  es el número de meiosis,  $r$  el número de recombinantes y  $q$  el número de no recombinantes. Se van reemplazando entonces en la fórmula diferentes valores para  $\theta$  (0,1, 0,2, 0,3, etc.).

De esta forma se realizan los cálculos correspondientes para cada marcador en un número suficiente de familias y se valida así al marcador como ligado a la enfermedad.

## OBJETIVOS

En esta etapa del estudio y acompañando los avances que se realizaron en esta enfermedad se procedió a:

1. Determinar si los marcadores caracterizados se hallan realmente ligados a la enfermedad. Para ello se realizó análisis de ligamiento en familias afectadas y se determinó por medio del programa LINKAGE los valores de lod score para cada marcador. Un valor de lod score mayor a 3 valida a un marcador como ligado a la enfermedad y permite su uso como marcador de ligamiento.
2. Caracterizar individuos pertenecientes a familias afectadas, portadores de haplotipos que mostrasen recombinaciones entre estos marcadores y la enfermedad. Esto permitió acotar la región de localización del locus de la enfermedad y analizar el sitio de recombinación con marcadores ubicados en esa región.
3. Validar este tipo de estudio como método diagnóstico presintomático en el marco de la gran variabilidad clínica que presenta la enfermedad tanto intra- como interfamiliar para todos los tipos (PKD1, PKD2, PKD3).
4. Determinar si existe heterogeneidad genética en nuestra población, es decir, si existe más de un locus responsable de la enfermedad.
5. Analizar parámetros clínicos con el objetivo de poder determinar diferencias entre los diferentes tipos de poliquistosis.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Pacientes**

Los pacientes fueron principalmente evaluados en el Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari de la Universidad de Buenos Aires. Los pacientes y sus familias participaron en este estudio expresando su consentimiento para la extracción de sangre y ADN y la realización de estudios ultrasonográficos. En caso de menores de edad con riesgo de padecer la enfermedad, el consentimiento fue dado por los padres. El número total de individuos analizados fue de 142 (12 casos index y 130 familiares). En cada familia fueron analizados un mínimo de 2 generaciones y 2 miembros afectados (cada uno perteneciente a una generación). Como se mencionara en la introducción, los individuos fueron considerados afectados cuando presentaron un quiste en un riñón y por lo menos dos en el otro de acuerdo al criterio definido por Bear y colaboradores.

### **Análisis Genómico**

Se realizó una extracción de ADN a partir de sangre periférica de cada integrante familiar, afectado o sano, de acuerdo a lo descrito en el capítulo anterior (Capítulo 1, materiales y métodos, pág.16-17).

### **Marcadores Microsatélite**

Se analizaron los alelos presentes en cada miembro de las diferentes familias para los marcadores caracterizados tal como se describiera en el Capítulo 1, materiales y métodos, pág.15. Se conformaron los haplotipos de acuerdo a la herencia para cada individuo.

### **Cálculos Estadísticos**

El análisis de ligamiento se realizó para cada familia utilizando las opciones MLINK e ILINK del programa LINKAGE versión 5.1 gentilmente cedido por el Dr. Ott.

Con el objetivo de validar el ligamiento de cada marcador genético estudiado al locus de la enfermedad, se realizó un análisis de dos puntos (two point analysis) y se calculó un valor de lod score a partir de la suma de todos los valores de lod score calculados para cada familia.

Para el análisis de heterogeneidad poblacional se realizó un análisis de tres puntos (three point analysis). Se asumieron frecuencias génicas para la enfermedad de 0,001 para PKD1 y 0,0001 para PKD2. Debido a que la poliquistosis presenta penetrancia edad-dependiente, es decir desarrollo de la enfermedad a diferentes edades, es necesario definir grupos de edades de riesgo. Esto significa que un porcentaje de la población genéticamente afectada presenta síntomas a una determinada edad, otro porcentaje lo hace a otra edad, etc. Se toma como edad límite la de 55 años, en la cual todos los individuos portadores de la enfermedad presentan sintomatología. De acuerdo a la penetrancia según la edad de la enfermedad, para PKD1 se consideraron tres grupos de riesgo. Estos grupos se armaron de acuerdo a datos clínicos observados en nuestra población y a datos previos. Las penetrancias determinadas fueron 0,64, 0,92 y 0,99 para los grupos de edades 0-10 años, 10-30 años y mayores de 30 años respectivamente. Esto significa que el 64% de los individuos portadores del gen afectado presentarán quistes entre los 0 y 10 años de edad. Para PKD2 también se consideraron tres grupos de riesgo y las penetrancias asignadas fueron 0,5, 0,85 y 0,95 para los grupos de edades 0-20, 20-30 y mayores de 30 años respectivamente. Los cálculos de ligamiento se realizaron bajo la hipótesis de que no existen diferencias en la tasa de recombinación entre hombres y mujeres y que no existe interferencia genética.

En el análisis de heterogeneidad poblacional se consideraron las distancias genéticas reales de cada marcador de acuerdo a la localización cromosómica publicada una vez mapeados los genes PKD1 y PKD2, excepto para D16S521 que fue estimado a partir de los datos familiares disponibles en este estudio.

El análisis multipoint (o tres puntos) fue realizado utilizando el programa LINKMAP asumiendo un orden fijo de marcadores y considerando 10 intervalos para realizar los cálculos. La distancia y el orden asignados fue: [D16S283-D16S663-D16S291]- 0,035- D16S521. El valor 0,035 corresponde a la frecuencia de recombinación observada entre los marcadores mencionados. Los lod score familiares resultantes fueron analizados posteriormente con el programa HOMOG para determinar heterogeneidad poblacional.

### **Análisis de Parámetros Clínicos**

Se analizaron un total de 142 pacientes de los cuales 58 eran individuos afectados, 60 familiares no afectados o de riesgo y 24 cónyuges. Para cada individuo se determinó la edad, la edad de aparición de síntomas, la presencia de quistes por ecografía abdominal o tomografía computada y se registró si presentaban insuficiencia renal crónica terminal (IRCT), o si se encontraban en diálisis, si han sido transplantados y en algunos casos se realizaron valoraciones de creatinina sérica. Los datos fueron analizados estadísticamente por medio de un análisis Chi cuadrado.

## RESULTADOS

### Análisis de la Segregación de los Alelos de Marcadores Microsatélite ligados a la Enfermedad y Determinación de Lod Score familiar.

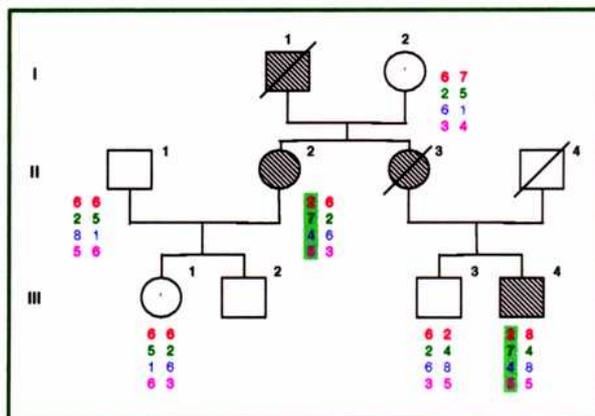
Se analizó en cada grupo familiar el ligamiento a marcadores microsatélite ligados al locus 16p13.3. Para cada grupo familiar: se determinaron los diferentes haplotipos, se definió el haplotipo que segrega con la enfermedad en el núcleo familiar y por medio del programa LINKAGE se calcularon los valores de lod score y  $\theta$  para cada marcador. Con estos resultados se testeó la hipótesis de heterogeneidad genética en nuestra población.

#### Familia 16001

a)

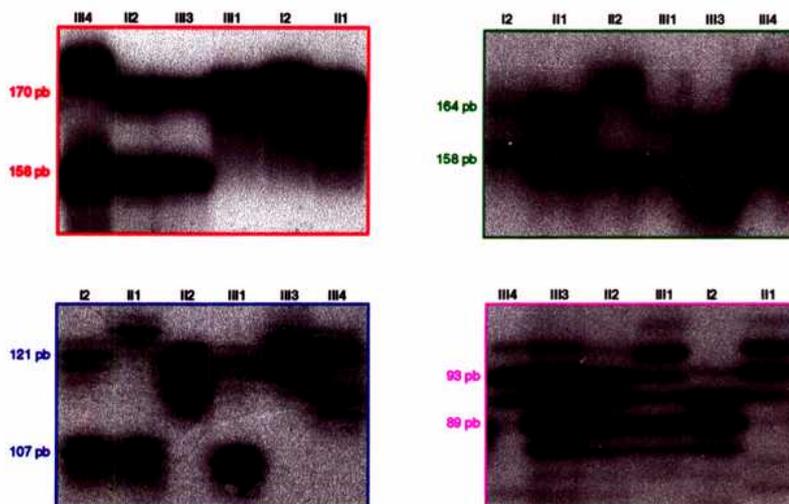
Figura 2.1. Estructura familiar y segregación alélica en la familia 16001.

La estructura familiar se muestra en la figura. Los cuadrados denotan hombres, los círculos mujeres. Los símbolos rayados representan individuos afectados. Símbolos cruzados representan individuos fallecidos. Los haplotipos se indican debajo de cada individuo. El haplotipo ligado a la enfermedad se halla resaltado. Los alelos de D16S521 se indican en rojo, los de D16S291 en verde, los de D16S663 en azul y los de D16S283 en fucsia.



b)

b) Autoradiografía de los geles de poliacrilamida donde se muestran los alelos para cada individuo analizado. Los tamaños fueron determinados previamente en un gel de secuenciación por comparación con la secuencia del fago M13. En rojo se indica el marcador D16S521, en verde D16S291, en azul D16S663 y en fucsia D16S283. En todos se indica el tamaño de los alelos en pares de bases.



En esta pequeña familia, los dos miembros afectados comparten el haplotipo 2-7-4-5. La mujer II2 hereda de su madre sana el haplotipo 6-2-6-3, por lo tanto el haplotipo heredado del padre afectado es el 2-7-4-5. Su sobrino afectado es portador de la misma fase, transmitida por su hermana, también afectada. Esto indica claramente cual es el haplotipo asociado a la enfermedad en esta familia. Todos los individuos analizados son mayores de 30 años excepto III1.

Tabla 2.1. Análisis de ligamiento por medio del programa linkage 5.1 para la familia 16001

Valores de lod score (Z) a distintos valores de $\theta$								
Marcador	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	Z <sub>máx</sub>	$\theta_{máx}$
D16S521	0,50	0,48	0,41	0,30	0,16	0	0,51	$6 \times 10^{-3}$
D16S291	1,13	0,92	0,70	0,48	0,24	0	1,13	0,0
D16S663	1,16	0,95	0,72	0,49	0,25	0	1,16	0,0
D16S283	1	0,83	0,64	0,45	0,23	0	1	0,0

Los valores de lod score resultan ser valores altos y máximos a frecuencias de recombinación iguales o cercanas a cero lo que indicaría que los marcadores se encuentran ligados a la enfermedad en esta familia.

Familia 16002

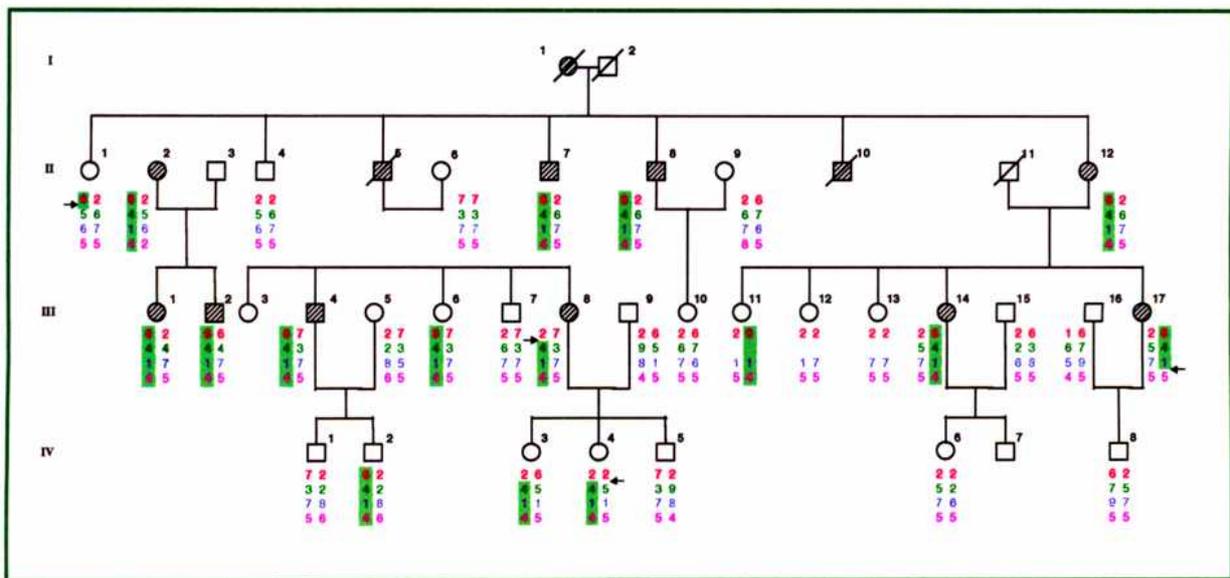


Figura 2.2. Estructura familiar y segregación alélica en la familia 16002.

Figura 2.2 (continuación). La estructura familiar se muestra en la figura. Los cuadrados denotan hombres, los círculos mujeres. Los símbolos rayados representan individuos afectados. Símbolos cruzados representan individuos fallecidos. La flecha indica un evento de recombinación. Los haplotipos se indican debajo de cada individuo. El haplotipo ligado a la enfermedad se halla resaltado. Los alelos de D16S521 se indican en rojo, los de D16S291 en verde, los de D16S663 en azul y los de D16S283 en fucsia..

Tabla 2.2. Análisis de ligamiento por medio del programa linkage 5.1 para la familia 16002

Valores de lod score (Z) a distintos valores de $\theta$								
Marcador	$\theta$	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
D16S521	$-\infty$	2,27	1,93	1,31	0,52	0	2,29	0,082
D16S291	4,55	3,95	3,10	2,06	0,87	0	4,55	0
D16S663	3,62	3,10	2,37	1,50	0,55	0	3,62	0
D16S283	$-\infty$	2,81	2,35	1,61	0,66	0	2,85	0,071

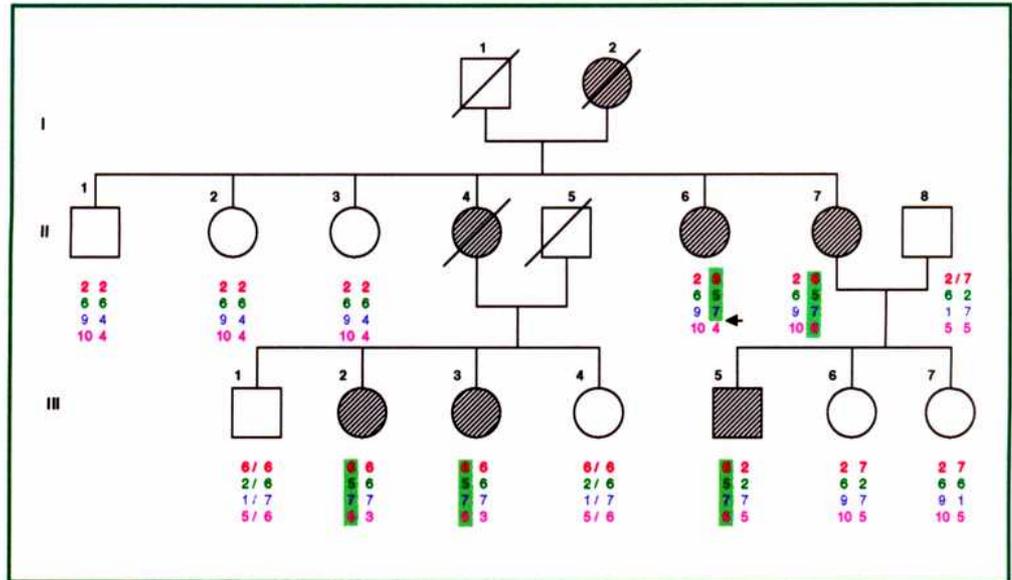
Esta familia resultó ser altamente informativa debido al gran número de individuos analizados. Puede observarse que la fase que acompaña a la enfermedad en esta gran familia es la **6-4-1-4**. En los individuos III8 y III17 se observan eventos de recombinación señalados con una flecha. En el primer caso se da entre la enfermedad y el marcador D16S521 y en el segundo caso entre la enfermedad y el marcador D16S283. Los miembros III6 y III11 no han querido ser evaluados clínicamente pero se presentaron al estudio en forma voluntaria para colaborar en la determinación del haplotipo en esta familia. Los individuos de la generación IV son individuos de riesgo ya que todos son menores de 20 años. Algunos de ellos son portadores del haplotipo que segrega con la enfermedad en esta familia.

En este caso puede observarse que los valores de lod score para cada marcador son cercanos o superiores a 3 y bastaría con esta familia para validar estos marcadores como cercanos al locus de la enfermedad. En el caso de los marcadores más cercanos, se ve que el máximo Z se obtiene a  $\theta = 0$ . Para el caso de los marcadores más lejanos, en los cuales en el análisis de haplotipos ya se observan eventos de recombinación, los valores máximos de Z se obtienen a  $\theta$  cercanos a 0,1.

Familia 16003

Figura 2.3. Estructura familiar y segregación alélica en la familia 16003.

La estructura familiar se muestra en la figura. Los cuadrados denotan hombres, los círculos mujeres. Los símbolos rayados representan individuos afectados. Símbolos cruzados representan individuos fallecidos. La flecha



indica un evento de recombinación. Los haplotipos se indican debajo de cada individuo. El haplotipo ligado a la enfermedad se halla resaltado. Los alelos de D16S521 se indican en rojo, los de D16S291 en verde, los de D16S663 en azul y los de D16S283 en fucsia.

En esta familia todos los individuos son mayores de 30 años. La fase que se presenta como asociada a la enfermedad es la 6-5-7-6 y es compartida por los miembros II6, II7, III2, III3 y III5. Los haplotipos de los individuos III1 y III4 no han podido ser determinados con exactitud debido a la ausencia de los padres. El hecho de presentar algunos alelos diferentes a los tíos hace también dificultosa la asignación de haplotipos.

Tabla 2.3. Análisis de ligamiento por medio del programa linkage 5.1 para la familia 16003

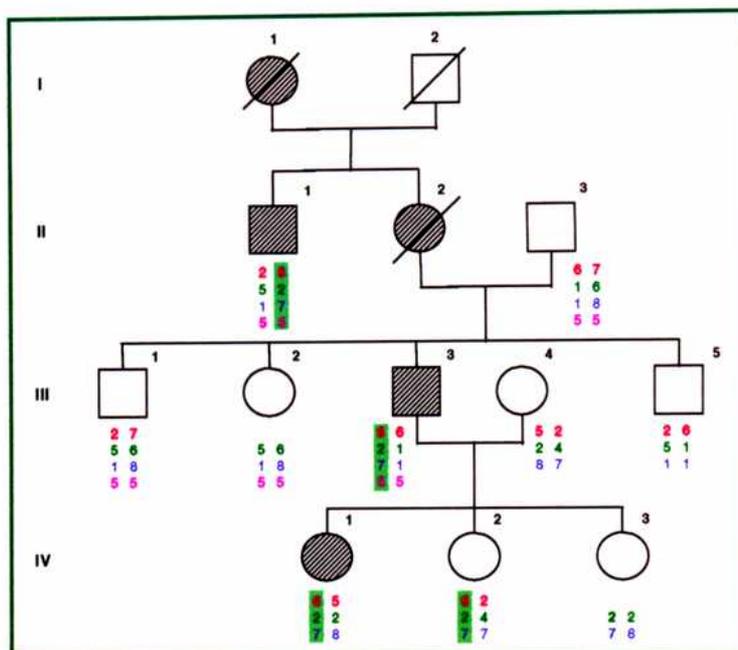
Valores de lod score (Z) a distintos valores de $\theta$								
Marcador	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	Z <sub>máx</sub>	$\theta_{máx}$
D16S521	1,19	0,89	0,61	0,33	0,08	0	1,19	0,0
D16S291	2,20	1,66	1,10	0,57	0,14	0	2,20	0,0
D16S663	2,72	2,16	1,56	0,91	0,28	0	2,72	0,0
D16S283	$-\infty$	0,50	0,45	0,27	0,07	0	0,50	0,125

Debido a que el individuo II-6 presenta una recombinación en el haplotipo ligado a la enfermedad entre el marcador proximal D16S283 y la enfermedad, el valor de lod score máximo se encuentra a  $\theta = 0,1$ . Para los marcadores restantes el valor máximo de Z se obtiene a una fracción de recombinación igual a cero.

Familia 16004

Figura 2.4. Estructura familiar y segregación alélica en la familia 16004.

La estructura familiar se muestra en la figura. Los cuadrados denotan hombres, los círculos mujeres. Los símbolos rayados representan individuos afectados. Símbolos cruzados representan individuos fallecidos. Los haplotipos se indican debajo de cada individuo. El haplotipo ligado a la enfermedad se halla resaltado. Los alelos de D16S521 se indican en rojo, los de D16S291 en verde, los de D16S663 en azul y los de D16S283 en fucsia.



La fase que se presenta como asociada a la enfermedad en esta familia es la **6-2-7-5**, presente en todos los individuos afectados. Los miembros de la generación IV son menores de 10 años, por lo tanto el diagnóstico clínico es incierto para los individuos representados como sanos. De las restantes generaciones todos los individuos son mayores de 30 años. III2 es portadora de un quiste simple en un riñón; sin embargo presenta altas probabilidades de no ser atribuible a la enfermedad familiar ya que no es portadora de la fase ligada.

Tabla 2.4. Análisis de ligamiento por medio del programa linkage 5.1 para la familia 16004

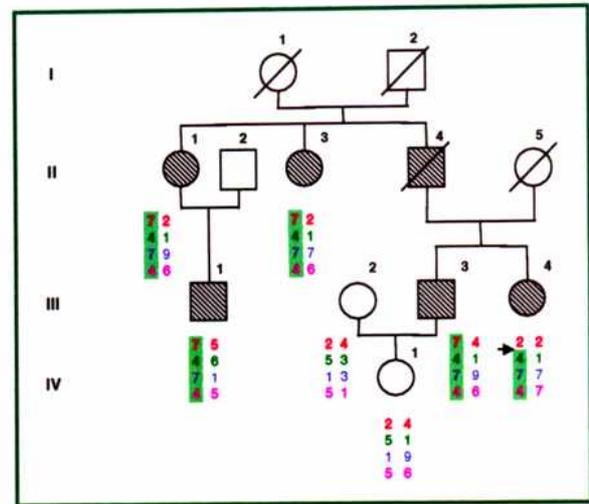
Valores de lod score (Z) a distintos valores de $\theta$								
Marcador	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	Z <sub>máx</sub>	$\theta$ <sub>máx</sub>
D16S521	0,76	0,57	0,38	0,20	0,05	0	0,76	0,0
D16S291	0,87	0,71	0,52	0,30	0,09	0	0,87	0,0
D16S663	0,83	0,69	0,50	0,30	0,09	0	0,83	0,0
D16S283	0,08	0,05	0,02	0,01	0,00	0	0,08	0,0

Debido a que el marcador proximal D16S283 se presenta en homocigosis en todos los miembros de esta familia, se obtienen bajos valores de lod score que representan una baja informatividad para ese marcador en esta familia. Para el resto de los marcadores los valores de lod score son positivos y máximos a frecuencias de recombinación igual a cero.

Familia 16005

Figura 2.5. Estructura familiar y segregación alélica en la familia 16005.

La estructura familiar se muestra en la figura. Los cuadrados denotan hombres, los círculos mujeres. Los símbolos rayados representan individuos afectados. Símbolos cruzados representan individuos fallecidos. La flecha indica un evento de recombinación. Los haplotipos se indican debajo de cada individuo. El haplotipo ligado a la enfermedad se halla resaltado. Los alelos de D16S521 se indican en rojo, los de D16S291 en verde, los de D16S663 en azul y los de D16S283 en fucsia.



El análisis de marcadores ligados en esta familia indica que el haplotipo que segrega con la enfermedad es el **7-4-7-4** excepto en el individuo III4 que presenta una recombinación entre el marcador distal lejano (D16S521) y la enfermedad. El cálculo a dos puntos en esta familia indica la existencia de probabilidad de ligamiento a los marcadores en 16p13.3.

Tabla 2.5. Análisis de ligamiento por medio del programa linkage 5.1 para la familia 16005

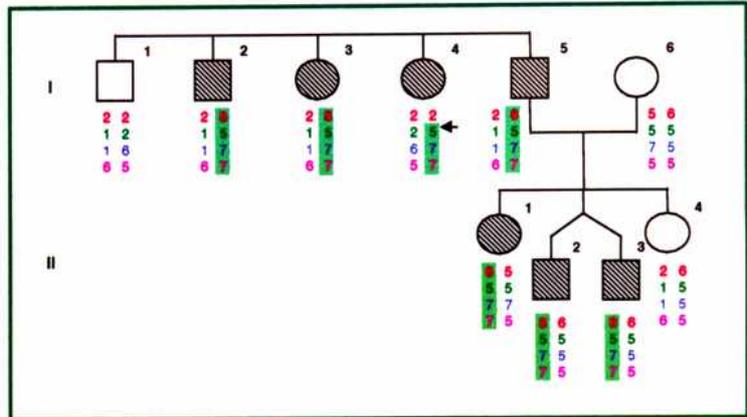
Valores de lod score (Z) a distintos valores de $\theta$								
Marcador	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	Z <sub>máx</sub>	$\theta_{máx}$
D16S521	-1,800	-0,030	0,070	0,060	0,034	0	0,078	0,236
D16S291	0,750	0,520	0,300	0,130	0,024	0	0,750	0
D16S663	-0,280	-0,190	-0,130	-0,090	-0,040	0,014	0,014	0,500
D16S283	0,570	0,350	0,180	0,065	0,009	0	0,570	0

Debido a que existe un evento de recombinación en esta familia para el marcador D16S521, se obtiene un valor máximo de Z a  $\theta = 0,236$ . En el caso del marcador D16S663, en varios individuos afectados aparece en homocigosis y por lo tanto los valores de lod score son menores respecto a otros marcadores situados a igual distancia.

Familia 16006

Figura 2.6. Estructura familiar y segregación alélica en la familia 16006.

La estructura familiar se muestra en la figura. Los cuadrados denotan hombres, los círculos mujeres. Los símbolos rayados representan individuos afectados. La flecha indica un evento de recombinación. Los haplotipos se indican debajo de cada individuo. El haplotipo ligado a la enfermedad se halla resaltado. Los alelos de D16S521 se indican en rojo, los de D16S291 en verde, los de D16S663 en azul y los de D16S283 en fucsia.



En esta familia, la fase presente en todos los individuos afectados es la **8-5-7-7**. II4 heredó de su padre -a diferencia de sus hermanos afectados- el otro haplotipo 2-1-1-6, también compartido por el único hermano sano del padre.

Tabla 2.6. Análisis de ligamiento por medio del programa linkage 5.1 para la familia 16006

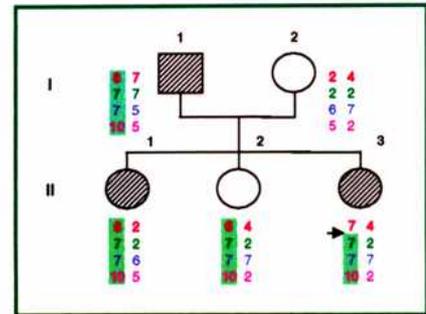
Valores de lod score (Z) a distintos valores de $\theta$								
Marcador	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	Z <sub>máx</sub>	$\theta$ <sub>máx</sub>
D16S521	-1,55	0,70	0,61	0,36	0,11	0	0,70	0,11
D16S291	1,80	1,42	1,02	0,57	1,64	0	1,80	0,00
D16S663	1,78	1,41	1,01	0,57	1,64	0	1,78	0,00
D16S283	2,05	1,64	1,19	0,70	0,20	0	2,05	0,00

Los valores de lod score son altos y máximos a frecuencias de recombinación iguales a cero salvo para el marcador distal D16S521 para el cual se observa un evento de recombinación en el individuo I4 de la familia. Por lo tanto para ese marcador el máximo valor de Z está a  $\theta = 0,1$ .

Familia 16007

Figura 2.7. Estructura familiar y segregación alélica en la familia 16007.

La estructura familiar se muestra en la figura. Los cuadrados denotan hombres, los círculos mujeres. Los símbolos rayados representan individuos afectados. La flecha indica un evento de recombinación. Los haplotipos se indican debajo de cada individuo. El haplotipo ligado a la enfermedad se halla resaltado. Los alelos de D16S521 se indican en rojo, los de D16S291 en verde, los de D16S663 en azul y los de D16S283 en fucsia.



Los miembros de la familia II1, II2 y II3 comparten la fase 6-7-7-10, aunque en el último miembro se observa un evento de recombinación entre el marcador distal D16S521 y la enfermedad. Todos los miembros de la generación II son menores de 30 años, por lo tanto II2 es un individuo de riesgo, portador de la fase ligada a la enfermedad.

Tabla 2.7. Análisis de ligamiento por medio del programa linkage 5.1 para la familia 16007

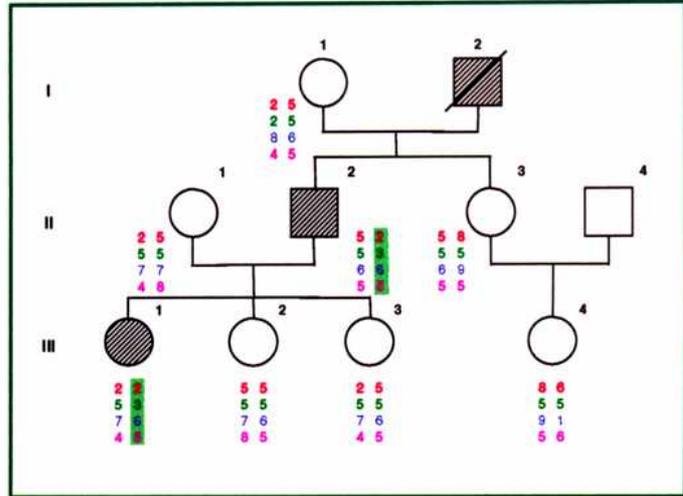
Valores de lod score (Z) a distintos valores de $\theta$								
Marcador	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	Z <sub>máx</sub>	$\theta_{máx}$
D16S521	$-\infty$	-0,44	-0,2	-0,07	-0,01	0	0	0,5
D16S291	0	0	0	0	0	0	0	0,5
D16S663	0,3	0,21	0,13	0,06	0,02	0	0,3	0
D16S283	0,3	0,21	0,13	0,06	0,02	0	0,3	0

Los valores de lod score son positivos salvo para los marcadores D16S291 y D16S521. En el primer caso, por presentarse en homocigosis en el padre afectado, el programa no puede calcular ligamiento y por lo tanto los valores son cero. En el segundo caso, debido a que existe una recombinación en un individuo afectado y a la presencia de un individuo con diagnóstico incierto, los valores de lod score son negativos. De todas formas, el análisis de las fases en el grupo familiar indica que existe ligamiento. Un análisis multipoint permitirá analizar con más datos si se trata de una poliquistosis tipo 1.

Familia 16008

Figura 2.8. Estructura familiar y segregación alélica en la familia 16008.

La estructura familiar se muestra en la figura. Los cuadrados denotan hombres, los círculos mujeres. Los símbolos rayados representan individuos afectados. Símbolos cruzados representan individuos fallecidos. Los haplotipos se indican debajo de cada individuo. El haplotipo ligado a la enfermedad se halla resaltado. Los alelos de D16S521 se indican en rojo, los de D16S291 en verde, los de D16S663 en azul y los de D16S283 en fucsia.



II2 heredó de su padre afectado el haplotipo **2-3-6-5**, que no es compartido con su hermana sana y sí lo porta su hija III1, quien se halla afectada. Es decir que la fase que acompaña la enfermedad en esta familia es la antes mencionada.

Tabla 2.8. Análisis de ligamiento por medio del programa linkage 5.1 para la familia 16008

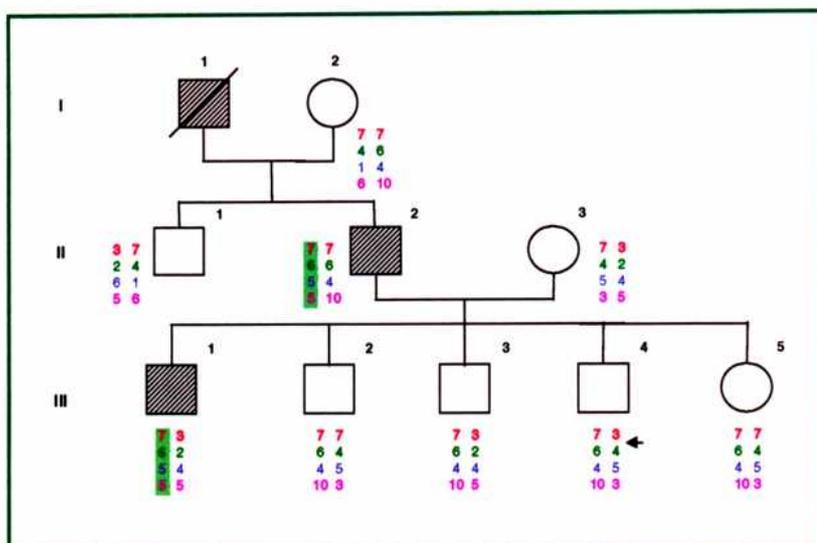
Valores de lod score (Z) a distintos valores de $\theta$								
Marcador	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	Z <sub>máx</sub>	$\theta_{máx}$
D16S521	0,76	0,58	0,41	0,25	0,100	0	0,76	0,0
D16S291	1,13	0,92	0,69	0,46	0,230	0	1,13	0,0
D16S663	0,30	0,21	0,13	0,06	0,017	0	0,30	0,0
D16S283	-0,17	-0,10	-0,05	-0,02	-0,005	0	0,00	0,5

Debido a que los marcadores D16S283 y D16S663 se presentan en esta familia en homocigosis y con alelos muy frecuentes en la población, los valores de lod score obtenidos son muy bajos y en el caso de D16S283 aparece como no ligado. Sin embargo el marcador más cercano ubicado distalmente al locus de la enfermedad presenta un alto valor de lod score a una frecuencia de recombinación igual a cero. Lo mismo sucede con el marcador distal D16S521.

Familia 16009

Figura 2.9. Estructura familiar y segregación alélica en la familia 16009.

La estructura familiar se muestra en la figura. Los cuadrados denotan hombres, los círculos mujeres. Los símbolos rayados representan individuos afectados. Símbolos cruzados representan individuos fallecidos. La flecha indica un evento de recombinación. Los haplotipos se indican debajo de cada individuo. El haplotipo ligado a la enfermedad se halla resaltado. Los alelos de D16S521 se indican en rojo, los de D16S291 en verde, los de D16S663 en azul y los de D16S283 en fucsia.



En esta familia, el individuo afectado II2 comparte el haplotipo 7-6-5-5 con su hijo afectado y no con su hermano sano lo que indica que este haplotipo es el que acompaña a la enfermedad en esta familia. Todos los miembros de la generación III son menores de edad.

Tabla 2.9. Análisis de ligamiento por medio del programa linkage 5.1 para la familia 16009

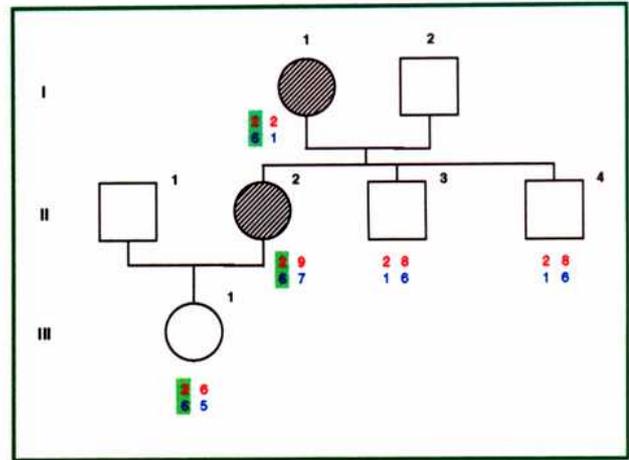
Valores de lod score (Z) a distintos valores de $\theta$								
Marcador	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	Z <sub>máx</sub>	$\theta_{máx}$
D16S521	0,30	0,21	0,13	0,06	0,02	0	0,30	0,0
D16S291	0,30	0,21	0,13	0,06	0,02	0	0,30	0,0
D16S663	0,56	0,44	0,31	0,20	0,08	0	0,56	0,0
D16S283	1,10	0,97	0,80	0,58	0,31	0	1,10	0,0

Todos los valores de lod score obtenidos son positivos y máximos a frecuencia de recombinación igual a cero, lo que indica que son informativos y se hallan ligados a la enfermedad en esta familia. Los valores bajos obtenidos para D16S521 y D16S291 se debe a que ambos se presentan en homocigosis en el individuo afectado II2 y por lo tanto la asociación de un alelo en particular a la enfermedad se torna dificultosa y ambigua.

Familia 16010

Figura 2.10. Estructura familiar y segregación alélica en la familia 16010.

La estructura familiar se muestra en la figura. Los cuadrados denotan hombres, los círculos mujeres. Los símbolos rayados representan individuos afectados. Los haplotipos se indican debajo de cada individuo. El haplotipo ligado a la enfermedad se halla resaltado. Los alelos de D16S521 se indican en rojo, los de D16S663 en azul.



En esta pequeña familia la fase que comparten los miembros afectados I1 y II1 es la **2-6**, que no está presente en los individuos sanos II2 y II3.

Tabla 2.10. Análisis de ligamiento por medio del programa linkage 5.1 para la familia 16010

Valores de lod score (Z) a distintos valores de $\theta$								
Marcador	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	Z <sub>máx</sub>	$\theta$ <sub>máx</sub>
D16S521	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10
D16S663	0,60	0,46	0,31	0,17	0,05	0,00	0,60	0,00

Debido al pequeño número de individuos analizados, a la homocigosis que presenta el marcador en I1 y al diagnóstico incierto de III1 por ser menor de edad, los valores de lod score para D16S521 son muy bajos (ceranos a cero). Para D16S663 los valores son positivos y se maximizan a frecuencia de recombinación igual a cero.

Familia 16011

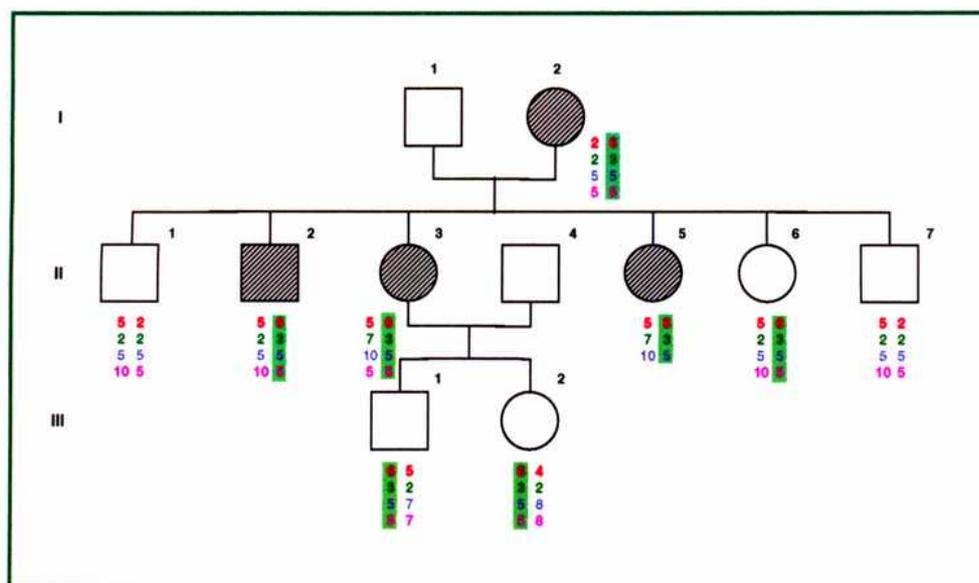


Figura 2.11. Estructura familiar y segregación alélica en la familia 16011.

La estructura familiar se muestra en la figura. Los cuadrados denotan hombres, los círculos mujeres. Los símbolos rayados representan individuos afectados. Los haplotipos se indican debajo de cada individuo. El haplotipo ligado a la enfermedad se halla resaltado. Los alelos de D16S521 se indican en rojo, los de D16S291 en verde, los de D16S663 en azul y los de D16S283 en fucsia.

En este grupo familiar, la fase ligada a la enfermedad es la 6-3-5-5. Los individuos II6, III1 y III2 son portadores de la fase presente en todos los miembros afectados, pero su diagnóstico clínico es incierto ya que los individuos de la generación III son menores de edad, y por lo tanto se hallan en edad de riesgo, y los individuos II6 y II7 se prestaron para el estudio sin diagnóstico clínico, solamente para definir las fases en la familia.

Tabla 2.11. Análisis de ligamiento por medio del programa linkage 5.1 para la familia 16011

Valores de lod score (Z) a distintos valores de $\theta$								
Marcador	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	Z <sub>máx</sub>	$\theta_{máx}$
D16S521	0,12	0,280	0,270	0,170	0,050	0	0,3000	0,135
D16S291	-0,24	0,009	0,073	0,046	-0,011	0	0,0736	0,210
D16S663	-0,55	-0,410	-0,280	-0,180	-0,080	0	0,0000	0,500
D16S283	$-4 \times 10^{-6}$	$-2 \times 10^{-6}$	$-1 \times 10^{-6}$	0	0	0	$-4 \times 10^{-6}$	0,010

Los valores de lod score para el marcador D16S283 a frecuencias de recombinación 0,3, 0,4 y 0,5 fueron consignados como iguales a cero pero son valores negativos muy pequeños cercanos a cero. En general se observan valores de lod score muy bajos o negativos en esta

familia debido a que algunos de ellos se presentan en homocigosis en individuos afectados y a que varios individuos presentan diagnóstico clínico incierto lo que influye directamente en los cálculos realizados con el programa.

### Análisis de una Familia sin Ligamiento al locus 16p13-23.

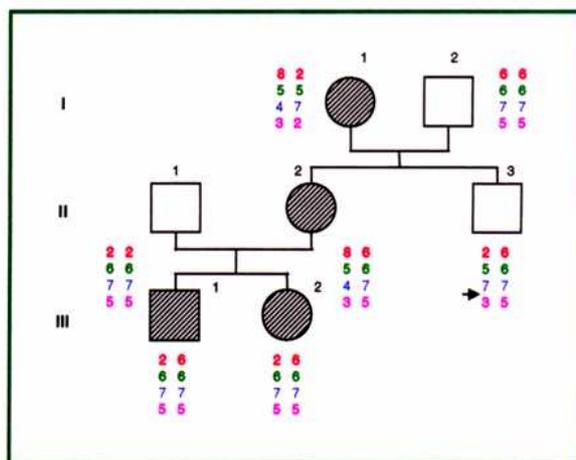
#### Familia 16012

a)

Figura 2.12. Estructura familiar y segregación alélica de marcadores ligados al locus 16p13.3 en la familia 16012.

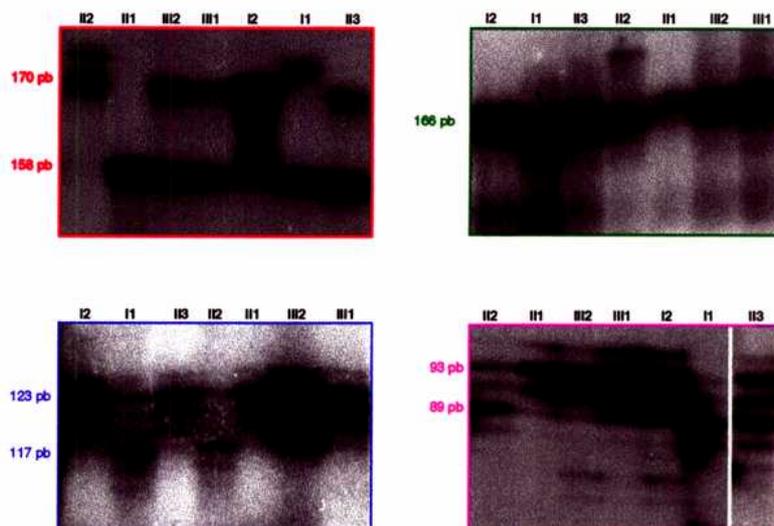
La estructura familiar se muestra en la figura. Los cuadrados denotan hombres, los círculos mujeres. Los símbolos rayados representan individuos afectados. La flecha indica un evento de recombinación.

a) Los haplotipos se indican debajo de cada individuo. El haplotipo ligado a la enfermedad se halla resaltado. Los alelos de D16S521 se indican en rojo, los de D16S291 en verde, los de D16S663 en azul y los de D16S283 en fucsia.



b)

b) Autorradiografía de los geles de poliacrilamida donde se muestran los alelos para cada individuo analizado. Los tamaños fueron determinados previamente en un gel de secuenciación por comparación con la secuencia del fago M13. En rojo se indica el marcador D16S521, en verde D16S291, en azul D16S663 y en fucsia D16S283. En todos se indica el tamaño de los alelos en pares de bases.



En un principio se presentó este pequeño grupo familiar para el análisis de ligamiento. Sin embargo, con los marcadores ligados al locus 16p13.3 analizados aquí no se puede determinar una fase asociada a la enfermedad ya que el haplotipo 8-5-4-3 compartido por los individuos afectados I1 y II2 no está presente en los hijos afectados III1 y III2, los cuales han heredado el haplotipo 6-6-7-5 que proviene del individuo I2 que es sano.

Tabla 2.12. Análisis de ligamiento por medio del programa linkage 5.1 para la familia 16012

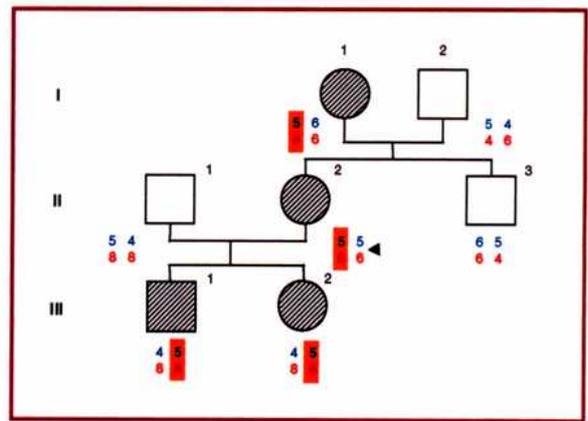
Valores de lod score (Z) a distintos valores de $\theta$								
Marcador	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	Z <sub>máx</sub>	$\theta_{máx}$
D16S521	$-\infty$	-1,18	-0,66	-0,38	-0,17	0	0	0,5
D16S291	$-\infty$	-1,39	-0,79	-0,44	-0,19	0	0	0,5
D16S663	$-\infty$	-1,18	-0,66	-0,38	-0,17	0	0	0,5
D16S283	$-\infty$	-1,84	-0,99	-0,52	-0,21	0	0	0,5

Todos los valores de lod score para todos los marcadores analizados muestran valores negativos y máximos a frecuencias de recombinación iguales a 0,5 lo que indica no ligamiento de todos ellos a la enfermedad y por lo tanto al locus 16p13.3.

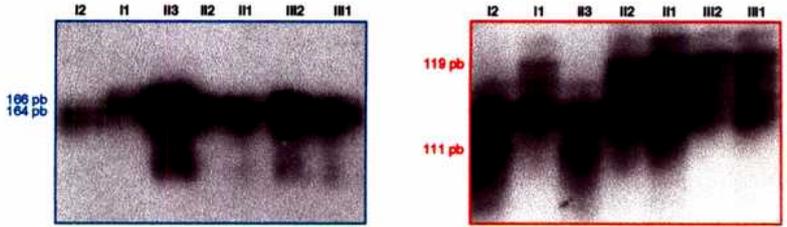
Es por ello que se analizó el ligamiento a marcadores ligados al locus 4q21-23 para así analizar la posibilidad de que se trate de una poliquistosis de tipo 2.

**Análisis de Ligamiento al locus 4q21-23 en la Familia 16012.**

Figura 2.13. Estructura familiar y segregación alélica de marcadores ligados al locus 4q21-23 en la familia 16012. La estructura familiar se muestra en la figura. Los cuadrados denotan hombres, los círculos mujeres. Los símbolos rayados representan individuos afectados. La flecha indica un evento de recombinación. a) Los haplotipos se indican debajo de cada individuo. El haplotipo ligado a la enfermedad se halla resaltado. Los alelos de D4S231 se indican en azul, los de D4S423 en marrón.



b) Autorradiografía de los geles de poliacrilamida donde se muestran los alelos para cada individuo analizado. Los tamaños fueron determinados previamente en un gel de secuenciación por comparación con la secuencia del fago M13. En azul se indica el marcador D4S231 y en marrón el D4S423 junto con el tamaño de los alelos en cada caso.



Se observa aquí que existe una fase determinada por dos marcadores ligada a la enfermedad. El haplotipo 5-8 se halla presente en todos los individuos afectados y no en los sanos, es decir en II3. Al determinarse la posibilidad de que se trate de una poliquistosis de tipo 2, se decidió extender el estudio a otros miembros de esta familia. Se pudo acordar la colaboración de un gran número de familiares. El objetivo fue no sólo determinar ligamiento sino también -en caso de comprobarse este hecho- acotar la región de localización del locus del gen responsable de este tipo de poliquistosis. El análisis de los cuatro marcadores caracterizados se muestra en la figura a continuación.

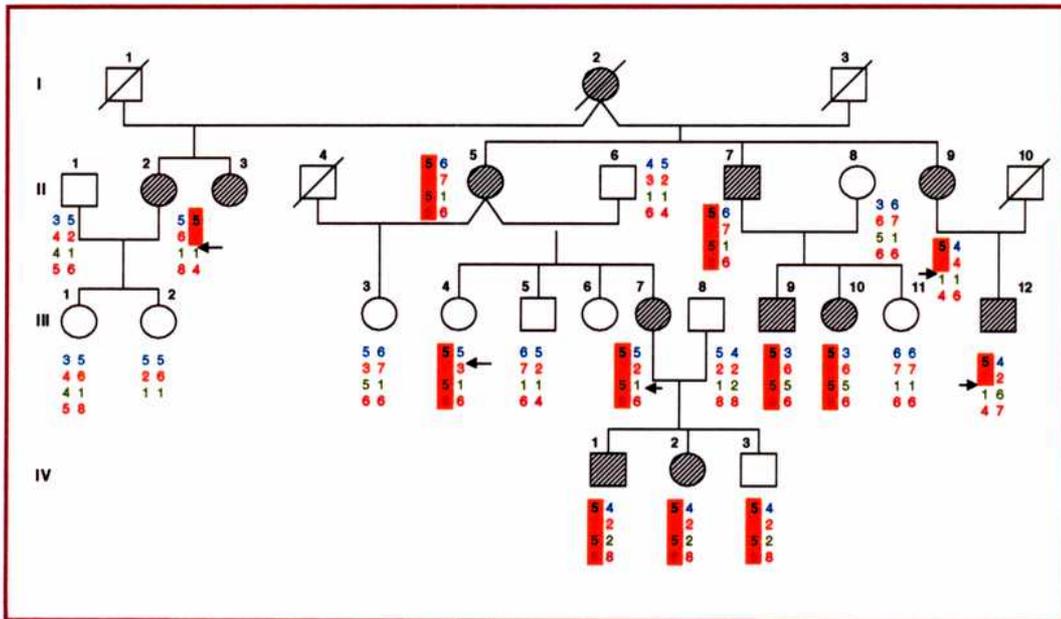


Figura2.14. Estructura familiar y segregación alélica de marcadores ligados al locus 4q21-23 en la familia 16012.

La estructura familiar se muestra en la figura. Los cuadrados denotan hombres, los círculos mujeres. Los símbolos rayados representan individuos afectados. Símbolos cruzados representan individuos fallecidos. La flecha indica un evento de recombinación. Los haplotipos se indican debajo de cada individuo. El haplotipo ligado a la enfermedad se halla resaltado. Los alelos de D4S231 se indican en azul, los de D4S1534 en naranja, los de D4S1563 en verde y los de D4S423 en marrón.

Tabla 2.13. Análisis de ligamiento por medio del programa linkage 5.1 para la familia 16012

Marcador	Valores de lod score (Z) a distintos valores de $\theta$						$Z_{max}$	$\theta_{max}$
	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5		
D4S231	3,65	3,0	2,28	1,50	0,70	0	3,650	0,000
D4S1534	3,10	2,46	1,81	1,16	0,55	0	3,100	0,000
D4S1563	-1,16	0,45	0,68	0,55	0,28	0	0,683	0,198
D4S423	0,90	2,27	2,01	1,47	0,77	0	2,270	0,097

Todos los individuos afectados en esta familia comparten el haplotipo 5-7-5-8, por lo tanto existen altas probabilidades de que se trate de una poliquistosis de tipo 2. Los individuos III4 y IV3 no han sido diagnosticados clínicamente y son portadores de la fase asociada a la enfermedad. Puede observarse que los valores de lod score para estos marcadores son positivos (Tabla 2.13) y en algunos casos adquieren valores mayores a tres a frecuencia de recombinación igual a cero, lo que indica claro ligamiento de la enfermedad al locus 4q21-23. En el caso del marcador D4S1563, debido a que se presenta en homocigosis en varios individuos afectados y a que se presentan eventos de recombinación entre el mismo y la enfermedad, el valor máximo de lod score se adquiere a frecuencia de recombinación cerca de 0,2.

En este análisis se presentaron dos casos interesantes. Tanto en II2 como en II9 (también transmitido a su hijo III12) se evidencian eventos de recombinación entre los marcadores cercanos D4S1534 y D4S1563 (separados por aproximadamente 3 cM) permaneciendo la enfermedad asociada al marcador D4S1534. Nuestro interés fue analizar la región comprendida entre los marcadores cercanos mencionados anteriormente.

Este trabajo prosiguió en España en el Laboratorio del Dr. San Millán con el análisis de marcadores D4S2929, D4S1542 y JSTG3 ubicados en la región delimitada por los marcadores D4S231 y D4S423, en la búsqueda de eventos de recombinación que acotaran la región de localización del gen. Hasta ese momento se había mapeado, también por análisis de eventos de recombinación al locus entre los marcadores D4S1542 y D4S1544 separados entre sí por una distancia de 2 cM. El marcador JSTG3 se localiza distal del D4S1542. Los datos poblacionales fueron tomados del Genethon data base. El uso de estos marcadores permitió acotar la región de ubicación del gen en una distancia de 1 cM entre los marcadores D4S1534 y D4S1563 ya que el evento de recombinación ubica al locus proximal al último marcador.

**Determinación de Heterogeneidad Genética en nuestra Población.**

Con todos los datos de las familias analizadas se puso a prueba la presencia de heterogeneidad en nuestra población; esto significa que existe más de un gen responsable de la enfermedad. Para ello se utilizó el programa HOMOG incluido en la versión LINKAGE 5.1. Pueden observarse en la Tabla 2.1 los valores obtenidos para el análisis de ligamiento multipoint entre ADPKD y los cuatro marcadores flanqueantes a PKD1 en las 12 familias analizadas.

**Tabla 2.1.** Resultados del análisis de ligamiento a tres puntos realizado en 12 familias afectadas. Los valores de lod score para ligamiento entre PKD y los marcadores flanqueantes fueron calculados utilizando el programa LINKMAP considerando un orden fijo para los marcadores ([D16S283-D16S663-D16S291]-0,035-D16S521) y 10 intervalos para los cálculos. Se muestran las probabilidades condicionales de ligamiento a PKD1 para cada familia analizada.

familia	fracción de recombinación											probabilidad condicional de ligamiento
	0,0000	0,0035	0,0070	0,0105	0,0104	0,0175	0,0210	0,0245	0,0280	0,0315	0,0350	
16001	1,19	1,16	1,14	1,11	1,08	1,05	1,02	0,99	0,96	0,92	0,88	0,991
16002	1,79	1,75	1,72	1,69	1,65	1,62	1,58	1,54	1,49	1,45	1,40	0,997
16003	1,78	1,78	1,78	1,78	1,78	1,78	1,78	1,78	1,78	1,78	1,78	0,998
16004	1,20	1,20	1,19	1,19	1,19	1,18	1,18	1,18	1,18	1,17	1,17	0,992
16005	1,04	0,99	0,94	0,88	0,81	0,73	0,63	0,51	0,33	0,03	-1,81	0,981
16006	1,43	1,38	1,33	1,27	1,20	1,12	1,02	0,90	0,72	0,43	-0,99	0,995
16007	0,02	0,08	0,14	0,19	0,24	0,28	0,32	0,36	0,40	0,43	0,46	0,931
16008	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13	0,992
16009	1,57	1,56	1,55	1,54	1,53	1,53	1,52	1,51	1,51	1,50	1,50	0,996
16010	0,60	0,59	0,59	0,58	0,58	0,58	0,57	0,57	0,56	0,56	0,55	0,971
16011	0,30	0,30	0,30	0,30	0,31	0,31	0,31	0,30	0,30	0,30	0,30	0,948
16012	-∞	-6,98	-6,48	-6,24	-6,13	-6,09	-6,13	-6,24	-6,48	-6,98	-∞	0,000

Puede verse en la tabla que para todas las familias excepto para una, los valores obtenidos son positivos y máximos en todos los casos a frecuencia de recombinación igual a cero, lo que indica que en esas familias, la asociación de la enfermedad se da a los marcadores de la región cromosómica 16p13.3. De las doce, once presentan probabilidad condicional mayor de 0,9 de portar la forma PKD1. La familia remanente fue analizada con marcadores ligados a la forma PKD2 y presenta ligamiento positivo. Para analizar si esta diferencia responde a la existencia de más de un locus causante de la enfermedad en nuestra población, se realizó el análisis de heterogeneidad. Los valores de lod score obtenidos fueron utilizados para testear heterogeneidad genética en la población utilizando el programa HOMOG. El logaritmo de la probabilidad bajo hipótesis de homogeneidad en presencia de ligamiento es de 15,26 contra 24,34 bajo hipótesis de heterogeneidad en presencia de ligamiento. El cociente de probabilidad (H2 vs. H1) es de  $8,7 \times 10^3$ , lo que es significativo ( $X^2 = 18,15$ ,  $p < 0,0001$ ), y la fracción estimada de familias ligadas a PKD1,  $\alpha$ , es de 0,9. Estos datos certifican la existencia de heterogeneidad en

nuestro grupo de familias, lo que significa que existe más de un gen responsable de la poliquistosis renal autosómica dominante en nuestra población.

### Análisis Clínico de las Familias

El total de individuos analizados es de 142 individuos, de los cuales 58 individuos se encuentran afectados, 60 son parientes no afectados o en riesgo (en edad de poder desarrollar quistes) y 24 son cónyuges. No se hallaron diferencias significativas entre pacientes de distinto sexo (24 hombres vs. 34 mujeres,  $X^2 = 0,0197$ , PNS). Debido a que de las 12 familias analizadas sólo una es de tipo PKD2, no se puede dar una frecuencia estimada de esta forma en nuestra población. En la población PKD1, todos los individuos mayores de 30 años portadores del haplotipo ligado al gen (visualizado en el análisis genético) presentan quistes. De este grupo, doce individuos (30%) entraron en insuficiencia renal crónica (IRC) a una edad promedio de 46.2 años. Ningún individuo entró en IRC a una edad menor de 30 años. Doce individuos en riesgo entre 0 y 30 años (9 entre 0-10, 2 entre 10-20 y 1 entre 20-30) portan la fase asociada a la enfermedad y al momento de realizarse las ecografías abdominales no presentaban quistes.

Del grupo PKD2, todos los miembros portadores del haplotipo ligado al gen afectado presentan quistes renales, desde muy temprana edad. Ningún miembro de este grupo precisó diálisis o transplante, aún a edades avanzadas. Estos resultados se resumen en la tabla 2.2.

Tabla 2.2. Datos clínicos y genéticos de las 12 familias afectadas. Se muestra la asociación entre la presencia de quistes y la entrada en IRCT.

grupo de edad (años)	miembros con haplotipo asociado a la enfermedad				miembros con haplotipo no asociado a la enfermedad			
	IRCT	No IRCT	quistes	sin quistes	IRCT	No IRCT	quistes	sin quistes
<b>PKD1</b>								
0-10	0	10	1	9	0	6	0	6
10-20	0	3	1	2	0	7	0	7
20-30	0	12	11	1	0	4	0	4
> 30	11	20	31	0	0	22	0	22
<b>PKD2</b>								
0-10	0	2	2	0	0	0	0	0
10-20	0	1	1	0	0	2	0	2
20-30	0	3	3	0	0	1	0	1
> 30	0	8	8	0	0	4	0	4

## DISCUSIÓN

En estos últimos años, muchos grupos de investigación se volcaron a la búsqueda e identificación de genes responsables de enfermedades. En este proceso se utilizaron diferentes estrategias de aislamiento de genes humanos como la búsqueda de un gen candidato a través del análisis de mutaciones, la caracterización mediante la determinación de un producto génico alterado o bien a través de la genética reversa o el clonado posicional. En este último caso el estudio se basa en la búsqueda de una pista citológica o en el análisis de ligamiento.

El estudio de la poliquistosis renal autosómica dominante se basó desde un principio en el análisis de marcadores genéticos asociados a la enfermedad. Se buscaron regiones hipervariables polimórficas a lo largo del genoma que presentaran ligamiento genético a la enfermedad en las familias afectadas. De esta forma pudo lograrse una localización cromosómica más precisa del gen PKD1 y una descripción simultánea de un gran número de polimorfismos de restricción y marcadores microsatélite ligados a este locus (Breuning et al., 1990; Germino et al., 1992; Somlo et al., 1992).

El estudio de 12 familias afectadas nos ha permitido validar los marcadores microsatélite descriptos previamente para el estudio de ligamiento, determinar el estado de afección (sano o portador del genotipo afectado) de cada miembro familiar y corroborar la existencia de más de un locus responsable de la enfermedad.

La importancia de disponer de una metodología diagnóstica a través del análisis de ligamiento permite en primer lugar conocer la condición genética de un individuo, permitiendo analizar y controlar factores asociados a la enfermedad que en muchos casos son causa de complicaciones importantes como hipertensión arterial, infecciones urinarias, aneurismas, litiasis, etc.

En segundo lugar, el conocimiento de la condición genética de los familiares de un individuo afectado en caso de necesidad de trasplante renal resulta de gran importancia. En nuestro país, gran número de los trasplantes renales son de carácter intrafamiliar y debido a que los síntomas de la poliquistosis aparecen en edades adultas, un posible dador puede no exhibir síntomas y portar la enfermedad. Se asume que un 28% a un 32% de adultos con poliquistosis renal son asintomáticos para la enfermedad. En una estimación realizada por Bear en 1992 se indica que una ecografía detecta la presencia de quistes renales y permite un diagnóstico positivo de la enfermedad en el 68% de los portadores de la enfermedad menores de 30 años y en el 89% en el caso de los mayores. El diagnóstico permite además librar, según

criterio de cada individuo, la posibilidad de realizar una planificación familiar adecuada en cada caso en particular.

Finalmente, es importante distinguir entre la presencia de un quiste único y la enfermedad. Los quistes renales benignos son la estructura renal más encontrada en diagnóstico por imágenes (Ravine et al., 1993). Se considera que un 50% de los individuos mayores de 50 años presentan quistes renales en una autopsia (Kissane JM, 1974).

Respecto a la heterogeneidad genética de la enfermedad, la pregunta que surge es: ¿cuántas veces es causada la poliquistosis por mutaciones en el cromosoma 16 respecto al cromosoma 4? Esto puede ser calculado con programas como el HOMOG. Los valores de lod score de todas las familias analizadas son sumados asumiendo diferentes proporciones de familias ligadas. Esta proporción es denominada  $\alpha$ . El valor más alto de lod score obtenido se corresponde con el valor más probable de  $\alpha$ . Cuando todas las familias presentan ligamiento a los marcadores, alfa es igual a 1; cuando ninguna de las familias presenta ligamiento, alfa es igual a 0. En un principio alfa siempre tuvo valores cercanos o iguales a 1 ya que todas las familias presentaban ligamiento a marcadores del cromosoma 16. A partir de la descripción de familias no ligadas, alfa disminuyó su valor indicando que la amplia mayoría de familias presentaba ligamiento a PKD1 y que el grupo de no ligadas era raro. El grupo más grande de familias no ligadas fue descrito por Peters y Sandkuijl (1992) en un grupo de 328 familias europeas, hallando un valor para  $\alpha$  igual a 0,86 con 95% de confianza en el intervalo 0,79-0,89. Es interesante remarcar que en los primeros estudios realizados, las familias no ligadas eran raramente o nunca detectadas. Es muy probable por lo tanto, que se haya realizado algún tipo de "selección" en estos estudios. Inicialmente el estudio se concentró en el análisis de grandes familias que permitieran obtener valores de lod score interpretables. Si las mutaciones en PKD1 llevan a una progresión de la enfermedad más rápida, estos pacientes son más fácilmente detectados en salas de hemodiálisis y en unidades de trasplante. Debido a que PKD1 lleva a una mayor morbilidad y mortalidad dentro de una misma familia, individuos pertenecientes a la misma presentan una tendencia a una mayor colaboración en estudios genético-moleculares y ecográficos. Por lo tanto, una determinación de  $\alpha$  sin sesgos (es decir la determinación de familias con mutaciones en PKD1 o PKD2) parece ser dificultosa con las posibilidades actuales de detección (Watson ML y Torres VE., 1996).

En nuestro caso, hemos podido constatar la hipótesis de que existe más de un locus responsable de la enfermedad. En el caso del segundo tipo de poliquistosis PKD2, se precisó la localización del gen responsable. En el momento en el cual se estaba por comunicar este hallazgo, Mochizuki y colaboradores publicaban la secuencia del gen PKD2.

Este hecho junto con la publicación previa de la secuencia del gen PKD1 permitió la apertura de un nuevo capítulo en el estudio de la enfermedad: la detección de mutaciones.

Respecto al análisis clínico de la enfermedad, se sabe que su evolución clínica es altamente variable entre familias como así también entre miembros de una misma familia. Poco se sabe respecto a los factores que influyen en la progresión de la enfermedad. De todos modos, cuando se comparan miembros afectados con mutaciones en PKD1 y miembros con mutaciones en PKD2, se observa que los últimos muestran hipertensión, insuficiencia renal crónica y complicaciones letales a edades más tardías (Parfrey et al., 1990; Ravine et al, 1992). Sin embargo, estos datos surgen del análisis de un pequeño número de grandes familias que representan un bajo número de mutaciones en PKD1 y PKD2.

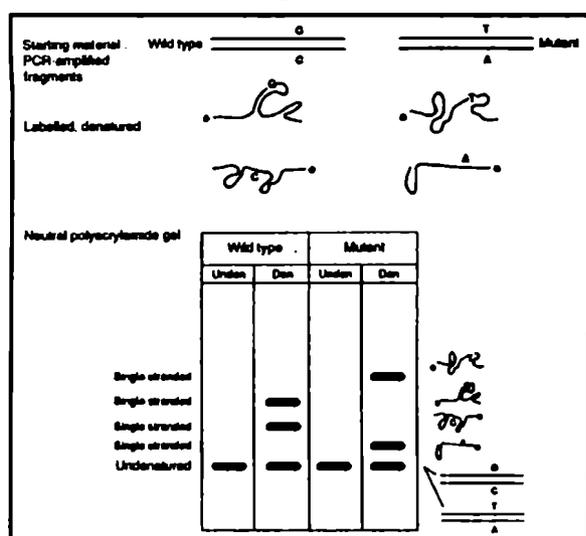
En nuestro caso hemos observado en la única familia con mutación en el gen PKD2 una forma clínica más benigna respecto a la forma PKD1. Con relación a la presencia de quistes en función de la edad, los quistes se presentaron a edades más tempranas en el caso PKD2 respecto de PKD1. De todas formas, el número de familias analizadas es muy pequeño y deben analizarse más casos para establecer conclusiones definitivas al respecto.

En cualquier caso queda claro que no deben utilizarse criterios clínicos para determinar el tipo de poliquistosis. Sólo se pueden dar respuestas realizando estudios de ligamiento en un número apropiado de individuos y en un futuro en el cual sea técnicamente posible, a través de la detección directa de mutaciones.

## CAPÍTULO 3: ESTUDIO DE MUTACIONES EN EL GEN PKD1

### INTRODUCCIÓN

A partir de la publicación de la secuencia del gen PKD1, el interés general se volcó a la búsqueda de mutaciones causantes de la enfermedad. Esta búsqueda se vio dificultada por el hecho de que tres cuartas partes del gen están repetidas en una zona cercana al mismo. Por lo tanto, la mayoría de los estudios se realizaron en los exones presentes en copia única, ubicados en el extremo 3' del gen.



La técnica elegida para la detección de mutaciones fue la amplificación por PCR de cada exón y el posterior análisis por medio de la formación de **Heterodúplex** o la técnica de **Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)** (Orita et al., 1989).

El fundamento de estas dos técnicas es la variación en la movilidad electroforética en geles de poliacrilamida

no desnaturizantes de fragmentos cortos de ADN simple cadena (o ARN), cuyas secuencias difieren en una o más bases. La estructura secundaria adoptada por las cadenas varía de acuerdo a su secuencia. El cambio en un nucleótido puede provocar una alteración en la conformación y por lo tanto modificar su movilidad en un gel. Debido a que el grado de alteración en la movilidad decrece con el aumento de tamaño de los fragmentos, estas técnicas se utilizan para el análisis de fragmentos cortos. Se estima un 90% de eficiencia para fragmentos de tamaño menor a 200 pb y entre un 70-80% para fragmentos mayores a 400 pb. Estas técnicas no permiten localizar ni caracterizar el tipo de mutación, solamente la ponen en evidencia.

La secuencia de pasos realizados en este estudio fue la siguiente: se amplificaron por PCR no radioactiva algunos de los exones en copia única del extremo 3' del gen de la poliquistosis. Esto se realizó tanto en el ADN de pacientes afectados como de individuos normales. Una vez amplificados, los productos fueron desnaturizados y sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturizantes, en diferentes condiciones. Para ello se eligieron 3 condiciones electroforéticas para cada exón en las cuales se visualizara un

buen patrón de corrida. Los geles fueron posteriormente teñidos con plata y secados en papel y se analizaron los patrones de corrida de los individuos afectados comparándolos con los individuos control. En los casos en que aparecieron alteraciones, se procedió al análisis de los fragmentos por secuenciación directa por PCR.

## OBJETIVOS

El objetivo en esta parte del trabajo es la búsqueda de mutaciones en el gen PKD1 en pacientes afectados con o sin caracterización familiar por análisis de ligamiento. Para ello se estudió la región en copia única del gen PKD1 por medio de la técnica de SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) en el ADN de individuos normales y de individuos de la población poliquística. En aquellos casos en que se evidenciaron patrones de corrida alterados, se procedió en primer lugar al análisis del grupo familiar para determinar si la alteración en el patrón de corrida estaba presente solamente en todos los miembros afectados y ausente en los miembros no afectados. Posteriormente, en los casos en los que se confirmó este resultado, se prosiguió con la secuenciación directa del exón en cuestión.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Pacientes

Se analizó un miembro afectado de cada familia estudiada en el capítulo anterior, más un grupo de individuos caracterizados clínicamente como afectados que no poseen datos de ligamiento familiar, ya sea porque se incorporaron tardíamente a este estudio, o bien por carecer de un número suficiente de miembros familiares. En todos los geles fue incluido **un solo** miembro familiar afectado e individuos sanos de la población normal tomada como control.

### Amplificación de Muestras por PCR

Para cada reacción se utilizaron entre 500 ng y 1 µg de ADN genómico purificado de acuerdo a lo descrito en el Capítulo 1, materiales y métodos, pág. 16-17

“Primers” utilizados: Se detalla a continuación la secuencia de los “primers” utilizados en el análisis de los exones del gen PKD1 (Tabla 3.2). Su ubicación en la secuencia del gen se muestra en el apéndice A1. Los detalles de los exones e intrones del gen PKD1 para una mejor y rápida visualización se ordenan y muestran en la tabla 3.1.

Tabla 3.1. Detalle de los exones e intrones del gen PKD1

Exón	Tamaño (pb)	Exones		Intrones		Exón	Tamaño (pb)	Exones		Intrones	
		Posición (nt) (inclusive)	Posición (nt) (inclusive)	Intrón no.	Tamaño (pb)			Posición (nt) (inclusive)	Posición (nt) (inclusive)	Intrón no.	Tamaño (pb)
1	426	1-426	1-72	1	- 17 kb	24	157	9003-9159	2932-2983	24	180
2	72	427-498	73-96	2	121	25	253	9160-9412	2984-3068	25	124
3	72	499-570	97-120	3	268	26	196	9413-9608	3069-3133	26	- 1.7 kb
4	170	571-740	121-177	4	213	27	171	9609-9779	3134-3190	27	86
5	672	741-1412	178-401	5	117	28	144	9780-9923	3191-3238	28	93
6	184	1413-1596	402-462	6	435	29	211	9924-10134	3239-3308	29	90
7	221	1597-1817	463-536	7	188	30	127	10135-10261	3309-3351	30	- 1.8 kb
8	116	1818-1933	537-575	8	410	31	117	10262-10378	3352-3390	31	88
9	127	1934-2060	576-617	9	363	32	50	10379-10428	3391-3406	32	224
10	248	2061-2308	618-700	10	452	33	185	10429-10613	3407-3468	33	77
11	756	2309-3064	701-952	11	877	34	94	10614-10707	3469-3499	34	- 3 kb
12	132	3065-3196	953-996	12	196	35	119	10708-10826	3500-3539	35	78
13	176	3197-3372	997-1054	13	314	36	203	10827-11029	3540-3607	36	72
14	134	3373-3506	1055-1099	14	468	37	195	11030-11224	3608-3672	37	450
15	3620	3507-7126	2000-2306	15	219	38	140	11225-11364	3673-3718	38	361
16	150	7127-7276	2307-2356	16	934	39	113	11365-11477	3719-3756	39	291
17	144	7277-7420	2357-2404	17	127	40	142	11478-11619	3757-3803	40	139
18	280	7421-7700	2405-2497	18	93	41	126	11620-11745	3804-3845	41	183
19	214	7701-7914	2498-2568	19	66	42	175	11746-11920	3846-3904	42	- 320
20	160	7915-8074	2569-2622	20	390	43	291	11921-12211	3905-4001	43	75
21	153	8075-8227	2623-2673	21	- 3.1 kb	44	135	12212-12346	4002-4046	44	83
22	145	8228-8372	2674-2721	22	- 650	45	306	12347-12652	4047-4148	45	88
23	630	8373-9002	2722-2931	23	295	46	1496	12653-14148	4149-4302		

**Tabla 3.2.** Secuencia de los primers utilizados para la amplificación de las secuencias exónicas del gen PKD1

Primer	Exón	Secuencia	Tamaño del producto (pb)
35-1	35	5' CTG GAG GCC GGG ATG AAT T 3'	211
35-2	35	5' AGG CAG CTC ACA GGG AGG G 3'	
36-1	36	5' AGC CCC TCC CTG TGA GCT G 3'	278
36-2	36	5' TAG CCT ACC CCT GGC AGC C 3'	
UP 38	38	5' AAA GCC CTG CTG TCA CTG T 3'	268
LP 38	38	5' TAG GGT CTG GGT GGA CTA AAG 3'	
39-1	39	5' CGT GTG ACT GAT GCT GTG GC 3'	167
39-2	39	5' TTT AAG TCT TGG GGC ACG C 3'	
3A3C1	parte del 43-44	5' CGC CGC TTC ACT AGC TTC GAC 3'	265
3A3C2	parte del 43-44	5' ACG CTC CAG AGG GAG TCC AC 3'	
42-1	42	5' TCC CCG CAG CTC CCG CCC TG 3'	257
42-2	42	5' GGG AGG CGC GGG GTC TGG CC 3'	
45a-1	45	5' CTC AGC TCA GCT GTA CGC CC 3'	211
45a-2	45	5' GTA CAG CTC TCC ACG CAA GG 3'	
45b-1	45	5' TTA TTC TCC GCT GGC GCT AC 3'	211
45b-2	45	5' ACA GGG GCT CAG TCA GTC CG 3'	
KK-F	parte del 46	5' GGG ACA AGG TGT GAG CCT GAG 3'	211
KK-R	parte del 46	5' CAA GGC GGC TGG GCA GTG 3'	

Condiciones de ciclado: En cada caso se determinaron las condiciones óptimas de ciclado. En la tabla 3.3 se detalla para cada exón las condiciones elegidas.

**Tabla 3.3.** Descripción de condiciones óptimas de amplificación por PCR para cada exón

Par 35-1/2	94°C-5min.	94°C-1min.	60°C-1min.	72°C-1min.	30	72°C-2min.
Par 36-1/2	94°C-5min.	94°C-1min.	60°C-1min.	72°C-1min.	30	72°C-2min.
Par 38 up/lp	94°C-5min.	94°C-1min.	60°C-1min.	72°C-1min.	30	72°C-2min.
Par 39-1/2	94°C-5min.	94°C-1min.	60°C-1min.	72°C-1min.	35	72°C-2min.
Par 42-1/2	94°C-5min.	94°C-1min.	60°C-1min.	72°C-1min.	30	72°C-2min.
Par 3A3C1-C2	94°C-5min.	94°C-1min.	65°C-1min.	72°C-1min.	30	72°C-2min.
Par 45 a-1/2	94°C-5min.	94°C-1min.	60°C-1min.	72°C-1min.	30	72°C-2min.
Par 45 b-1/2	94°C-5min.	94°C-1min.	60°C-1min.	72°C-1min.	30	72°C-2min.
Par KK-f/r	94°C-5min.	94°C-1min.	60°C-1min.	72°C-1min.	30	72°C-2min.

Los productos de amplificación fueron corridos en geles de agarosa al 2% y así cuantificados por comparación con una masa de ADN conocida sembrada como patrón.

## **Análisis por Single Strand Conformation Polimorphism**

### **A) Preparación de geles de poliacrilamida**

Se utilizó una relación de acrilamida: bisacrilamida de 29:1. Los geles se realizaron al 8% y 12%.

#### **1. Soluciones:**

- a) Stock de acrilamida: bisacrilamida 29:1
- b) TBE 10X
- c) Glicerol 50%

#### **2. Aparatos:**

- a) Tini Protean (Biorad)
- b) Fuente de poder (Biorad)

#### **3. Procedimiento:**

- ◆ Se limpian los vidrios con alcohol y se ensamblan de acuerdo a instrucciones del fabricante
- ◆ Se mezclan 2,6 ml (8%) o 4 ml (12%) de la mezcla de acrilamida: bisacrilamida con 1 ml de TBE 10X y 1 ml de glicerol 50% (en caso de realizarse la corrida en presencia de glicerol) y se lleva a volumen final de 10 ml con agua destilada
- ◆ Se agregan 80 µl de persulfato de amonio 10% y 20 µl de TEMED a la mezcla
- ◆ Se vuelcan 5 ml de la mezcla entre los vidrios, se coloca el peine correspondiente y se deja polimerizar por un tiempo no menor de 20 minutos

### **B) Preparación de las muestras para la siembra**

#### **1. Procedimiento:**

- ◆ Se mezclan entre 1,5 y 4 µl del producto de reacción de PCR (no menos de 14 ng de ADN) con 6 – 8,5 µl de buffer de siembra con formamida
- ◆ Se desnaturalizan las muestras a 80°C durante 3 minutos y se coloca inmediatamente en hielo hasta el momento de la siembra

### **C) Electroforesis**

## D) Tinción con nitrato de plata

### 1. Soluciones:

- a) Solución fijadora
  - Etanol 10%
- b) Solución oxidante
  - $\text{NO}_3\text{H}$  1%
- c) Solución de nitrato de plata
  - $\text{AgNO}_3$  1,01 g
  - Agua destilada csp 500 ml
- d) Solución reveladora
  - $\text{Na}_2\text{CO}_3$  29,6 g
  - Formaldehído 37% 540  $\mu\text{l}$
  - Agua destilada csp 1 litro
- e) Solución de stop
  - Acido acético 10%

### 2. Procedimiento:

- ◆ Se desmontan los vidrios y se sumerge el gel durante 10 minutos en la solución fijadora
- ◆ Se descarta la solución y se sumerge luego el gel en la solución oxidante durante 5 minutos
- ◆ Se descarta el oxidante y se realizan dos lavados cortos con agua destilada
- ◆ Se trata el gel 20 minutos con la solución de nitrato de plata
- ◆ Se realizan nuevamente dos lavados muy cortos con agua destilada y se agrega la solución de revelado agitando hasta visualizar las bandas de interés
- ◆ Se descarta la solución y se frena la tinción con la solución de stop
- ◆ Se enjuaga el gel con agua destilada y se secan los geles en la secadora de geles 45 minutos a 80°C

Los productos de amplificación fueron corridos en 8 condiciones diferentes que incluían: ausencia o presencia de glicerol, diferentes porcentajes de poliacrilamida y diferentes temperaturas. Se seleccionaron 3 condiciones para cada exón en las cuales se observara un patrón de bandas claro y definido para utilizar en el análisis de los pacientes. A continuación se detallan las condiciones elegidas para cada producto de amplificación.

**Tabla 3.4.** Condiciones elegidas para el análisis por SSCP para cada exón.

Condiciones	Exón 35	Exón 36	Exón 38	Exón 39	Exón 42	Exones 43- 44	Exón 45	Exón 46 (parte)
8% acril.- 0% glicerol- 4°C		◆		◆		◆		◆
8% acril.- 0% glicerol- RT	◆		◆		◆	◆	◆ (a)	
8% acril.- 5% glicerol- 4°C	◆		◆				◆ (b)	
8% acril.- 5% glicerol- RT		◆		◆			◆ (b)	◆
12% acril.- 0% glicerol- 4°C	◆	◆		◆			◆	◆
12% acril.- 0% glicerol- RT			◆		◆		◆ (a)	◆
12% acril.- 5% glicerol- 4°C					◆			
12% acril.- 5% glicerol- RT					◆			◆

## Secuenciación

### A) Reacción de secuencia

Se utilizó el kit de secuencia *fmol*<sup>™</sup> (Promega). El producto de amplificación de cada exón a ser analizado fue purificado previamente por medio del kit Wizard<sup>™</sup> PCR Preps DNA Purification System (Promega) siguiendo el protocolo provisto por el fabricante.

### B) Electroforesis

Las corridas se realizaron con TBE 1X en un sistema vertical de acuerdo a lo descrito en el Capítulo 1 en materiales y métodos, pág. 19.

### C) Autorradiografía

Se realizaron de acuerdo a lo descrito en el Capítulo 1, materiales y métodos, pág. 19-20.

## RESULTADOS

En la siguiente tabla se indican los miembros familiares analizados en los distintos geles SSCP.

Tabla 3.5. Detalle de correspondencia de los individuos analizados a su respectiva familia

1	no analizada por ligamiento
2	16011 I2
3	no analizada por ligamiento
4	16003 II7
5	16008 II2
6	16005 II2
7	16001 III1
8	16004 III3
9	16009 II2
10	16007 I1
11	16006 I5
12	16002 III8
13	16010 II2
14	Pkd3?
15	no analizada por ligamiento
16	no analizada por ligamiento
17	no analizada por ligamiento
18	no analizada por ligamiento
19	no analizada por ligamiento
20	no analizada por ligamiento
21	no analizada por ligamiento
22	no analizada por ligamiento

### Análisis de los Exones

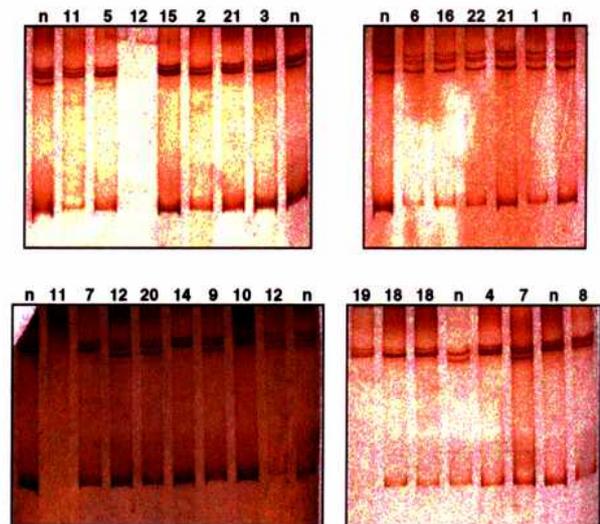
Para los exones 35, 36, 38, 39, 42, 45 y parte del 46 no se han encontrado diferencias en el patrón de migración de los productos de amplificación entre los individuos normales y los afectados en ninguna de las condiciones seleccionadas.

### Análisis del Exón 45

Debido al gran tamaño de este exón, el análisis del mismo se realizó dividiéndolo en dos partes. A la primera se la denominó **a** y a la segunda **b**. En el caso del segmento **a**, se encontraron dos patrones diferentes en la población afectada. A continuación se muestran los geles obtenidos en el análisis del segmento **a**.

**Figura 3.1. Análisis del exon 45 a.**

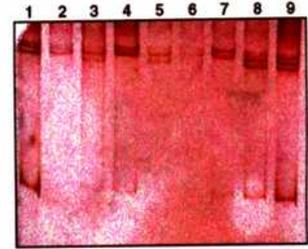
La figura muestra el patrón obtenido para el fragmento de amplificación correspondiente al segmento a del exón 45. Las condiciones seleccionadas para realizar la corrida fueron: 12%acrilamida, 0% glicerol a temperatura ambiente. Los individuos denotados con una **n** son individuos sanos de la población normal tomada como control. Los números de cada individuo tienen su correspondencia en la tabla 3.5.



Aquí se observan dos patrones de corrida diferentes en la población de individuos afectados analizados. Los individuos 12, 7, 9, 20, y dos de los individuos del grupo control (**n**) presentan un patrón diferente al resto de los individuos. Para descartar que no se trate de una mutación se analizó un grupo de individuos sanos tomados como control. Los resultados son los siguientes:

Figura 3.2. Análisis del exón 45 a.

La figura muestra el patrón obtenido para el fragmento de amplificación correspondiente al segmento a del exón 45. Las condiciones seleccionadas para realizar la corrida fueron: 12%acrilamida, 0% glicerol a temperatura ambiente. Los individuos 1, 8 y 9 son los controles normales de la figura anterior.



Los individuos sanos control 3 y 5 presentan el mismo patrón que el grupo antes mencionado. Cuatro de los 20 individuos afectados y 5 de los 10 individuos normales utilizados como control presentaron un patrón de bandas distinto al resto. Esto indicaría que puede tratarse de un polimorfismo no relacionado con una mutación ya que individuos no afectados pertenecientes a la población normal tomada como control son portadores del mismo.

### Análisis de los Exones 43 Y 44

En el análisis de este fragmento que contiene los exones 43 y 44 pudo visualizarse un patrón de corrida diferente a los individuos normales control en el individuo 20. Los resultados se muestran a continuación.

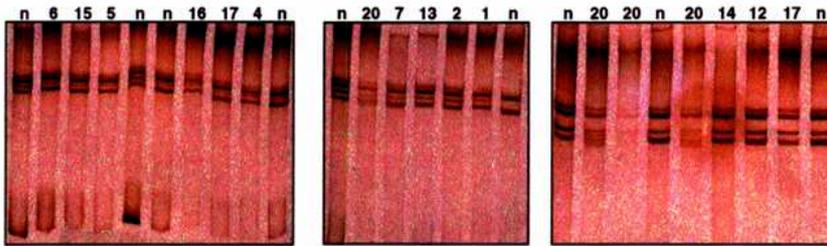


Figura 3.3. Análisis de los exones 43 y 44 en individuos afectados. La condición elegida en este caso es 8% acrilamida, 0% glicerol a temperatura ambiente. Los individuos denotados con una n son individuos sanos de la población normal tomada como control. Los números de cada individuo tienen su correspondencia en la tabla 3.5.

En este individuo se observa un patrón diferente de bandas. En todos los individuos se observan 4 bandas, 2 superiores y 2 inferiores, mientras que en el individuo 20 se observan un número de bandas adicionales entre las bandas inferiores. Se decidió por lo tanto realizar otra corrida en condiciones diferentes para analizar si se mantiene esta diferencia en el individuo 20.

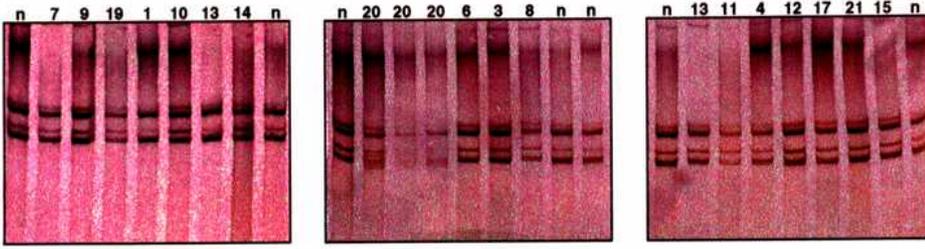


Figura 3.4. Análisis de los exones 43 y 44 en individuos afectados. La condición elegida en este caso es 8% acrilamida, 0% glicerol a 4°. Los individuos denotados con una n son individuos sanos de la población normal tomada como control. Los números de cada individuo tienen su correspondencia en la tabla 3.5.

Observamos que se mantiene la diferencia en el patrón de migración observado en la figura 3.3. Para descartar que se trate de un polimorfismo se realizaron las siguientes pruebas:

Análisis de individuos sanos tomados como control normal.

Análisis de ligamiento de la familia del paciente afectado.

Búsqueda de correlación entre patrón de corrida anómalo en SSCP y el estado de afección de cada miembro familiar

Secuenciación del fragmento amplificado en varios miembros de la familia (afectados y sanos) e individuos sanos control.

Los resultados obtenidos en el análisis poblacional en geles SSCP se muestran a continuación:

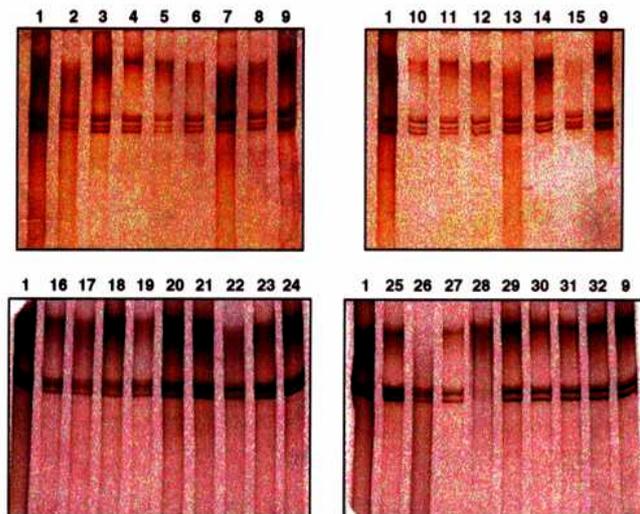


Figura 3.5. Análisis de los exones 43 y 44.

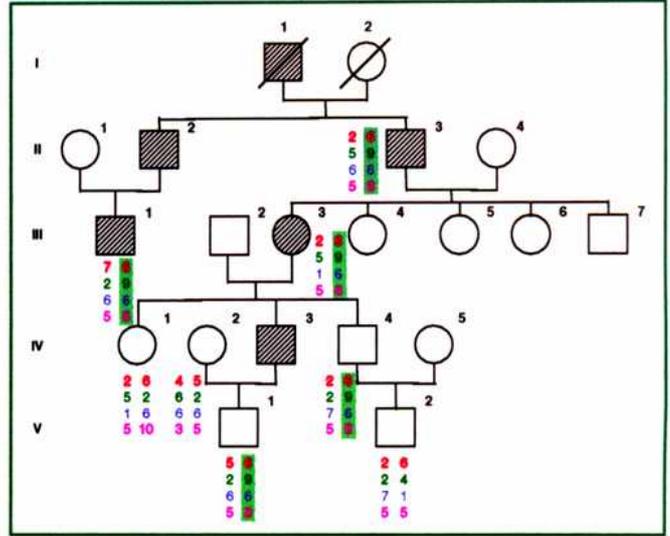
La figura muestra el patrón de bandas obtenido en individuos pertenecientes a la población normal para el fragmento de amplificación de los exones 43 y 44. La condición elegida en este caso es 8% acrilamida, 0% glicerol a temperatura ambiente.

Ninguno de los individuos normales analizados (29 en total) presenta un polimorfismo como el que presenta el individuo 20.

A continuación se muestra el análisis de ligamiento realizado en esta familia.

**Figura 3.6. Estructura familiar y segregación alélica de marcadores ligados al locus 16p13.3 en la familia.**

La estructura familiar se muestra en la figura. Los cuadrados denotan hombres, los círculos mujeres. Los símbolos rayados representan individuos afectados. Símbolos cruzados representan individuos fallecidos. Los haplotipos se indican debajo de cada individuo. El haplotipo ligado a la enfermedad se halla resaltado. Los alelos de D16S521 se indican en rojo, los de D16S291 en verde, los de D16S663 en azul y los de D16S283 en fucsia.

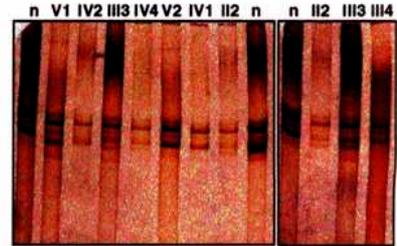


Podemos observar que esta familia es portadora de una poliquistosis tipo I y que la fase portada por todos los miembros afectados es la **6-9-6-8**. El individuo denotado como 20 es el miembro III3 en esta familia.

El análisis en geles de SSCP de esta familia mostró lo siguiente:

**Figura 3.7. Análisis de los exones 43 y 44 en la familia del individuo 20.**

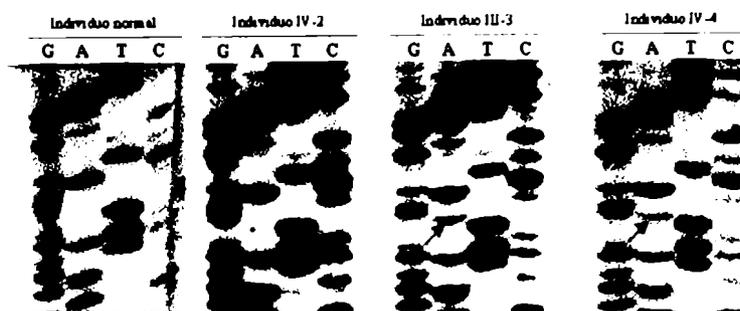
En la figura se muestra el patrón de banda obtenido para el fragmento de amplificación correspondiente a los exones 43 y 44. El análisis se realizó en varios individuos de la familia. Las condiciones de corrida elegidas fueron: 8% acrilamida, 0% glicerol a 4°C. Se denota a cada individuo de acuerdo a la figura 3.4. Los individuos n son individuos pertenecientes a la población sana utilizada como control.



Todos los miembros portadores de la fase afectada presentan en los geles de SSCP un patrón de corrida anómalo. Esto nos lleva a pensar que podría tratarse de una mutación y no de un polimorfismo. Para confirmarlo decidimos secuenciar el fragmento de amplificación hasta el momento analizado en individuos afectados y sanos de la familia e individuos normales utilizados en este estudio como control. La secuencia se muestra en la siguiente figura:

Figura 3.8. Análisis de secuencia del fragmento de amplificación correspondiente a los exones 43 y 44.

Se muestra la secuencia obtenida a partir del fragmento de amplificación de los exones mencionados. La cadena secuenciada es la cadena complementaria a la cadena codificante. La mutación se marca con una flecha.



El análisis de la secuencia muestra que en los individuos que presentan el patrón anómalo de SSCP se produce un cambio de una base C por una T. La misma no se observa en los individuos control (sanos) tomados como referencia. Esta mutación puntual genera un codón stop en el sitio donde se produce, lo cual llevaría a una interrupción prematura en la traducción generándose así una proteína truncada. Un hecho interesante para destacar es que esta modificación crea una secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción Mael (ver figura 3.7). En este grupo familiar podría por lo tanto, realizarse un "test" rápido de detección de la mutación mediante la digestión del fragmento de amplificación con la enzima Mael y visualizando los fragmentos obtenidos en un gel de agarosa. En caso de obtenerse un único fragmento, estaríamos ante la presencia de una secuencia normal. En caso de obtenerse tres fragmentos, estaríamos ante una secuencia portadora de la mutación. Los tres fragmentos corresponderían a la cadena portadora de la secuencia normal y a la cadena mutada que ha sido cortada en dos fragmentos. Esto es así debido a que la mutación aparece en uno solo de los cromosomas mientras que el otro se mantiene normal.

```

tgaccgcgcc cccacaggt gtgootgotg atgttggcgg tgcacttggc cgtggccgag
gcccgtactt ggcacagggg agggggctgg cgggtgotgc ggotaggaga ctgggggggg
tgggtgotgg tggcgotgac gggggcaccg gcaactggtac gcaatggcca gctgggtgac
gotgaccgoc agtggaccgg tttcgtggcg ggcggccggg gcagottcac tagottggac
caggtgggca agotgagctc cgcagcccggt ggcctggggg caatgatgat cttoctgatt
ttggtcaagg tgagggctgg gccggtgggc gcggggctgg gcgcacacc cagggctgca
agcagacaga tttctcgtcc gcaggatgca cagcagctac gattogtgog ccagtggtcc
gtttttggca agacattatg ccgagctctg ccagagctcc tgggggtcac ctggggcctg
gtggtgotog gggtagocta cggccagctg gcaatcctgg taggtgactg cgcggccggg
gagggcgtct tagctcagct cagctcagct gtacgcctc actggtgtcg cctccccgc
agetogtgtc ttoctgtgtg gactccctct ggagcgtggc ccaggccctg ttggtgotgt
gocctgggac tgggtctctt accctgtgtc ctgocagctc ctggcactg tcacccctgc
tgtgtgtggg gatctgggca ctggggctgt gggggccocct accgctgggg gotgttatto
    
```

Figura 3.9. Secuencia de parte del gen pkd1.

**Figura. 3.9.(continuación).** En azul se denotan los exones. En la secuencia aquí representada se incluyen los exones 43, 44 y parte del exón 45. La secuencia subrayada corresponde a los primers utilizados para amplificar el fragmento analizado luego por SSCP. En rojo se marca el nucleótido que cambia por una base T (timina) en los individuos afectados. En letra itálica y subrayada se denota la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción MaeI cuando la base C cambia por una T.

## DISCUSIÓN

A partir de la secuencia ya publicada del gen PKD1 se ha iniciado la búsqueda de mutaciones en los pacientes con el objetivo de estudiar qué tipo de mutaciones son las causantes de la enfermedad. Los primeros estudios realizados en este sentido revelaron que el origen de las mutaciones es diverso. Se han descrito deleciones, inserciones, cambios puntuales de bases, etc. Esto se observa a lo largo de la secuencia del gen, en particular en la región en copia única donde comenzaron los estudios (Peral et al.; 1995, 1996 *a*). Los resultados obtenidos mostraron que no parece posible agrupar las mutaciones en un tipo de mutación en particular como tampoco es posible agruparlas en una región en particular. Esto llevó a pensar que la caracterización del tipo de mutación en cada caso debía realizarse por un método rápido y sencillo. Las técnicas elegidas fueron entonces la amplificación de pequeños fragmentos por PCR y su posterior análisis por SSCP o heteroduplex (Peral et al., 1996*b*).

En nuestro caso hemos podido detectar una mutación presente en todos los individuos afectados de una misma familia, determinando por secuenciación que se trata de una mutación puntual. Si bien en los exones 43-44 se han descrito gran cantidad de mutaciones, esta mutación no ha sido descrita hasta el momento (Rossetti et al., 1996; Turco et al., 1995; Peral et al., 1995; European Polycystic Kidney Disease Consortium, 1994).

Mediante esta técnica también hemos podido detectar un polimorfismo en el exón 45. Para confirmar que efectivamente ese patrón distinto se debe a alguna variación en la secuencia de ADN que no tiene efectos sobre la enfermedad en estos individuos, se deberían secuenciar los fragmentos de amplificación correspondientes a ese exón en individuos que presentan los diferentes patrones.

Debido a que el exón 45 tiene gran tamaño, se lo dividió en dos partes. La primera, 45a de 257 pb y la segunda, 45b de 213 pb. El polimorfismo fue encontrado en la primera parte del exón. Ya ha sido descrita una variación en la secuencia de ADN en este exón, una mutación missense en la posición 12384 con un cambio de una base Citosina por una Timina (Rossetti et al., 1996).

La región donde se halla el polimorfismo descrito por nosotros coincide con la analizada por estos autores. Por lo tanto a priori no puede descartarse que se trate del mismo polimorfismo. Esto deberá confirmarse por secuenciación.

Gracias al análisis de SSCP, la búsqueda de cualquier variación en la secuencia de ADN es rápida y fácil de detectar, lo que permite realizar un análisis poblacional a gran escala. Esto es importante en este tipo de enfermedades genéticas en las cuales es necesaria la determinación

del estado de afección de los miembros familiares. De otra forma, este tipo de análisis requeriría de múltiples secuenciaciones, lo que significaría un gran insumo de tiempo y altos costos haciendo de esta búsqueda una tarea mucho más ardua.

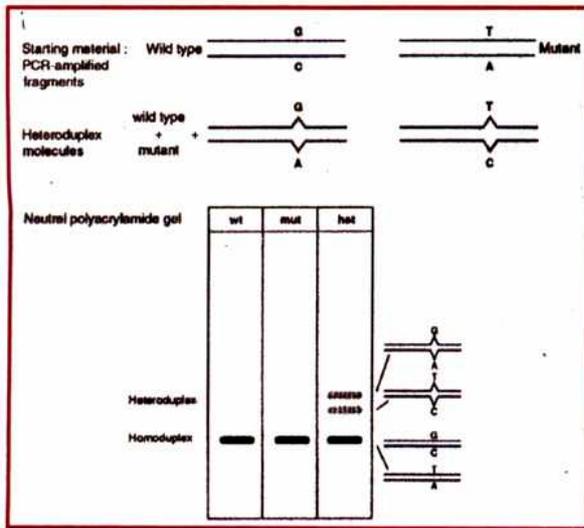
Sin embargo debe tenerse en cuenta que la técnica SSCP detecta sólo el 90% de las mutaciones y que un tipo de patrón de corrida no identifica a priori el tipo de mutación que lo origina. Por ello es necesario confirmar por medio de una secuenciación el tipo de mutación presente, lo cual solo será necesario realizar en individuos ya previamente identificados.

Recientemente se ha desarrollado una novedosa técnica por la cual es posible analizar aproximadamente 10 kb. de la secuencia duplicada del gen (Watnik et al., 1997). La estrategia se basa en una amplificación de los exones localizados en la región duplicada por medio de una *long range* PCR a partir de DNA genómico. Para ello se utilizan un primer que se ancla en la región en copia única (extremo 3' del gen) y un primer localizado en la región duplicada. Esto permite amplificar un fragmento de aproximadamente 10 kb que incluye los exones 23 al 34. Este molde resulta PKD1-específico y es utilizado para nuevas PCR (nested PCR) y poder así amplificar cada exón en forma separada para posterior análisis mutacional. Esta posibilidad no fue analizada en el marco de esta tesis. Su utilización permitió un importante avance en el estudio de mutaciones en esta enfermedad y la descripción de una gran cantidad de mutaciones en la región repetida (Peral et al., 1997; Roelfsema et al., 1997).

## CAPÍTULO 4: ESTUDIO DE MUTACIONES EN EL GEN PKD2

### INTRODUCCIÓN

El gen PKD2 es un gen en copia única de 68 kb organizado en 15 exones. Cada exón puede ser amplificado utilizando un par de primers específicos y los productos de



amplificación pueden ser analizados por diferentes técnicas. En este caso se optó por la técnica de formación de heterodúplex. Esta técnica es en esencia similar a la de SSCP, pero el análisis se realiza sobre moléculas heterodúplex de ADN doble cadena. La falta de apareamiento que se produce por el cambio de una base en un fragmento de doble cadena provoca una modificación

en su conformación respecto del fragmento sin alteraciones de bases. En una corrida electroforética en condiciones no desnaturizantes el patrón de movilidad de ambos fragmentos será distinto. Al igual que SSCP se trata de una técnica sencilla y rápida y se estima que por medio de esta técnica se detecta alrededor de un 80% de mutaciones.

### OBJETIVOS

En este capítulo se describe el estudio de mutaciones de la familia afectada con poliquistosis de tipo PKD2 (ver Capítulo 2). Previamente se describió cómo pudo definirse por análisis de ligamiento la caracterización del tipo de poliquistosis de esta familia. Se analizaron los 15 exones del gen PKD2 en algunos miembros afectados. Los exones fueron amplificados por PCR y los productos obtenidos se analizaron por formación de heterodúplex. Los exones con un patrón anómalo de formación de heterodúplex fueron analizados por secuenciación y las mutaciones halladas fueron confirmadas en todos los miembros familiares afectados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Pacientes

Se analizó el ADN de todos los miembros pertenecientes a la familia 16012 descrita en el Capítulo 2.

### Amplificación de Muestras por PCR

Para cada reacción se utilizaron entre 500 ng y 1 µg de ADN genómico purificado de acuerdo a lo descrito en Capítulo 1, materiales y métodos, pág. 16-17.

Condiciones de ciclado: Se realizó la reacción de desnaturalización/extensión/terminación en el termociclador de acuerdo al siguiente programa: 5' a 94°C, 30 ciclos de 1' a 94°C/1' a 63°C (pares F22-R21/ F21-R23/ F23-IR19b) ó a 58°C (par IF1c-IR1) ó a 55°C para los restantes pares de primers y 1' a 72°C (elongación)/ elongación final de 2' a 72°C.

Primers utilizados: Se detalla a continuación la secuencia de los primers utilizados en el análisis de los exones del gen PKD2.

**Tabla 4.1.** Secuencia de los primers utilizados en la amplificación de los 15 exones del gen PKD2

Primer	Exón	Secuencia	Tamaño del producto (pb)
F22	1	5' CGC GAT GGT GAA CTC CAG T 3'	248
R21	1	5' ACG ACG AGA GCG GAG GAG A 3'	
F21	1	5' CCT GGA GAT CGA GAT GCA GC 3'	202
R23	1	5' GCC ACT CTA CGT CCA TCT CC 3'	
F23	1	5' AGG AGG TGG AAG GGG AAG AA 3'	335
IR19b	1	5' TTC TGG TTC GTG CAT CTG CC 3'	
IF5	2	5' AAA TGA TAT CTT TTC TTT TCT TCA 3'	188
IR20	2	5' AAC TTT CCC ATT AGT GCA AG 3'	
IF6	3	5' CCA AAA TGT TTA TCC ACA GGG G 3'	268
IR5	3	5' AGG TAC TTT CAA AGT TAT TTC CA 3'	
IF7	4	5' TGG TTA TGC AAC GAT GCA 3'	355
IR7b	4	5' CCG AGT GCC AAT GAG TCA CA 3'	
IF1c	5	5' GCC TCA AGT GTT CCA CTG AT 3'	362
IR1	5	5' AGG TTT TTC TGG GTA ACC CTA G 3'	
IF2	6	5' TTT AAT TGT TCT TAT TTA CAT GCA 3'	298
IR8	6	5' TTG TAG AAT AGA ATA GGA AAT TTG G 3'	
IF8	7	5' TTG GTG AAG AAA AAT ATA CTA GTC A 3'	318
IR9	7	5' TGG AAC TCA TTT TTT TTA AAG A 3'	

IF9b	8	5' TTT TAT TAT ACA CAG TCA CAC CA 3'	282
IR10	8	5' CTA CTC TGA CTA AAT TTT TCT TCT T 3'	
IF15	9	5' TTT GGT TTT GTA TTG TGG TG 3'	194
IR21	9	5' AAG GAT TTA CGA AGT TTA AAT TG 3'	
IF18	10	5' TAA TTC CAA ATT ATG TTT CTT CC 3'	216
IR15b	10	5' TGA GTA CCA AAT CAA ATC CG 3'	
IF10	11	5' AAA CCA AGT CTT TTA TTT TTT CTC 3'	235
IR11	11	5' GGG CTA GAA ATA CTC TTA TCA CC 3'	
IF11	12	5' GAT GAA TGT TAT CTG TAT CCT CTC 3'	221
IR3	12	5' TAG GTA CCA AAT CAA ATC CG 3'	
IF3	13	5' GTC TCA GTG TTC TGC TCC TC 3'	235
IR4	13	5' AAA TTC TGC CAA TTC CTT TA 3'	
IF17	14	5' TGT ACT GTG TTT TCC TTG CA 3'	226
IR17	14	5' AAA TAC AAC TGT CAG CAA CAT A 3'	
IF12b	15	5' ACA CCA GTT TCT TTT TCC CT 3'	382
IR14	15	5' ATC GGT CAC AAA GAC TAG CA 3'	

Tabla 4.1. (continuación)

### Análisis por medio de Formación de Heterodúplex

Se realizaron los siguientes pasos:

- A) Preparación de geles de MDE (Mutation Detection Enhancement gels)
- B) Preparación de las muestras para la siembra
- C) Electroforesis
- D) Tinción con bromuro de etidio

A) Preparación de geles MDE:

Se utilizó una concentración de polímero MDE de 0,5X (FMC Inc).

B) Preparación de las muestras para la siembra

1. Soluciones:

a) Buffer de siembra:

- Ficoll-400 (Pharmacia) 15%
- 0,25% colorante BPB
- 0,25% colorante XC

2. Procedimiento:

- ◆ Se desnaturalizan las muestras a 95°C durante 5 minutos y se las deja enfriar lentamente hasta los 37°C durante al menos una hora para permitir la renaturalización y formación de heterodúplex
- ◆ Se agrega el buffer de siembra y se siembran 15 µl de muestra

C) Electroforesis

1. Soluciones:

- TBE 0,6X

2. Procedimiento:

- ◆ Se colocan los geles en la cuba de electroforesis
- ◆ Se siembran 15 µl de muestra en cada gel
- ◆ Se realiza la corrida durante 16-24 hs a 250 Volts constantes

E) Tinción con bromuro de etidio

Los geles son teñidos con bromuro de etidio y fotografiados en un transiluminador de luz ultravioleta.

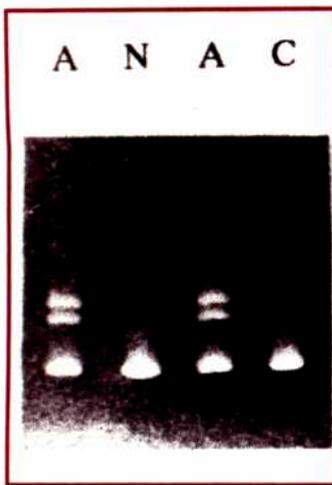
**Secuenciación**

Se realizó una secuenciación automática utilizando el secuenciador automático ABI310 (Perkin-Elmer). Las reacciones de secuencia se llevaron a cabo utilizando el método de secuenciación cíclica con el equipo "DNA Sequencing Kit. Amplitaq DNA Polymerase FS" siguiendo el programa recomendado por el fabricante. El método se basa en el uso de terminadores (dideoxinucleótidos) marcados con fluorocromos.

## RESULTADOS

En el Capítulo 2 de esta tesis se había caracterizado a una familia como PKD2 por ligamiento a marcadores microsatélite. Con el objetivo de detectar y caracterizar la mutación causante de la enfermedad, el ADN genómico de uno de los pacientes fue amplificado por PCR con los 17 pares de primers descritos y los productos de PCR se utilizaron en la técnica de Heterodúplex (descrita en materiales y métodos).

Figura 4.1. Se muestra el análisis de Heteroduplex de 2 miembros afectados (A), uno sano (N) y un individuo control (C).



Se secuenció el fragmento de PCR en 2 individuos -uno normal y el afectado- utilizando los primers para la amplificación del exón 13 (Figura 4.2). Las secuencias difirieron en el nucleótido 2436 del ADN codificante (considerando como el nucleótido 1 a la primera A del codón de metionina como el nucleótido 1, propuesto como codón de inicio).

En la posición de la secuencia donde se halla la mutación se observa un perfil de dobles picos. Esto sugiere un evento de corrimiento en el marco de lectura del gen en este paciente. El origen de este corrimiento estaría dado por la inserción de una timina en la posición mencionada. La mutación fue confirmada por secuenciación de ambas cadenas en otros dos individuos afectados. Esta mutación 2436insT genera un codón de terminación inmediato.

En la Figura 4.1 se muestra el patrón obtenido para el exón 13 para uno de los individuos afectados. Se observa claramente que difiere de un individuo sano perteneciente a la familia analizada y un individuo normal al azar, ambos tomados como control. Este mismo patrón se encontró en todos los miembros afectados de esta familia.

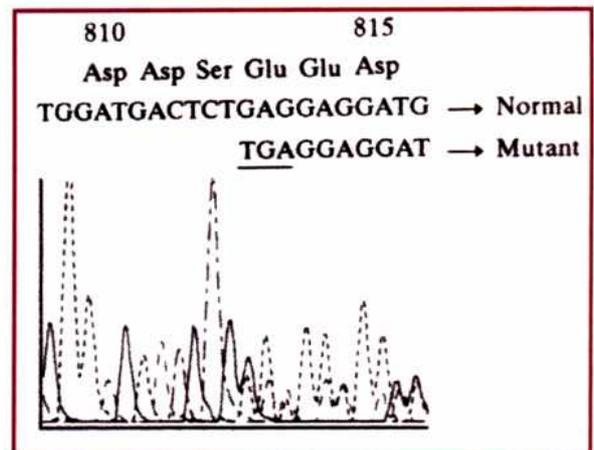


Figura 4.2. Análisis de la secuencia de ADN correspondiente al exón 13 del gen PKD2 de un individuo afectado. El codón stop creado por la mutación se encuentra subrayado.

La mutación 2436insT elimina un sitio de restricción para DdeI (c/ttag). Esto permite realizar un test rápido de confirmación de la presencia de esta mutación en el grupo familiar. El ADN genómico de varios integrantes de la familia se amplificó con los "primers" correspondientes, los productos de PCR fueron digeridos con la enzima DdeI y analizados en

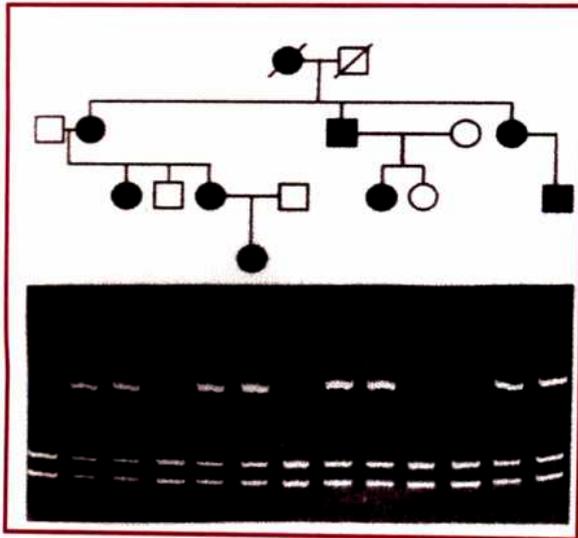


Figura 4.3. Segregación del alelo mutado con la enfermedad en la familia 16012. Sólo algunos individuos fueron incluidos en este estudio (ver figura 2.14).

un gel de agarosa. En la figura 4.3 se muestran los resultados obtenidos. Todos los individuos sanos presentan 2 fragmentos de 122 y 113 pb mientras que todos los miembros afectados presentan una banda adicional de 236 pb que corresponde a la sumatoria de las bandas de 122 y 113 pb (incluyendo la inserción). Esta banda representa al alelo portador de la mutación que pierde el sitio de restricción y confirma que la mutación 2436insT es responsable del desarrollo de la enfermedad en esta familia.

## DISCUSIÓN

Desde el momento en que se determinó la secuencia del gen PKD2, el interés generalizado se volcó al estudio de las mutaciones causantes de la enfermedad y su análisis en relación con la forma PKD1. La posibilidad de realizar una búsqueda rápida utilizando técnicas como SSCP o Heterodúplex se vio favorecida por el hecho de que el gen está compuesto de pocos exones de pequeño tamaño. Se han descrito hasta la fecha una gran variedad de mutaciones a lo largo de todo el gen (Mochizuki et al., 1996; Veldhuisen et al., 1997; Viribay et al., 1997; Xenophontos et al., 1997; Pei et al.; 1998 *a* y *b*) (ver apéndice A.2). Se presume que todas ellas producirían proteínas truncadas debido a la pérdida del extremo carboxiterminal y no producen diferencias fenotípicas en los pacientes. La naturaleza y distribución de las mutaciones y la ausencia de una clara correlación genotípica/fenotípica indicarían una inactivación neta de la molécula. Algunos autores sugieren la hipótesis de que la enfermedad puede surgir por haploinsuficiencia, aunque no se puede descartar un mecanismo de dos eventos como el propuesto para PKD1 (Wu et al., 1998).

En el caso presentado aquí se ha podido confirmar la mutación causante de la enfermedad en una familia PKD2 caracterizada previamente por ligamiento. La mutación es la inserción de una timina en la posición 2436. Esto produce la formación de un codón stop en ese sitio. La proteína resultante no portaría el extremo carboxiterminal.

Es interesante destacar que la mutación en esta familia provocó la eliminación de un sitio de restricción, evento que fue utilizado para realizar una confirmación rápida de la presencia de la mutación en miembros de esta familia. Este hecho brinda una posibilidad interesante para el diagnóstico precoz en aquellos miembros que deseen un diagnóstico en un futuro.

## **CAPÍTULO 5: FAMILIA CON POLIQUISTOSIS TIPO 3 (PKD3)**

En esta etapa final de la tesis se analiza el caso de una familia que se presentó para diagnóstico presintomático de la enfermedad con motivo de un trasplante renal en uno de sus miembros. El análisis de ligamiento realizado con marcadores ligados a los loci 16p13.3 y 4q21-23 reveló que la enfermedad no se halla ligada a ninguno de los dos cromosomas, lo que indicaría la presencia de una familia con la forma PKD3, aún no caracterizada. Esta sería la quinta familia descrita a nivel mundial con esta forma de poliquistosis.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Pacientes**

Esta familia se presentó en el Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari para consultapara transplante renal. La intención era asegurar la condición de sano del potencial dador de riñón. Se realizaron extracciones de sangre y se realizó un registro clínico de la mayor cantidad de miembros posibles.

### **Extracción de ADN Genómico**

Se realizó de acuerdo a lo descrito en el Capítulo 1 en materiales y métodos, pág. 16-17.

### **Amplificación por PCR**

La amplificación de los marcadores ligados a los cromosomas 16p13.3 y 4q21-23 fue realizada de acuerdo a lo detallado en los Capítulos 1 y 2 en materiales y métodos.

### **Cálculos Estadísticos**

El análisis de ligamiento se realizó en cada caso familiar utilizando las opciones MLINK e ILINK del programa LINKAGE versión 5.1 con las consideraciones descritas en el Capítulo 2 en materiales y métodos pág. .

RESULTADOS

Análisis Genético

En la Figura 5.1 se presenta la estructura de la familia analizada.

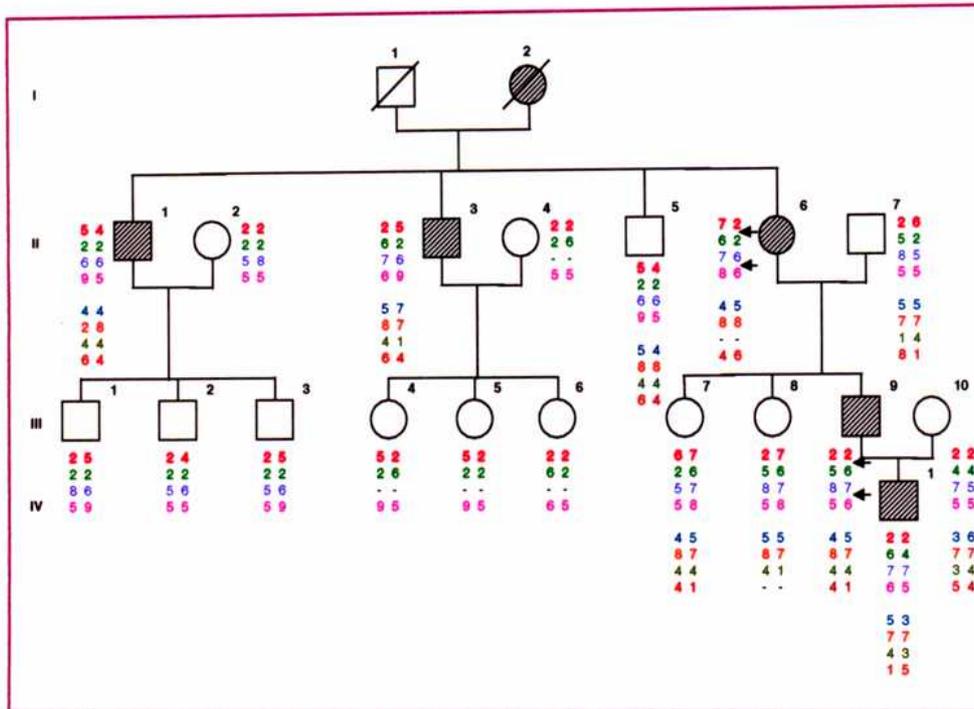


Figura 5.1. Estructura familiar y segregación alélica de marcadores ligados a los loci 16p13.3 y 4q21-23 en la familia.

La estructura familiar se muestra en la figura. Los cuadrados denotan hombres, los círculos mujeres. Los símbolos rayados representan individuos afectados. Símbolos cruzados representan individuos fallecidos. Las flechas indican eventos de recombinación. Los haplotipos se indican debajo de cada individuo. El haplotipo superior corresponde al cromosoma 16; el inferior al 4. Los alelos de D16S521 se indican en rojo, los de D16S291 en verde, los de D16S663 en azul y los de D16S283 en fucsia. Los alelos de D4S231 se indican en azul, los de D4S1534 en naranja, los de D4S1563 en verde y los de D4S423 en marrón.

De la generación III, sólo los individuos III1, III7 y III8 son mayores de 30 años y presentan ecografías negativas; por lo tanto son considerados como sanos en este estudio. Todos los demás miembros de esta generación, por ser menores de 30 años son considerados aún individuos de riesgo, aunque presenten ecografías negativas.

Los haplotipos superiores corresponden al cromosoma 16 (ligado a la forma PKD1) y los inferiores al cromosoma 4 (ligado a la forma PKD2). Puede observarse claramente para la forma PKD2 que los individuos afectados II1 y II6 comparten el mismo haplotipo 4-8-4-4 que no está presente en su hermano afectado II3 y sí lo está en el hermano sano II5. Por otro lado, el haplotipo 5-8-4-6 está presente en los individuos II3 y II6 (afectados) y en II5 (sano) y no en II1

quien también está afectado. Los valores de lod score calculados a partir del programa MLINK del LINKAGE PACKAGE versión 5.1 arrojaron valores negativos para todos los marcadores analizados en este cromosoma siendo el máximo valor de lod score  $Z_{\text{máx}}=0$  (cero) a frecuencia de recombinación  $\theta=0,5$ , lo cual indica claramente que no existe ligamiento. El análisis de marcadores ligados a PKD1 indica que los hermanos afectados II1 y II3 comparten el mismo haplotipo 5-2-6-9 con su hermano sano II5. Este mismo haplotipo no está presente en su hermana II6 quien se halla afectada. Nuevamente los valores de lod score obtenidos para los marcadores flanqueantes D16S291 y D16S663 fueron negativos siendo el máximo valor de lod score  $Z_{\text{máx}}=0$  a  $\theta=0,5$  lo cual indica nuevamente ausencia de ligamiento a estos marcadores.

Se realizó un estudio citogenético en el paciente II6. El mismo consistió en un bandeo G analizando 15 metafases. El resultado fue el de un cariotipo normal que no reveló ningún tipo de anomalía.

Todo esto indica que estamos ante una forma de poliquistosis que no presenta ligamiento a los marcadores que describen a las formas PKD1 y PKD2. Esta sería por lo tanto una forma nueva denominada PKD3 para la cual ya han sido descritas cinco familias aunque aún no se ha ubicado al locus de esta nueva forma.

## DISCUSIÓN

Hasta el momento se han descrito cinco familias sin ligamiento a marcadores de los cromosomas 16p13.3 y 4q21-23 (Daoust M et al., 1993, Almeida S et al., 1995; Bogdanova N et al., 1995; Turco AE et al., 1996; Ariza M et al., 1997). La familia aquí descrita tampoco presenta ligamiento a estos marcadores. Esto se visualiza claramente a través de la segregación de los haplotipos caracterizados para cada miembro en esta familia y a través de los valores de lod score obtenidos con el programa LINKAGE. Sin embargo, 2 individuos (II6 y III9) presentan eventos de doble recombinación que, debido a la cercanía de los marcadores utilizados, resultan ser eventos de bajísima frecuencia. Sería de gran interés estudiar un mayor número de marcadores para analizar la región comprendida en la doble recombinación. Lamentablemente, el análisis del marcador intragénico KG8 resultó ser poco informativo en esta familia, ya que todos los miembros son homocigotas para el alelo 4 (ver Tabla 1.3, Capítulo 1).

Aún no ha podido ser localizado el gen responsable de esta tercera forma de poliquistosis. Este estudio requiere del análisis de un gran número de individuos y del uso de un gran número de marcadores distribuidos a lo largo de todo el genoma, lo cual excede las posibilidades de esta tesis. Una posibilidad es desarrollar un esfuerzo conjunto en la búsqueda del gen. Otra posibilidad es encontrar indicios a nivel citogenético o brindadas por eventos de recombinación que permitan delimitar la búsqueda a determinados sitios del genoma.

Algunos autores, sin embargo, dudan de la existencia de un tercer locus causante de la enfermedad. Recientemente A. Paterson y Y. Pei postularon la posibilidad de que se realicen "falsas exclusiones" de estas familias "PKD3" a los genes ya conocidos (Paterson y Pei, 1998). Aconsejan descartar en forma exhaustiva la posibilidad de un ligamiento no detectable analizando los siguientes items: error en la genotipificación, confusión de muestras, falsas paternidades y mal diagnóstico de la enfermedad. Los primeros 3 quedarían automáticamente descartados con la aparición de inconsistencias en la segregación de los haplotipos determinados en una familia o un excesivo número de eventos de recombinación entre marcadores cercanos. Respecto al diagnóstico equivocado de la enfermedad, si bien para PKD1 han sido bien establecidos los criterios, no sucede lo mismo con PKD2 por ser una forma más benigna y presentar gran variabilidad en las características clínicas en la población afectada. La penetrancia dependiente de la edad parece ser un tema crítico, según estos autores, en los diferentes trabajos hasta el momento publicados.

Existe una última posibilidad que también llevaría a excluir a los loci caracterizados: la posibilidad de que segreguen 2 mutaciones en ambas copias del gen PKD1 o del gen PKD2 o una en PKD1 y una en PKD2, es decir una mutación digénica. Por lo tanto sugieren realizar en estas familias "PKD3" un análisis mutacional en los genes PKD1 y PKD2 y un exhaustivo análisis de ligamiento, utilizando la mayor cantidad de marcadores posibles.

Este análisis merecerá un capítulo aparte, fuera del marco de esta tesis, junto con la caracterización de las mutaciones causantes de la enfermedad.

---

## CAPÍTULO 6: POLIQUISTOSIS HEPÁTICA.

### INTRODUCCIÓN

La poliquistosis renal autosómica dominante se acompaña de quistes hepáticos en un elevado porcentaje. Sin embargo, se ha encontrado en muy pocas familias una herencia autosómica dominante de quistes hepáticos sin quistes renales. El estudio genético molecular de estas familias es así importante para contribuir a la caracterización global del proceso de la cistogénesis.

La poliquistosis hepática (PLD) forma parte de una familia de enfermedades hepáticas caracterizadas por el crecimiento masivo del epitelio biliar y tejido conectivo, microhamartomas biliares, fibroadenomatosis biliar, dilatación de las glándulas peribiliares y raramente la dilatación de los conductos intra y/o extra hepáticos. En particular los hígados poliquísticos contienen múltiples quistes que pueden variar desde el tamaño microscópico hasta ocupar toda la cavidad abdominal. Frecuentemente los quistes aparecen agrupados en regiones del hígado. La mayoría de los pacientes con poliquistosis hepática no presenta síntomas. En aquellos casos en los cuales aparece sintomatología, ésta incluye distensión abdominal (provocada por un aumento de tamaño del hígado poliquístico), obstrucción biliar o venosa, hemorragias, rupturas e infecciones. Además pueden presentarse disnea, hernias, ascitis, etc. Sin embargo, debido a que el volumen del parénquima permanece normal a pesar del crecimiento quístico, la función hepática se conserva inalterada, aún con poliquistosis hepática severa (Watson y Torres, 1996).

La descripción de la poliquistosis hepática como entidad independiente ha sido y es motivo de controversia ya que ha sido descrita en asociación y sin asociación a ADPKD en numerosos trabajos. La historia natural de la poliquistosis ha sido mejor descrita en pacientes con ADPKD; por lo tanto, todas las observaciones respecto a frecuencia, severidad, relación con la edad, etc. Pertenecen a series de pacientes que también presentan ADPKD. Aún no ha sido confirmado si las pocas familias con poliquistosis hepática autosómica dominante y sin ADPKD poseen un genotipo diferente. Los casos esporádicos de PLD podrían ser casos de herencia con diagnóstico familiar incompleto, nuevas mutaciones o bien eventos esporádicos. Un estudio retrospectivo realizado en Finlandia sugiere la posibilidad de que PLD sea una entidad separada de ADPKD (Karhunen y Tenhu, 1986).

Debido a que la caracterización de la poliquistosis hepática como una entidad separada de la poliquistosis renal autosómica dominante se halla en estudio, resultó interesante la

posibilidad de analizar esta hipótesis en el caso de una familia que presentaba quistes hepáticos pero no presenta quistes renales.

## **OBJETIVOS**

En el caso de esta familia, se decidió analizar ligamiento de la enfermedad a marcadores ligados a las formas PKD1 y PKD2 de la ADPKD y contribuir así a la caracterización de la PLD. Se estudió un núcleo familiar de 5 individuos y se los tipificó para marcadores de los loci 16p13.3 y 4q21-23 y se analizó ligamiento con ayuda del programa LINKAGE versión 5.1. Esta es la cuarta familia descrita y analizada en relación con el ligamiento a ADPKD.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Pacientes**

Esta familia se presentó en el Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari para consulta de la enfermedad. Se realizaron extracciones de sangre de la mayor cantidad de miembros posibles y se realizó un registro clínico de la mayoría de los miembros familiares.

### **Extracción de ADN Genómico**

Se realizó de acuerdo a lo descrito en el Capítulo 1 en materiales y métodos, pág 15-16.

### **Amplificación por PCR**

La amplificación de los marcadores ligados a los loci 16p13.3 y 4q21-23 fue realizada de acuerdo a lo detallado en los Capítulos 1 y 2 en materiales y métodos.

### **Cálculos Estadísticos**

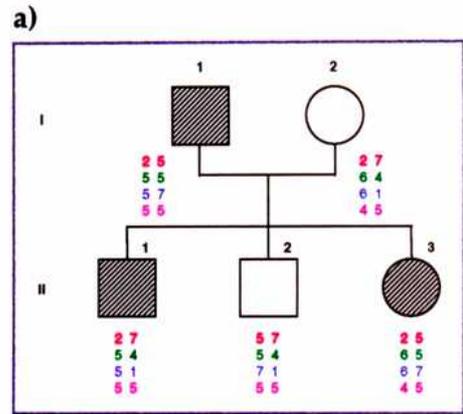
El análisis de ligamiento se realizó en cada caso familiar utilizando las opciones MLINK e ILINK del programa LINKAGE versión 5.1 con las consideraciones descritas en el Capítulo 2 en materiales y métodos pág. 31.

RESULTADOS

Se ha analizado ligamiento a marcadores de los cromosomas 16 y 4 en la familia cuyos resultados se muestran en las figuras a continuación.

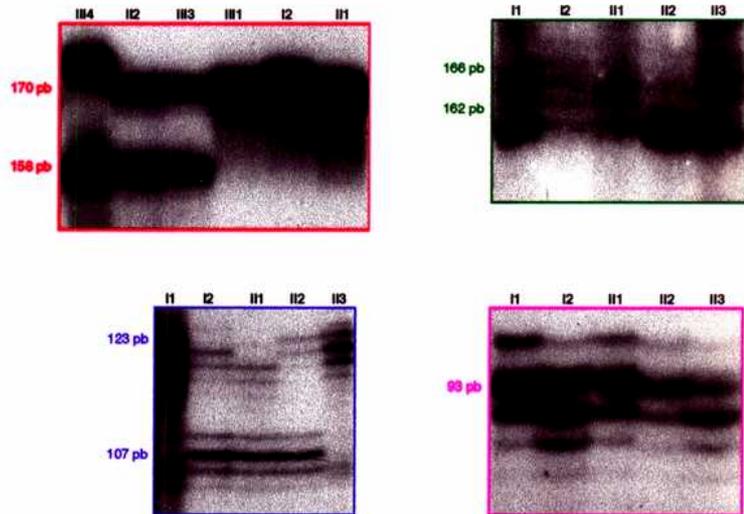
Figura 6.1. Estructura familiar y segregación alélica en la familia.

La estructura familiar se muestra en la figura. Los cuadrados denotan hombres, los círculos mujeres. Los símbolos rayados representan individuos afectados. Los haplotipos se indican debajo de cada individuo. a) Los alelos de D16S521 se indican en rojo, los de D16S291 en verde, los de D16S663 en azul y los de D16S283 en fucsia..



b)

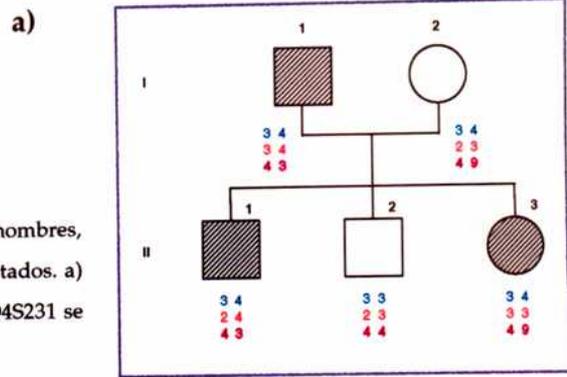
b) Autorradiografía de los geles de poliacrilamida donde se muestran los alelos para cada individuo analizado. Los tamaños fueron determinados por comparación con una muestra tomada como marcador de tamaño, cuyas bandas fueron comparadas con la secuencia del fago M13.



Puede observarse que los miembros afectados I-1 y II-1 comparten el haplotipo 2-5-5-5 y el mismo se halla ausente en el otro miembro afectado II-3. El haplotipo paterno 5-5-7-5 que es portado por este individuo se encuentra también en su hermano sano II-2. Por lo tanto, no se visualiza ninguno de los haplotipos presentes en el padre como asociado a la enfermedad.

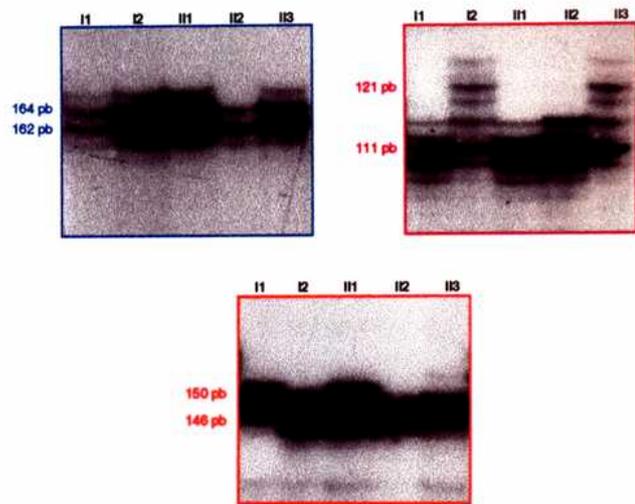
Figura 6.2. Estructura familiar y segregación alélica en la familia.

La estructura familiar se muestra en la figura. Los cuadrados denotan hombres, los círculos mujeres. Los símbolos rayados representan individuos afectados. a) Los haplotipos se indican debajo de cada individuo. a) Los alelos de D4S231 se indican en azul, los de D4S1534 en naranja y los de D4S423 en marrón.



b)

b) Autoradiografía de los geles de poliacrilamida donde se muestran los alelos para cada individuo analizado. Los tamaños fueron determinados por comparación con una muestra tomada como marcador de tamaño, cuyas bandas fueron comparadas con la secuencia del fago M13.



En el caso de los marcadores del cromosoma 4 se observa que la fase 3-3-4, compartida por los miembros afectados I-1 y II-3, se encuentra también presente en el individuo sano II-2 y está ausente en el otro hijo afectado II-1 que porta la otra fase paterna 4-4-3. En este caso tampoco es posible asociar un haplotipo con la enfermedad.

Los resultados del análisis de linkage para ambos cromosomas se muestran a continuación.

Tabla 5.1. Análisis de ligamiento por medio del programa linkage 5.1 para la familia portadora de poliquistosis hepática

Marcador	Valores de lod score (Z) a distintos valores de $\theta$						$Z_{m\acute{a}x}$	$\theta_{m\acute{a}x}$
	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5		
D16S521	-2,44	-0,44	-0,19	-0,075	-0,017	0	0	0,5
D16S291	0	0	0	0	0	0	0	0,5
D16S663	-2,44	-0,44	-0,19	-0,075	-0,017	0	0	0,5
D16S283	0	0	0	0	0	0	0	0,5
D4S231	-2,44	-0,44	-0,19	-0,075	-0,017	0	0	0,5
D4S1534	0	0	0	0	0	0	0	0,5
D4S423	-2,44	-0,44	-0,19	-0,075	-0,017	0	0	0,5

Debido a que no existen datos sobre la frecuencia y penetrancia de la enfermedad, ya que se mezcla en muchos casos con la presencia de poliquistosis renal, se realizaron los cálculos tomando dos frecuencias para la enfermedad de 0,08% y 0,001% (ceranos a los utilizados por otros grupos) y en cada caso 3 opciones de penetrancia diferentes: 0 y 0,1 para 0-20 años y 0,3 para mayores de 20 años por un lado y 0,01 para 0-20 años y 0,2 para mayores de 20 años por el otro. Los resultados obtenidos en el procesamiento matemático no variaron significativamente. Los valores de lod score obtenidos para los marcadores utilizados muestran que no existe ligamiento ya que los máximos valores de lod score se obtienen a frecuencia de recombinación igual a 0,5 y son cercanos o iguales a cero.

## DISCUSIÓN

Debido a que la poliquistosis hepática se ha visto clínicamente asociada a la poliquistosis renal autosómica dominante, a partir de la caracterización genética de la última comenzó el interés en investigar acerca de la genética de la primera. Este esfuerzo se ve dificultado por el hecho de que en la gran mayoría de los casos, los pacientes que presentan esta enfermedad no poseen sintomatología. La presencia de quistes hepáticos se ha visto muy asociada a la presencia de quistes renales y es difícil encontrar la PLD como entidad independiente. Es por eso que la posibilidad de estudiar a la familia aquí presentada resultó de gran interés. Nuestros datos concuerdan con lo descrito las 2 familias portadoras de PLD publicadas hasta la fecha, en el sentido de que no existe asociación alguna entre ambas poliquistosis. Se están realizando importantes avances en la caracterización del posible locus responsable de la enfermedad. El estudio incluye el análisis de 4 familias, entre las cuales figura la aquí descrita, utilizando 169 marcadores distanciados entre sí por unos 25 cM en promedio. La identificación del gen responsable será sin duda un gran avance en el estudio de esta enfermedad y quizás contribuye a establecer la cistogénesis en ADPKD.

## CONCLUSIONES

Se caracterizaron los diferentes marcadores microsatélites ligados a los genes PKD1 y PKD2. En cada caso se determinó el número de alelos presentes en nuestra población, el tamaño en pares de bases de cada alelo, el porcentaje de heterocigosis y el índice de contenido polimórfico.

Se estudiaron 12 familias afectadas con poliquistosis renal autosómica dominante. Esto permitió validar los marcadores microsatélite para el estudio de ligamiento y determinar el estado de afección (sano o portador del genotipo afectado) de cada miembro familiar.

Se constató la hipótesis de que existe más de un locus responsable de la enfermedad en la población argentina.

Se utilizó la técnica de SSCP en la búsqueda de mutaciones en el gen PKD1 en individuos afectados.

Se detectó una mutación puntual novedosa en el gen PKD1 presente en todos los individuos afectados de una misma familia. Por secuenciación se determinó que se trata de un cambio de una base C por una T que generaría un codón stop en el sitio donde se produce.

Mediante esta técnica también se pudo detectar un polimorfismo en el exón 45.

Se determinó la mutación causante de la enfermedad en una familia PKD2 caracterizada previamente por ligamiento. Se trata de una inserción de una timina en la posición 2436, la cual genera un codón de terminación inmediato.

Se estudió una familia que no presenta ligamiento a los loci 16p13.3 y 4q21-23 y que por lo tanto sugiere la existencia de un tercer locus responsable de la enfermedad (PKD3).

En el marco de la caracterización de la poliquistosis hepática como una entidad separada de la poliquistosis renal autosómica dominante, se analizó el caso de una familia que presenta quistes hepáticos pero no presenta quistes renales. Para ello se realizaron análisis de ligamiento a los loci responsables de la ADPKD. No se encontró asociación alguna entre ambas poliquistosis.

**Dr. R.S. Martín**

**MARIANA HERRERA PIÑERO**  
Dra. en Genética

## REFERENCIAS

- Almeida S, Almeida E, Peters D, Pinto JR, Távora I, Lavinha J, Breuning M, Prata M. Autosomal dominant polycystic kidney disease: evidence for the existence of a third locus in a portuguese family. *Hum Genet* 96:83-88,1995
- Ariza M, Alvarez V, Marin R, Aguado S, Lopez-Larrea C, Alvarez J, Menendez MJ, Coto E. A family with a milder form of adult dominant polycystic kidney disease not linked to the PKD1 (16p) or PKD2 (4q) genes. *J Med Genet* 34:587-589, 1997
- Bear JC, Mc Manamon P, Morgan J, Payne RH, Lewis H, Gault MH, Churchill DN. Age at clinical onset and at ultrasonographical detection of adult polycystic kidney disease: data for genetic counselling. *Am J Med Genet* 18:45-53, 1984
- Bear JC, Parfrey PS, Morgan JM, Martin CJ, Cramer BC. Autosomal dominant polycystic kidney disease: New information for genetic counselling. *Am J of Med Genet* 43:548-553, 1992
- Bogdanova N, Dworniczak B, Dragova D, Todorov V, Dimitrakov D, Kalinov K, Hallmayer J, Horst J, Kalaydjieva L. Genetic heterogeneity of polycystic kidney disease in Bulgaria. *Hum Genet* 95:645-650, 1995
- Breuning MH, Snijdwint FGM, Brunner H, Verwest A, Ijdo JW, Saris JJ, Dauwerse JG. Map of 16 polymorphic loci on the short arm of chromosome 16 close to the gene involved in polycystic kidney disease (PKD1). *J Med Genet* 27:603-613, 1990
- Brook-Carter PT, Peral B, Ward CJ, Thompson P, Hughes J, Maheshwar MM, Nellist M, Gamble V, Harris PC, Sampson JR. Deletion of the TSC2 and PKD1 genes associated with severe infantile polycystic kidney disease- a contiguous gene syndrome. *Nat Genet* 8:328-332, 1994
- Chapman AB et al. Intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 327:916-920, 1992
- Comité del Registro Latinoamericano de Diálisis y Transplante renal. Sociedad Latinoamericana de Nefrología e Hipertensión. Informe de diálisis 1994. *Nefrología Latinoamericana* 4:150-172, 1997
- Dalgaard OZ. Bilateral polycystic disease of the kidneys: a follow-up of two hundred and eighty four patients and their families. *Acta Med Scand* 328:1-255, 1957
- Daoust MC, Reynolds DM, Bichet DG, Somlo S. Evidence for a third genetic locus for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Genomics* 25:733-36, 1995

- Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissenbach J. A comprehensive map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 380:152-154, 1996
- European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium. Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. *Cell* 75:1305-1315, 1993
- Fick GM, et al. Characteristics of very early onset autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc of Nephrol* 3:1863-1870, 1993
- Fick GM, Duley LT, Johnson AM, Strain JD, Manco-Johnson ML, Gabow PA. The spectrum of autosomal dominant polycystic kidney disease in children. *J Am Soc of Nephrol* 4:1654-1660, 1994
- Fick GM, Johnson AM, Gabow PA. Is there evidence for anticipation in autosomal dominant polycystic kidney disease? *Kidney Int* 45:1153-1162, 1994
- Gabow PA, Johnson AM, Kaehny WE, Kimberling WJ, Lezotte DC, Duley IT, Jones RH. Factors affecting the progression of renal disease in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 47:1311-1319, 1992
- Gabow PA: Autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 329:332-42, 1993
- Gabow PA, Johnson A, Kimberling W, Velidi M, Fowler T, Strain J. Utility of ultrasonography in children in families with chromosome 16 autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD1). *J Am Soc of Nephrol* 5:646, 1994
- Germino GG, Barton NJ, Lamb J, Higgs DR, Harris PC, Xiao GH, Scherer G, Nakamura Y, Reeders ST. Identification of a locus which shows no genetic recombination with the autosomal dominant polycystic kidney disease gene on chromosome 16. *Am J Hum Genet* 46:925-933, 1990
- Germino GG, Weinstat-Saslow D, Himmelbauer H, Gillespie GAJ, Somlo S, Wirth B, Barton N, Harris KL, Frischauf Am, Reeders ST. The gene for autosomal dominant polycystic kidney disease lies in a 750 kb CpG-rich region. *Genomics* 13:144-151, 1992
- Gregory Germino. Autosomal dominant polycystic kidney disease: a two hit model. *Molecular Genetics in clinical practice III, Hospital Practice* 81-102, 1997
- Harris PC, Barton NJ, Higgs DR, Reeders ST, Wilkie AOM. A long range restriction map between the  $\alpha$ -globin complex and a marker closely linked to the polycystic kidney disease 1 (PKD1) locus. *Genomics* 7:195-206, 1990
- Harris PC, Thomas S, Ratcliff PJ, Breuning MH, Coto E, Lopez-Larrea C. Rapid genetic analysis of families with polycystic kidney disease 1 by means of a microsatellite marker. *Lancet* 338:1484-1487, 1991

- Hayashi T, Mochizuki T, Reynolds DM, Wu G, Cai Y, Somlo S. Characterization of the exon structure of the polycystic kidney disease 2 gene (PKD2). *Genomics* 44:131-36, 1997
- Hughes J, Ward CJ, Peral B, Aspinwall R, Clark K, San Millán JL, Gamble V, Harris PC. The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat Genetics* 10:151-60, 1995
- Karhunen PJ, Tenhu M. Adult polycystic liver and kidney diseases are separate entities. *Clin Genet* 30:29-37, 1986
- Kimberling WJ, Fain PR, Kenyon JB, Goldgar D, Sujansky E, Gabow PA. Linkage heterogeneity of autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 319:913-918, 1988
- Kimberling WJ, Kumar S, Gabow PA, Kenyon JB, Connolly CJ, Somlo S. Autosomal dominant polycystic kidney disease: localization of a second gene to chromosome 4q13 q23. *Genomics* 18:467-72, 1993
- Kissane JM. Congenital malformations. Pathology of the kidney: 69-119. (ed.R.H.Hepinstall) Little, Brown, Boston. 1974
- Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, Ott J. Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc Natl Acad Sci* 81:3443-3446, 1984
- Mills KA, Buetow KH, Xu Y, Weber JL, Altherr MR, Wasmuth JJ, Murray JC. Genetic and physical maps of human chromosome 4 based on dinucleotide repeats. *Genomics* 14:209-219, 1992
- Miller S, Dykes D, Polesky H. Simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 16:1215, 1987
- Milutinovic J, et al. Intrafamilial phenotypic expression of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Diseases* 19:465-472, 1992
- Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, Xenophontos SL, Veldhuisen B, Saris JJ, Reynolds DM, Cai Y, Gabow PA, Pierides A, Kimberling WJ, Breuning MH, Deltas CC, Peters DJM, Somlo S. PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 272:339-42, 1996
- Neophytou P, Constantinides R, Lazarou A, Pierides A, Constantinou-Deltas C. Detection of a novel nonsense mutation and an intragenic polymorphism in the PKD1 gene of an autosomal dominant polycystic kidney disease Cypriot family. *Hum Genet* 98: 437-442, 1996
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2766-2770, 1989

- Ott J. Analysis of Human Genetic Linkage, John Hopkins University Press, Baltimore, USA. 1991
- Parfrey PS, Bear JC, Morgan J, Cramer BC, Mc Manamon PJ, Gault MH, Churchill DN, Singh M, Hewitt R, Somlo S, Reeders ST. The diagnosis and prognosis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 323:1085-90, 1990
- Paterson A and Pei Y. Is there a third gene for autosomal dominant polycystic kidney disease? *Kidney Int* 54: 1759-1761, 1998
- Pei Y, He N, Wang K, Kasenda M, Paterson A, Chan G, Liang Y, Roscoe J, Brissenden J, Hefferton D, Parfrey P, Somlo S Hyslop P. A spectrum of mutations in the polycystic kidney disease 2 (PKD2) gene from eight Canadian kindreds. *J Am Soc Nephrol* 9:1853-1860, 1998
- Pei Y, Wang K, Kasenda M, Paterson A, Liang Y, Huang E, Lian J, Rogovea E, Somlo S Hyslop P. A novel frameshift mutation induced by an adenosine insertion in the polycystic kidney disease 2 (PKD2) gene. *Kidney Int* 53:1127-1132, 1998
- Peral B, Ward CJ, San Millan JL, Thomas S, Stallings RL, Moreno F, Harris PC. Evidence of linkage disequilibrium in the spanish polycystic kidney disease 1 population. *Am J Hum Genet* 54: 899-908, 1994
- Peral B, Gamble V, San Millán JL, Strong C, Sloane-Stanley J, Moreno F, Harris PC. Splicing mutations of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene induced by intronic deletion. *Hum Mol Genet* 5:569-574, 1995
- Peral B, Ong ACM, San Millán JL, Gamble V, Rees L, Harris PC. A stable nonsense mutation associated with a case of infantile onset polycystic kidney disease 1 (PKD1). *Hum Mol Genet* 5: 539-542, 1996a
- Peral B, San Millán JL, Ong ACM, Gamble V, Ward CJ, Strong C, Harris PC. Screening the 3' region of the polycystic kidney disease PKD1 gene reveals six novel mutations. *Am J Hum Genet* 58:86-96, 1996b
- Peral B, Gamble V, Strong C, Ong ACM, Sloane-Stanley J, Zerres K, Winearsl CG, Harris PC. Identification of mutations in the duplicated region of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene by a novel approach. *Am J Hum Genet* 60:1399-1410, 1997
- Peters DJM and Sandkuijl LA. Genetic heterogeneity of polycystic kidney disease in Europe. *Contributions Nephrol* 97:128-139, 1992
- Peters DJ, Spruit I, Saris JJ, Ravine D, Sandkuijl LA, Fossdal R, Boersman J, van Eijk R, Norby S, Constantinou Deltas CD, Pierides A, Brissenden JE, Frants RR, van Ommen GJB, Breuning MH. Chromosome 4 localization of a second gene for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Genet* 5:359-62, 1993

- Qian F, Watnick TJ, Onuchic LF, Germino GG. The molecular basis of focal cyst formation in human autosomal dominant polycystic kidney disease type I. *Cell* 87:979-87, 1996
- Qian F, Germino F, Cai Y, Zhang X, Somlo S, Germino GG. PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nat Genet* 16:179-83, 1997
- Ravine D, Walker R, Gibson R, Forrest S, Richards R, Friend K, Sheffield L, Kincaid-Smith P, Danks D. Phenotype and genotype heterogeneity in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet* 340: 1330-1333, 1992
- Ravine D, Gibson RN, Donlan J, Sheffield LJ. An ultrasound renal cyst prevalence survey: Specificity data for inherited renal cystic diseases. *Am J Kidney Diseases* 22:803-807, 1993
- Reeders ST, Breuning MH, Davies KE, Nicholls RD, Jarman AP, Higgs DR, Pearson PL, Weatherall DJ. A highly polymorphic DNA marker linked to adult polycystic kidney disease on chromosome 16. *Nature* 317:542-544, 1985
- Roelfsema J, Spruit L, Saris JJ, Chang P, Pirson Y, van Ommen G, Peters D, Breuning M. Mutation detection in the repeated part of the PKD1 gene. *Am J Hum Genet* 61:1044-1052, 1997
- Romeo G, Costa G, Catizone L, Germino GG, Weatherall DJ, Devoto M, Roncuzzi L, Zuchelli P, Keith T, Reeders ST. A second genetic locus for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet* ii:8-10, 1988
- Rossetti S, Bresin E, Restagno G, Carbonara A, Corrá S, De Prisco O, Pignatti PF, Turco AE. Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD) in an Italian family carrying a novel nonsense mutation and two missense changes in exons 44 and 45 of the PKD1 gene. *Am J Med Genet* 65:155-159, 1996
- San Millán JL, Viribay M, Peral B, Martínez I, Weissenbach J, Moreno F. Refining the localization of the PKD2 locus on chromosome 4q by linkage analysis in Spanish families with autosomal dominant polycystic kidney disease type 2. *Am J Hum Genet* 56:248-253, 1994
- Snarey A, Thomas S, Schneider M, Pound S, Barton N, Wright A, Somlo S, Germino GG, Harris P, Reeders S, Frischauf AM. Linkage disequilibrium in the region of the autosomal dominant polycystic kidney disease gene (PKD1). *Am J Hum Genet* 55:365-371, 1994
- Somlo S, Wirth B, Germino GG, Weinstat-Saslow D, Gillespie GA, Himmelbauer H, Stevens L, Coucke P, Willems P, Bachner L, Coto E, Lopez-Larrea C, Peral B, San Millán JL, Saris JJ, Breuning M, Frischauf AM, Reeders ST. Fine genetic localization of the gene for autosomal dominant polycystic kidney disease (PKD1) with respect to physically mapped markers. *Genomics* 13:152-158, 1992

- Terwilliger JD, Ott J. Handbook of Human genetic linkage. The John Hopkins University Press, Baltimore, London, 1994
- The European Polycystic Kidney Disease Consortium. The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. *Cell* 77:881-94, 1994
- The International Polycystic Kidney Disease Consortium. Polycystic kidney disease: The complete structure of the PKD1 gene and its protein. *Cell* 81:289-98, 1995
- Thompson AD, Shen Y, Holman K, Sutherland GR, Callen DF, Richards RI. Isolation and characterisation of (AC)<sub>n</sub> microsatellite genetic markers from human chromosome 16. *Genomics* 13:402-408, 1992
- Tsiokas I, Kim E, Arnould T, Sukhatme V, Walz G. Homo and heterodimeric interactions between the gene products of PKD1 and PKD2. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6965-6970, 1997
- Turco AE, Rossetti S, Bresin E, Corra S, Gammara L, Maschio G, Pignatti P. A novel nonsense mutation in the PKD1 gene (C3817T) is associated with autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) in a large three-generation Italian family. *Hum Mol Genet* 4:1331-1335, 1995
- Turco AE, Clementi M, Rosetti S, Tenconi R, Pignatti PF. An Italian family with autosomal dominant polycystic kidney disease unlinked to either PKD1 or PKD2 gene. *Am J of Kidney Diseases* 28, 5:759-761, 1996
- Veldhuisen B, Saris JJ, de Haij S, Hayashi T, Reynolds DM, Mochizuki T, Elles R, Fossdal R, Bogdanova N, van Dijk MA, Coto E, Ravine D, Norby S, Verellen-Dumoilin C, Breuning MH, Somlo S, Peters DJM. A spectrum of mutations in the second gene for autosomal dominant polycystic kidney disease (PKD2). *Am J Hum Genet* 61:547-55, 1997
- Viribay M, Hayashi T, Telleria D, Mochizuki T, Reynolds DM, Alonso R, Lens XM, Moreno F, Harris PC, Somlo S, San Millán JL. Novel stop and frameshifting mutations in the autosomal dominant polycystic kidney disease 2 (PKD2) gene. *Hum Genet* 101:229-34, 1997
- Wang G, Seidman MM, Glazer PM. Mutagenesis in mammalian cells induced by triple helix formation and transcription-coupled repair. *Science* 271: 802-805, 1996
- Watnick TJ, Pontek K, Cordal T, Weber H, Gandolph M, Qian F, Lens X, Neumann H, Germino GG. An unusual pattern of mutation in the duplicated portion of PKD1 is revealed by use of a novel strategy for mutation detection. *Hum Mol Genet* 6:1473-81, 1997
- Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 44:388-396, 1989

- Wu GQ, D'Agati V, Cai YQ, Markowitz S, Park JH, Reynolds D, Maeda Y, Le TC, Hou H, Kucherlapati R, Edelman W, Somlo S. Somatic inactivation of PKD2 results in polycystic kidney disease. *Cell* 93: 177-188, 1998
- Xenophontos S, Constantinides R, Hayashi T, Mochizuki T, Somlo S, Pierides A, Constantinou-Deltas C. A translation frameshift mutation induced by a cytosine insertion in the Polycystic Kidney Disease 2 gene (PKD2). *Hum Mol Genet* 6:949-52, 1997
- Watson ML, Torres VE. Polycystic kidney disease. Clinical Nephrology Series. Oxford Medical Publications. Oxford University Press. 1996

# APÉNDICE

## A.1.

Secuencia del gen PKD1. En rojo se indican los exones ubicados en la región duplicada (extremo 5'), en verde los exones ubicados en la región en copia única (extremo 3'). Los primers utilizados en el estudio de mutaciones (capítulo 3) se indican en color azul y subrayados y en púrpura el marcador intragénico KG8.(Genebank accession number L39891).

```
gttaaaactt ttgagacagc atctccacct gttccaccag ctggagtgca gtggtatgt aggtgacct ccaactgtgg etccctgctt gctgagcttc aggcacagca gctgtgtcca
catggtctac tgcacgctca acctccctgg tctacttggt tctgaaactt agggagagct gttccagagc gttccagagc
ttgtaataac cctccctgca ttgtctttgt ttccaaactt ttgttatctt acaggttacc gttccagagc gttccagagc
ttgttgggtt gatgtctat ttgttttttg ttccaaactt ttgttatctt acaggttacc gttccagagc gttccagagc
ttgagacaca gttctgctct ttgttcccag gctggagctg aatgtgtgta tcttggctca gttccagagc gttccagagc
ctgcaacttc caccctctgg gttccaaagm ttctctgccc teagctctcc gagtagctag atgtgggttc gttccagagc
gatccaggcc gccgcacaca ccccocgcta attttgatt tttagtagag atgtgggttc gttccagagc
tccatattgg tcaagctggt ctccaaactt gmcctcaagg tpatccgccc acctcagctc gttccagagc
ccccaaatgg tgggattaca ggcgptggat ctccaaactt gccaatgttc tatlitttgg gttccagagc
aacacacag ttcataatat attctacata gaccataact gttatgtgta gataaacaga gttccagagc
ctcttttccc atttaaacac ttgttgccta ttcttttttt ttgttttttt ttgttttttt atactgpcac gttccagagc
acttacttgg ttgcaagttt gtagtgaagt ggcgggtgat tggctccact caaactctac gttccagagc
ctctctgggt catcgacttc tectctgaca gcttcccga tagctgagac cacactctgc gttccagagc
taccacatgt cccagccaat ttgttattt tttagtagca cgggttttca ccaactctgc gttccagagc
cagatggctt caatctcttg actctgactt cccctctgct tttttttttt ttgttttttt gagtctactt gttccagagc
atccagagca tgaagcaact tgctctggct tttttttttt ttgttttttt ttgttttttt gttccagagc
ctgtcaacca ggcggggtg cagtgggata acctcaggtc ggtatccagg ggtatccagg caccacacac gttccagagc
ggttccagtg attctctgct ctacgctccc gmagtagctg ttggccaggt ttggccaggt ttggccaggt gttccagagc
catgctgagc gctctgagc atgtgccc gctgcttgg tctcccaag tpcggggagt ttggccaggt
gctctgagc gccactgtgc gctcctgctg ttctctgttt cttctctctt cttctctctt gttccagagc
cctctctctt ggttaacat tatcactggt taataaacac cctcagctct gattttatc gttccagagc
cccccttta aggttaacat tatcactggt taataaacac agactctctg ccaatttatc gttccagagc
aagaaacatt tctctcaagt ctctctctct gacacaaaca agactctctg ccaatttatc gttccagagc
ttgtctgttc taaccacatg gattttgttt ttgttttttt ttgttttttt ttgttttttt gttccagagc
tcaactttgt tgcctaggct gtagtgcact ggcactatct cagctcactg caactctcac gttccagagc
ctctctgggt caagcttat ttgttttttt ttgttttttt ttgttttttt ttgttttttt gttccagagc
ttgcacacc ccaagctaat ttgttttttt ttgttttttt ttgttttttt ttgttttttt gttccagagc
caggtggtc tgaactctc ttgttttttt ttgttttttt ttgttttttt ttgttttttt gttccagagc
gatccaggcc atgagccacc acgcccggct ccatatgttt ttctatttaa gaaactctt gttccagagc
atltccaggt naactaattg ctctctctct ccatatgttt ttctatttaa gaaactctt gttccagagc
ctaaacactt gcaattttat ctcaaacacc ctcaaacaca ttctatttaa gaaactctt gttccagagc
ttgtttgttc atttggagc agtttttttt ttgttttttt ttgttttttt ttgttttttt gttccagagc
aatcttaagt ctgtctattg actgcaataa aaactgtggt ttgttttttt ttgttttttt gttccagagc
taaccctcac ctgctgtgtg actgcaataa aaactgtggt ttgttttttt ttgttttttt gttccagagc
gctctgttgc ccaagcttga gctgagtgta acaactgtg ctgagctggt ctgagctggt ctgagctggt gttccagagc
ctactgcttc aggtctctca gctgagtgta acaactgtg ctgagctggt ctgagctggt ctgagctggt gttccagagc
tttttgatt tttagtagag atgtgggtt caaactgtg ctgagctggt ctgagctggt ctgagctggt gttccagagc
tgaactgtg atctgcccgc atgtgggtt caaactgtg ctgagctggt ctgagctggt ctgagctggt gttccagagc
cactccagcc cagttttttt ttgttttttt ttgttttttt ttgttttttt ttgttttttt gttccagagc
actcttttgc ccaagcttga gctgagtgta acaactgtg ctgagctggt ctgagctggt ctgagctggt gttccagagc
ctgggctcac agctctctc gctctctc gctctctc gctctctc gctctctc gctctctc gttccagagc
cagtgtgctt tcttggctc atgagcttca gaaactgtg ttggccaggt ttggccaggt ttggccaggt gttccagagc
ggttccagcc ccaactgtg ctctctctc atctctctc atctctctc atctctctc atctctctc gttccagagc
acagagctca aaaggggta cctctctctc atctctctc atctctctc atctctctc atctctctc gttccagagc
ctacttaat aaaggggta cctctctctc atctctctc atctctctc atctctctc atctctctc gttccagagc
ataaataag gaaactgtg ctctctctc atctctctc atctctctc atctctctc atctctctc gttccagagc
ttctcaata agctctcac atcaactctc ggttctctg ttctctctc cctctctctt cctctctctt gttccagagc
cctctgtct ctctctcag cagcaaacct gggctaggg gctctctc cagcgggtg cagcgggtg gttccagagc
gtcggaggg tgcgggtag gactgtggcc gggctaggg gctctctc cagcgggtg cagcgggtg gttccagagc
aacgcggaa gaagatcag ggttggagct ggttggagct cagcgggtg cagcgggtg cagcgggtg gttccagagc
ctggccaca ctcaagaca agggcgagct gtagtgcct gtagtgcct gtagtgcct gtagtgcct gttccagagc
agcaactga gcttgcagc gggcgagctc tgaanaatag ctgtctctc ttggccaggt ttggccaggt gttccagagc
ctgagctga ctggcgctg tctcaagcct gtcctccacc ctgtctctc ttggccaggt ttggccaggt gttccagagc
gctgggggg gacttccgg acgcccggcc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc gttccagagc
ctgactcggg tgcactccg tcaactctgc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc gttccagagc
ctgcaaccg ccccgccccc ctctctctc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc gttccagagc
agagggccc gggggggccc caactctctc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc gttccagagc
gagcgcccct ccccgagccc ctgagctgag ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc gttccagagc
ceatccagcc cgcgcggccc ctgagctgag ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc gttccagagc
cggggggccc ctgggggggg cggggggggg ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc gttccagagc
cgcggcccgg cctgagctgag cctgagctgag ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc gttccagagc
gcccgggggg cgtgagctgag cctgagctgag ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc gttccagagc
gcctctgccc cgtgagctgag cctgagctgag ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc gttccagagc
tcccgggggg cgtgagctgag cctgagctgag ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc gttccagagc
gagcgggggg cgtgagctgag cctgagctgag ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc gttccagagc
caccgggggg cgtgagctgag cctgagctgag ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc gttccagagc
ggacaacag tgcataatg gaaagaaat gggatgcgc ctggggctgc ggggtaccg tccagctgga gttccagagc
gagggctgg gatgctgta gaaagaaat gggatgcgc ctggggctgc ggggtaccg tccagctgga gttccagagc
gatttgatg gatgctgta gaaagaaat gggatgcgc ctggggctgc ggggtaccg tccagctgga gttccagagc
gaaaggggg gatgctgta gaaagaaat gggatgcgc ctggggctgc ggggtaccg tccagctgga gttccagagc
ttccggggg gatgctgta gaaagaaat gggatgcgc ctggggctgc ggggtaccg tccagctgga gttccagagc
ctcagggct ctactatg gaaagaaat gggatgcgc ctggggctgc ggggtaccg tccagctgga gttccagagc
cgtgggggg taaagcctt gcaatgttg ctctctctc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc gttccagagc
ttatggagc gctgcccga gcaagctatg ttccagctc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc gttccagagc
gaaactgac ttgagagct gcaagctatg ttccagctc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc gttccagagc
ggaaacaggt ttgagagct gcaagctatg ttccagctc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc gttccagagc
caggggttt gaaactatg gcaagctatg ttccagctc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc gttccagagc
gactaagata agragagct gcaagctatg ttccagctc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc gttccagagc
ctctgtatt ccaagctctc agctctctc cctggagct cctggagct cctggagct cctggagct gttccagagc
gatctctgg gaaactatg gcaagctatg ttccagctc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc gttccagagc
ttgttttga agtttttgg gcaagctatg ttccagctc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc gttccagagc
gtctctctg agtttttgg gcaagctatg ttccagctc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc ctgtctctc gttccagagc
caatggagc cgtgcccctc ggggacatc tgcctctgc ctctctgc ctctctgc ctctctgc gttccagagc
gtctctctg ctgtctctc cctgtctc gctgactg gctgactg gctgactg gctgactg gttccagagc
atgactcag actcaacca cctgtctc gctgactg gctgactg gctgactg gctgactg gttccagagc
gccaggggg tcaatgggga gctgctcag gctgactg gctgactg gctgactg gctgactg gttccagagc
atggttcca tgaagcagc cctctcagc ctgtctcgg gaaaggggg gaaaggggg gaaaggggg gttccagagc
ctgaggggg agcaagggct gcttctca agctctgctc agcagctg gaaaggggg gaaaggggg gaaaggggg gttccagagc
ctgctctgt gttgctctc ctgagctg cctctctc tctctctc tctctctc tctctctc gttccagagc
agttggggg ctgctctc ctgagctg cctctctc tctctctc tctctctc tctctctc gttccagagc
ctgaggggg agcaagggct gcttctca agctctgctc agcagctg gaaaggggg gaaaggggg gaaaggggg gttccagagc
cgcggctt gaaagggct gcttctca agctctgctc agcagctg gaaaggggg gaaaggggg gaaaggggg gttccagagc
agagagggg tgaagggct gcttctca agctctgctc agcagctg gaaaggggg gaaaggggg gaaaggggg gttccagagc
cagcaatlt gctgtacc ctgcaactc ctctctctc ctctctctc ctctctctc ctctctctc gttccagagc
ggagagggg gtaagctga gaaaggggg gaaaggggg gaaaggggg gaaaggggg gaaaggggg gttccagagc
cagagctca agagctgct ttgttgggt tcaaccag tcaaccag tcaaccag gttccagagc
```







## A.2.

**Secuencia del gen PKD2.** Se muestra la secuencia del mRNA del gen PKD2 (Genebank accession number U50928). En azul se indica el codón de iniciación de la traducción. En rojo se indican las deleciones hasta el momento encontradas, en fucsia las mutaciones puntuales y en verde las inserciones. La mutación encontrada en este trabajo se halla además subrayada

```
ggctcctgag ggcacacg cggagcggg cgcgcgcac cgcgcgcgc gacgccagt
accgcgatgg tgaactccag tgcgctgcag cctcagcagc cgggggacgc caagcggcgcg
ccccgcgcc gcgcgcggg cccgggcgg ctgatggctg gctgcgcgcg cgtgggcgcc
agcctcgcgc cccgggcgg cctctgcgag cagcggggcc tggagatcga gatgcagcgc
atccgcagg cgcgcgcgc ggaacccccc gccggagcgc cggcctcccc ttctcctccg
ctctcgtcgt gctcgcggca ggctgaggc cgcgataacc cgggttcga ggccgagggg
gagggggagg agtggaagg ggaagaagg ggaatggtgg tggagatgga cgtagagtg
gcgccgggca gccggaggtc ggccgcctcc tgggcctga gctccgtgg cgcgcggagc
cgggggcttg ggggtacca cgggcgggc caccgcggc ggagggcggc cggcgagag
gaccggggcc cgcctgccc cagccagtc ggccggggg acccgttcca tgcacacctc
ccccggag ggacgcgccc ccgagtgccc tgggcggga ggcctggttcg cggcctgca
ggctctcggg gaacaagact cacataacct cttttctca tagtcttggt catcttgacc
tacggcatga tgaactccaa tgtgtactac taacccgpa tgaatgaca gctcttcta
gacaccccgc tgccaaaac ggagaaaact aacttaaaa ctctgtcttc catggaagac
ttctggaagt tcacagaagg ctcttattg gatgggtgt actggaagt gcgcccagc
aaceagact aagctgaca ccgaagttc atctctatg agaacctgt gttaggggtt
ccacgaatac ggcaactcc agtcagaaat ggtctctgt ctatccccca ggactgaga
gatgaatta aagagtgcta tgaatctac tctgtcagta gtagaatag ggctccttt
gggccccgaa atggaaccg ttggtctac acaagtaaaa aagactgaa tggtagtagc
cactgggaa tcattgcaac ttatagtga gctggctatt atctggatt tccaagaaca
agagaggaaa cagctgaca agttcgtcagc ctcaagaaaaa atgtctgct ggaccggga
accagggcaa cttttattga ctctcagtg tacaagcca acattaacct gttctgtg
gtcaggttat tgggtgaat cccgcaaca ggtggttga tccctcttg gcaattcag
ccttaaagc tgaatccgata tgcacaact tttgatttct tctgtgagc cgtgagat
atctttgtt tctttatct ttaactatgt gtggaagaa taitggaat tgcattcac
aaactacct atttcaggg tttctggat tgtctggtg tgtgtcgt tgtgtcga
gtgtagtca taggaaatta catatacaga acatcaaat tggaggtgct actcagttt
ctggaagctc aaatccttt ccccaacttt gagcatctgg catattgga gatacagttc
aaataatag ctgctgtcac agtatttttt gtcggatta agctcttcaa atctcaat
ttcaacagg ccatgacca gctctgaca accatgtctc gatgtgcaa agactgttt
ggcttgcta ttatgtctt catattttc ctacgtatg ctcagtggc atacctgtc
tttggcact agtctgata ctccagctc ttccaagagt gtactctcac tcaatccgt
atcatttgg gcgatatac ctttgcagag attgaggag ctaatcgat tttgggaca
attttttca ctacattgt gttcttatg ttctcattc ttttgaatt gttttggct
atcacaag atacttact tgaagtaaaa tctgacttgg cacagcaga agctgaatg
gaactctag atcttatcag aaaggtctac cataagctt tggtaaaact aaactgaa
aaaataccy tggatgcat tccagagat ctgcggcag gaggaggca gttaacttt
gacgactc gacaagatc caaagggag ggcatactg atgcagagat tagggcaat
tccaaagt acgaccaga tggagacca gaactgacc aacatgaca tccagcagat
agagagact tggagaaag gggggggac ctggatttgg atcacgtttc ttaaccagc
ccatgagca gccgaagttt cccctgaagc ctggatgact ctgaggagga tgcagatga
gatagggag atagctccag aagggggga agcatttcta gttggcttc ttaagagag
ttcaagctc tggtagagc agtggaccgg atggagcatt ccatcggcag cgtgtgtcc
aagatgagc cctgatctgt gaagtagag attatggagc gagccaact gaagagggg
gaggtctgg gaaggtctgt ggattggggc gccggagatg aaagctggg tctgcaagt
gaaatccata ggaacagat ggaccggcta gtactgaag agtggaacg ctgggaatcc
gatgatgag ctccagat cagtcagttt taggcaccc cagtggact aaatggcca
ctcgcccca gaagctccg cccatctcc tcccaatca cagaaggcat ggaaggtca
gtgggaatg ggattctaa tgccacgta tgatatgt gtttcagtat gttgtttct
aataagtgag gaagtggctg tctgaatg ctgtacaag cacactattt atagccctg
accacatag gatctagtc tttgtgaccg atgtcaatc tctgcactt taatttattt
tataaact tacccatgg tccaaagatt ttttttctt tttctcatt aagaatcata
ggtgaataa ttgagtacg aaaaaaact ttcattgatt gtattgagcg gtacccag
ttgcaccat gactgagtc tctcagttga caatgagt gctttaaaa gctaaaaac
tgcaaaggg ctctgagtt tcattccag tcaaaaaat cagtattgtt attttttcc
aagatgtge aggaaaatgg gccattctct tccactctg ccatagttca tgacttaat
acatagcttt tttaagaaa aggagctttt ttttcaact agctctctgg ggtaaacttt
tcaaaagat aaaatgggaa ggactccaa actatgatg aatctgtgtg aatggtaag
atgaatgta aatctatgct tttttgta gttgatcgta tctgatgtct gttggactaa
ctgatcact taattttac ctattttgg tcaaccata aataagctga taaaaaccac
caaagatcag ttataggata aaatggctc tcaaccata acacaggaga atggaagga
gcctaagtt gctactcagt taattctt taattgtta gtttagctca aagatttc
tgcatattct tttcccatgg tggctcact catttgcac tgaatttaat gttatactc
atctagtgag accaacttac taatttta gtatgcactg aagtttta tccaaactt
atgttcattt taagcaaat ttaagaaag tttgaaatt cacaagcat tggtttaaa
actattaa gaatatagta ctggtcagg tatgnncac gcctgtaatc ccagacttt
gggagccga aacaggcaa tcactgagc ccagagtcc aagcacaca tggcaatgt
ggcgaactc catctcaca aaaatgcaa aataaaaaa tatagtactc aagtatctt
gatcctggt tcaaaacta gaatttgtaa tgcaaatgga gctcagtca ataaaaaga
ggtttggta tcaaaagttc atcattaga cagtatcagc caaaattga gttagcaca
ctgtttctt tacgaggg tctccccaa atttatgggg atttatgggc tctcaaaa
aaaaaactct tctttacag aaatgtgagttc tttgagcg ccaaagaaat cctgctgtt
aagctatat ttaatttca caagtgtttc attaactgg tgaaatgca tccaatctc
aagtaaac atgcaaaat agacctttcc aggttgaag tgaaactac tggttctg
taagttttc ctatggtctt catctctatc ttactttct ctgaaatg ctaccaaag
tcttttatta ctacatata aagttgtcat tccagggata ttgactgtc atttatgt
atctgacce tgtttgtae tgaaacaaa ctcaatttg aagtgcagct atttatgtgt
atccatgtgt atgaccctg tgccaatat caatatgt cactgaaag tctttatg
atctttta ttgtactgt ttaattaaa ctgcaaaat tttgcagaat tctctttc
tacctaaa tcaataa tttttcttt ttagctatg agaacncccc ccatctctc
caaccctatt ancttccca tgtgtactgg tattaaaaa aagcatta catgcaag
ttttctctg acaacaaga atgttataa tgtgtaatc tgagcaantt tactcttaa
taaaaactg atatant
```