Determinación de la frecuencia y distribución de los haplotipos del gen de la fenilalanina hidroxilasa en México y búsqueda de la mutación IVS10. (Un ejemplo del futuro de la genética molecular en psiquiatría)

Humberto Nicolini,* Beatriz Camarena,* Carlos Cruz,* Guadalupe Bilbao,** Antonio Velázquez A,** Belén Pérez,*** Lourdes Desviat,*** Magdalena Ugarte***

Summary

This paper describes the molecular analysis of the human phenylalanine hydroxylase gene in phenilketonuric Mexican patients. The different molecular strategies used herein, will be definetively applied once the psychiatric disease genes are located. This constitutes a major reason for the clinical psychiatrist to have a good understanding and knowledge of their applicability. This work also permits the clinician in mental health to foresight the future of molecular genetics in psychiatry, specially those areas concerning identification of mutation carriers and genetic counseling with precise estimation of recurrence risks, based upon DNA studies.

Resumen

En este trabajo se decribe el análisis molecular del gen de la fenilalanina hidroxilasa en pacientes mexicanos con fenilcetonuria. Se tendrá que realizar la secuencia de las metodologías moleculares empleadas una vez que los genes de las enfermedades psiquiátricas se hayan clonado. Es por esto que el manejo tanto teórico como práctico de estas metodologías resultan de gran importancia para el psiquiatra, ya que le permiten vislumbrar el futuro de la clínica genético-molecular en la psiquiatría, en especial, en lo que toca a la identificación de los familiares, portadores de mutaciones y el consecuente consejo genético, basándose en una precisa estimación de los riesgos de presentar la enfermedad, gracias al estudio del DNA.

Introducción

La fenilalanina es uno de los aminoácidos esenciales en los seres humanos. Su catabolismo está defectuoso en la fenilcetonuria (FCU), una de las enfermedades más incapacitantes en el ser humano, causada por un defecto en el gen de la fenilalanina hidroxilasa (FAH).[14]

El gen de la FAH, se ha clonado y expresado, y se ha confirmado que la producción de esta enzima es el resultado de un gen único.[7] La localización cromosómica de

* Departamento de Genética Psiquiátrica, Instituto Mexicano de Psiquiatría. Calz. México-Xochimilco 101, San Lorenzo Huipulco 14370, México D.F.
** Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM e Instituto Nacional de Pediatría SSA. Apdo. Postal 48-101. 04530, México D.F.
*** Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid.

este gen es en el cromosoma 12, en la banda q22-q24.1; consiste de 90Kb de ADN genómico, que contiene 13 exones, e intrones de 1 a 23 Kb de longitud, que se agrupan separando a los exones en el extremo5'.[3]

Se han descrito 10 sitios polimórficos para este gen, generados con los cortes de 8 enzimas de restricción (BglII, PvuII a y b, Eco RI, MspI, XmnI, HindIII, EcoRV). En Europa del norte, la heterozigosidad observada es de aproximadamente 90% considerando 8 de estos sitios. Por ejemplo, en la población danesa, tres de las enzimas (PvuII, XmnI y Eco RV) son informativas en 87% de las personas.[14,16]

Se ha visto que algunos de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (PLFR) del gen FAH, tienden significativamente a segregarse en grupos; a este proceso se le conoce como "desequilibrio de enlace" (*linkage disequilibrium*).

Se ha observado la presencia de FCU, y una fuerte asociación entre varios haplotipos de los PLFR para FAH en varios grupos étnicos.[8] Este fenómeno se ha explicado con la hipótesis de que estas mutaciones deben de haber ocurrido recientemente, de manera independiente, y dentro de un fondo de haplotipos específicos; de esta manera se explicaría el que no hayan tenido tiempo de asociarse con otros haplotipos a través de eventos de entrecruzamiento.[10]

El análisis de los haplotipos de ADN ha sido un importante prerrequisito para analizar las mutaciones en el *locus* de FAH.[16] Los estudios en diversos grupos humanos han mostrado que en cada uno de ellos, la FCU tiende a asociarse con distintos haplotipos, por lo que la determinación de su frecuencia en grupos específicos resulta de interés biológico, en tanto que contribuye a conocer mejor la genética de la población que padece de FCU. Esta información tiene además, implicaciones prácticas, ya que permite el diagnóstico prenatal y de los portadores de FCU por medio de PLFR. Este tipo de estudio diagnóstico, sólo se puede realizar en familias que tengan un hijo afectado, de tal manera que su patrón de PLFR sirva como referencia para analizar el ácido desoxirribonucléico (ADN) de los familiares o del feto en estudio.

Por otro lado, el conocimiento específico de las mutaciones más prevalentes en la población, permite examinar directamente a los afectados o probables afectados, sin necesidad de estudiar a los familiares, aunque es necesario señalar que la prevalencia de las mutaciones "frecuentes", varía del 10 al 65%,[5,13] de modo que el resto de las mutaciones las constituyen las llamadas "raras". Es por esto que actualmente la posibilidad de que surja una mutación nueva, o bien alguna mutación que por su baja frecuencia no sea incluida en el examen y, por lo tanto, no sea detectada, disminuye la utilidad diagnóstica de la prueba. Sin embargo, si se conoce de manera precisa la alteración molecular se podrán establecer diferencias importantes en cuanto al curso clínico del padecimiento.[6]

Hasta el momento no se conocen ni los haplotipos ni las mutaciones más frecuentes de la población mexicana, por lo que el estudio de este problema contribuirá a conocerlas. Además, el avance en la comprensión de las bases moleculares de la fenilcetonuria, es un ejemplo muy claro de lo que sucederá en el estudio diagnóstico clínico-molecular en la psiquiatría, una vez que se localicen los genes etiológicos de estas patologías.

Objetivos

1 Determinar los haplotipos más comunes para el gen de FCU en un grupo de mexicanos fenilcetonúricos.
2 Identificar a los fenilcetonúricos mexicanos portadores de la mutación más frecuente en España (IVS10).

Material y métodos

Pacientes

En la Unidad de Genética de la Nutrición, se estudiaron 10 pacientes con fenilcetonuria, pertenecientes a 7 familias nucleares diferentes, dos de las cuales, a su vez están emparentadas entre sí.

Los diagnósticos se hicieron con base en la medición de los niveles de fenilalanina en sangre y la excreción de ácido fenilpirúvico en la orina, considerándose como afectados aquellos que tuvieran más de 20 mg/dl en sangre y excreción positiva del ácido mencionado.

Para este propósito se tomaron muestras sanguíneas (30ml/persona) en tubos de 10 ml tipo vacutainer, que contenían anticoagulante (citrato o en su defecto heparina). Posteriormente se congelaron las muestras a -80° C en un ultracongelador tipo Revco, donde se almacenaron hasta ser procesadas para extraerles el ADN.

Extracción del ADN

Las muestras congeladas se descongelaron hasta que tuvieron la temperatura ambiente, para hacer, posteriormente, un lisado de la sangre total, por medio de la solución lítica de bell; después se centrifugaron a 2500 rpm por 10' a 4° C, se descartó el sobrenadante y se repitió la operación 2 veces más; se agregó amortiguador NE con 0.5 mg de proteinasa K, y se incubaron las muestras durante 12 hs a 37° C, al día siguiente se hicieron 3 extracciones con fenol y cloroformo y, finalmente, se precipitó el ADN, con la adición de una sal (acetato de amonio 7.5M), y el etanol frío, transfiriéndose el ADN a

un tubo con 1ml de TE-4, que se almacenó a -4°C hasta que se usara posteriormente. La concentración del ADN se midió con un fluorómetro, que es el método más exacto para hacer su determinación. Este paso es muy importante, ya que en cada gel se utilizan 10 ug de ADN, y como se requiere de numerosos geles para hibridizar con la sonda, es importante conocer la concentración exacta para obtener la máxima eficiencia.

Southern Blott: El ADN se digiere por medio de las siguientes endonucleasas de restricción: BglII, PvuII a y b, Eco RI, MspI, XmnI, HindIII, EcoRV, utilizando la específica de acuerdo con la sonda de ADN con la cual se piensa hibridizar posteriormente. Las digestiones con estas enzimas varían de una a otra condición (tiempo de digestión, temperatura, cantidad de enzima) de acuerdo con la enzima que se haya empleado. Una vez terminada la digestión, se verifica la digestión observando una pequeña muestra del ADN, teñido con un colorante fluorescente que se une específicamente al ADN (bromuro de etidio) en un gel de agarosa. Si la digestión fue exitosa, la muestra completa, junto con los marcadores de peso molecular, se corren en un gel de agarosa horizontal al 1%, en un amortiguador Howley's 1X, durante aproximadamente 18 hs. Se tiñe el gel con bromuro de etidio y, al ser transiluminado por luz ultravioleta, se toma una fotografía, en donde, además de permitirnos verificar la migración del ADN, nos permitirá estimar, con base en los marcadores de peso molecular el tamaño en kilobases de las bandas que aparecerán en la autorradiografía, posteriores a la hibridización con la sonda de ADN radioactiva. Después de la fotografía, se desnaturaliza el ADN en el gel con 5M NaCl y 5M NaOH, y luego se neutraliza con Tris 2M y 5M NaCl, lo que hace más eficiente la transferencia. Posteriormente, se pone el gel sobre papel filtro en una cubierta de vidrio, sobre un recipiente con *buffer* de transferencia 10X SSC, de tal manera que el amortiguador entre en contacto con el gel y el ADN sea transferido por capilaridad a una membrana compuesta de nylon y nitrocelulosa, colocada sobre el gel. Sobre esta membrana se pone papel filtro y toallas de papel absorbente para propiciar la subida del *buffer* por capilaridad a través del gel, llevando consigo el ADN a la membrana donde va a permanecer, y conservando el mismo patrón de electroforesis. El proceso de transferencia toma aproximadamente 24 hs; posteriormente se lava la membrana con 2X SSC, y el ADN se inmoviliza a la membrana horneándose al vacío por 1 hr a 80° C; terminado éste, se fija por medio de luz ultravioleta con un aparato de *cross linking.*

Aislamiento, marcaje radioactivo de la sonda e hibridización

La sonda para el gen de la FAH (phPAH247) fue donada por el Dr. Savio Woo (*Baylor College of Medicine*). La amplificación de la sonda se realizó de acuerdo con el protocolo reportado en Nicolini y cols.(1993).[9]

El marcaje radioactivo se realizó por el método de *random priming* (kit de B.M.), junto con el radioisótopo dNCTP-P^{32}, del que se utilizan 50 uCi, por marca, que son suficientes para hibridizar, una actividad específica de 1×10^{9} cpm.

Antes del proceso de hibridización, se prehibridiza la membrana para evitar la unión inespecífica, por medio de 20X SSC, solución de Denhardt y esperma de salmón, incubándose por 2 hrs a 60° C; posteriormente se pone la membrana dentro de una bolsa de plástico con la solución de hibridización, que contiene: la sonda radioactiva, NaCl, NaOH, esperma de salmón, HCl, 20X SSC, H_2O, 20% SDS y solución de Denhardt. Se deja incubando 24hs a 65-70° C; después se lava la membrana a concentraciones decrecientes de SSC y SDS y se incrementan las temperaturas (25,37 y 65° C). Terminados los lavados se verifica la actividad radioactiva de la membrana utilizando un contador Geiger, y se decide si es necesario hacer otra serie de lavados; si no es así, se expone la membrana entre 24 y 48hs con película fotográfica, utilizando 2 pantallas intensificadoras, dentro del congelador

CUADRO 1
Nuevos haplotipos encontrados en la población mexicana

Haplotipo	*Enzima de restricción*							
	BglII	*PvuIIa*	*PvuIIb*	*EcoRI*	*MspI*	*XmnI*	*HindIII*	*EcoRV*
A	+	–	+	–	+	–	–	+
B	–	+	–	+	+	+	+	+
C	–	+	–	+	+	+	–	–
D	–	+	–	–	–	–	+	+
E	–	+	–	+	–	–	–	+
F	+	–	–	+	–	+	–	–
G	–	+	–	+	+	–	–	+
H	–	+	–	–	–	–	–	–
I	–	+	–	+	–	–	–	–
J	–	+	–	+	–	+	–	–

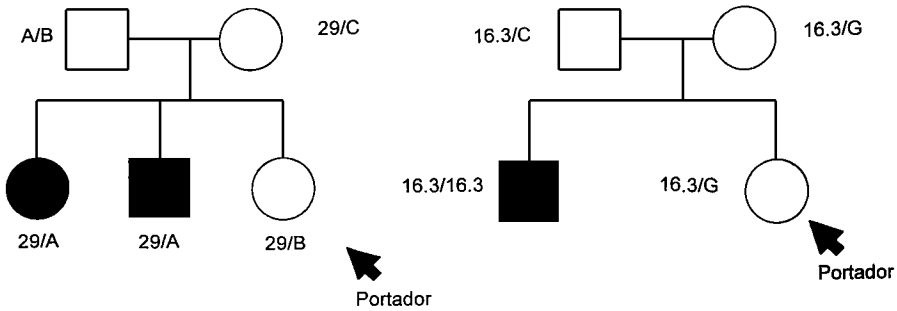

Figura 1. Análisis molecular de haplotipos. Detección de portadores

tipo Revco a -80° C. Se revela la placa fotográfica en el cuarto oscuro y se determinan los pesos moleculares de las bandas encontradas, de acuerdo con una curva estándar hecha con base en la fotografía del gel con los marcadores de peso molecular.

Identificación de la mutación IVS10 por medio del uso de oligonucleótidos específicos para alelos

El exón 11 se amplificó por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RCP). Para efectuar la RCP se emplearon como los oligonucleótidos iniciadores de la reacción, los descritos por Dasovich y cols. 1991.[2] Como fuente de DNA se empleó el DNA purificado de 10 pacientes fenilcetonúricos sin parentesco entre sí. La reacción de la RCP se realizó en 1.5x de una solución amortiguadora especial ($MgCl_2$ 20mM, Tris HCl 0.1M pH 8.6, KCl 0.5 M, beta-mercaptoetanol 0.068%, albúmina de suero bovino 1ug/ml). 10µl del volumen total de la RCP, se transfirieron a membranas de nylon (*dot blott*). Estas membranas se hibridaron contra dos oligonucleótidos marcados radioactivamente, uno que contenía la mutación y otro con el alelo normal. Posteriormente las membranas se hibridaron y lavaron a 47° C.

CUADRO 2
Frecuencia y distribución de los haplotipos entre los sujetos con FCU y sus familiares normales.

Haplotipo	*FCU**	*Familiares normales*
16.3	3/8	4/21
29	1/8	2/21
A	1/8	1/21
B	0/8	2/21
C	0/8	2/21
D	1/8	1/21
E	0/8	1/21
F	0/8	1/21
G	0/8	2/21
H	1/8	1/21
I	1/8	1/21
J	0/8	3/21
Total	*8/8*	*21/21*

* El índice expresado es número de alelos con el haplotipo/total de alelos estudiados.

Resultados

Se determinaron los haplotipos en cuatro familias nucleares no emparentadas entre sí; el total de los sujetos tipificados fue de 17, de los cuales 5 eran fenilcetonúricos (dos de ellos eran hermanos, y se les contó como un solo sujeto), y 12 familiares que no estaban afectados. El total de los alelos tipificados unequívocamente fue de 29 (8/29 alelos fenilcetonúricos y 21/29 alelos en sujetos normales). De los haplotipos descritos hasta la fecha,[6] encontramos dos en nuestra población: el 16.3 y el 29. Se reportan 10 nuevos haplotipos no descritos anteriormente, que se señalan en el cuadro 1. En el cuadro 2 se presenta la frecuencia y la distribución de los diferentes haplotipos entre los sujetos con FCU y los familiares normales. Con el estudio de los haplotipos fue posible identificar a dos sujetos portadores de un cromosoma afectado; ambos eran hermanos sanos de un sujeto con FCU (fig.1).

En la determinación de los FCU portadores de la mutación IVS10 se incluyeron 2 sujetos más con FCU, además de los cuatro probandos en quienes se estudiaron los haplotipos, lo que hace un total de 6 FCU, o sea, que se estudiaron 12 cromosomas. La determinación de los

CUADRO 3
Lista de los pacientes con FCU, portadores de la IVS-10

FCU 1	Heterocigoto
FCU 2	Heterocigoto
FCU 3	No la porta
FCU 4	Heterocigoto
FCU 5	Heterocigoto
FCU 6	Heterocigoto

Total de alelos estudiados: 12
Alelos portadores de la mutación: 5
Prevalencia de la mutación: 42%

genotipos, basada en la presencia de la mutación IVS10, se presenta en el cuadro 3.

Discusión

En este trabajo se hizo un estudio molecular del gen de la FCU en la población mexicana. Los resultados indican que hay una importante heterogeneidad molecular en las alteraciones y composición del gen de la FAH.

Aunque la muestra estudiada es pequeña, la distribución de los haplotipos en nuestra población difiere de la de otros países mediterráneos, en especial si la comparamos con España, que es el país con quién, por razones históricas, deberíamos tener una buena proporción de genes en común. El haplotipo más común en los países mediterráneos (España, Portugal e Italia) es el número uno (50% aproximadamente).[1] Este haplotipo no se presentó en ninguno de los casos estudiados, que si bien es una muestra pequeña tiene un tamaño suficiente como para detectar una alta frecuencia del haplotipo. También es importante señalar el hallazgo de 10 haplotipos que no habían sido reportados anteriormente. Este hecho habla aún más en favor de la heterogeneidad genética de nuestra población y de su identidad específica al nivel de la estructura genética.

Estos hallazgos contrastan con el estudio de la mutación IVS10. Esta mutación se ha reportado con mucha frecuencia en países como España (20%), Italia (12%) y Turquía (39%).[12,13] En este sentido, la gran frecuencia con que se encuentra en nuestra población (42%) sí habla a favor de una influencia genética importante de los inmigrantes ("efecto de fundador") provenientes de países mediterráneos. Por otro lado, la mayoría de los pacientes portadores de la mutación, la presentaban como heterozigotos, lo que sugiere la existencia de otras mutaciones igualmente frecuentes que contribuyen a este fenómeno de heterogeneidad genética. En este sentido, el siguiente paso sería secuenciar los exones del gen de la FAH en los pacientes con FCU, y de esta manera identificar de manera precisa la alteración molecular.

Existen datos provenientes de otros estudios realizados por nuestro mismo grupo, que apoyan el mencionado "efecto de fundador". Velázquez y cols. (1993)[15] reportaron que 47% de los pacientes con fenilcetonuria, diagnosticados en el Instituto Nacional de Pediatría (INP), en México, y 39.1% de los pacientes mexicanos diagnosticados con esta enfermedad en la UCLA, provinieron del estado de Jalisco. En contraste, sólo el 2.1% de los demás sujetos afectados con errores innatos del metabolismo, diagnosticados en el INP, y 21.2% en la UCLA (mexicanos), fueron originarios de este estado.

Por otro lado, la secuencia que se tendrá que realizar una vez que los genes de las enfermedades psiquiátricas se hayan clonado será la de las metodologías moleculares empleadas. Este es uno de los puntos por los que este estudio es útil para el psiquiatra, ya que gracias al estudio del DNA le permitirá vislumbrar el futuro de la clínica genético-molecular en la psiquiatría, en especial, por lo que toca a la identificación de los familiares portadores de mutaciones y el consecuente consejo genético con base en una precisa estimación de los riesgos que implica presentar la enfermedad.

Agradecimientos

El presente trabajo fue subencionado por donativos del Grupo de Estudios al Nacimiento (GEN) A.C. Donativo por parte de la UNESCO y el Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS) de la UNAM.

Referencias

1. CAILLAUD C, VILARINHO L, REY F, BERTHELON M, SANTOS R, LYONNET S, BRIARD M, OSORIO R, REY J, MUNNICH A: Linkage disequilibrium between phenylketonuria and RFLP haplotype 1 at the phenylalanine hydroxylase locus in Portugal. *Hum Genet,* 89:69-72, 1991.
2. DASOVICH M, KONECKI D, LICHTER KONECKI U, EISENSMITH R, GÜTLER F, NAUGHTON E, MULLINS C, GIOVANNI M, RIVA E, WOO S: Molecular Characterization of a PKU allele prevalent in southern Europe and Ireland. *Somatic Cell Molec Genet,* 17:303-309, 1991.
3. DI LELL A, KWOK S, LEDLY F, MARVIT J, WOO S: Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemestry,* 25:743-749, 1986.
4. EISNENSMITH R, y cols.: Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemestry,* 25:743-749, 1986.
5. EISNENSMITH R, WOO S: Molecular basis of phenylketonuria and related hyperphenylalaninemias: Mutations and polimorphisms in the human phenylalanine hydroxylase gene.*Human Mutation,* 1:13-23, 1992.
6. EISNENSMITH R, WOO S: Updated listing of haplotypes at the human phenylalanine hydroxylase (PAH) locus. *Am J Hum Genet,* 51:1445-1448, 1992.
7. LEDLEY FD, GRENETT HE, WOO SL: Biochemical characterization of recombinant human phenylalanine hydroxylase produced in Escherichia. Coli *J Biol Chem,* 262:2228-2233, 1987.
8. LICHTER-KONECKI U, SCHLOTTER M, YAYLAK C, OZGUC M, COSKUN T, OZLAP I, WENDEL U, BATZLER U, TREFZ F, KONECKI D: DNA haplotype analysis at the phenylalanine hydroxylase locus in the Turkish population. *Hum Genet,* 81:373-376, 1989.
9. NICOLINI H, CAMARENA B, DE LA FUENTE JR: Mapeo cromosómico molecular en enfermedades psiquiátricas. *Acta Psiquiat y Psicol Am Lat,* 39(1):45-49; 1993.
10. OKANO Y, WANG T, EISENSMITH R, GUTLER F, WOO SLC: Recurrent gene mutation in the human phenylalanine hydroxylase. *Am J Hum Genet,* 46:919-924, 1990.
11. OTT J. A: Computer program for linkage analysis of general human pedigrees. *Am J Hum Genet,* 28:528-529, 1976.
12. PEREZ B, DESVIAT L, DIE M, UGARTE M: Mutation Analysis of phenylketonuria in Spain: Prevalence of two mediterranean mutations. *Hum Genet,* 89:341-342,1992.
13. PEREZ B, DESVIAT L, DÍE M, CORNEJO V, CHAMOLES N, NICOLINI H, UGARTE M: Presence of the mediterranean PKU mutation IVS10 in Latin America. *Hum Molec Genet,* 2(8):1289-1290, 1993.

14. SCRIVER C, KAUFMAN S, WOO SL: Mendelian Hyperphenylalaninemia. Coli. *Annu Rev Genet,* 22:301-321, 1988
15. VELAZQUEZ A, UGARTE M, BILBAO G, CRUZ C, CAMARENA B, VELA M, HERNANDEZ D, PEREZ-ACANDRADE M, PHOENIX B, CEDERBAUM S: Estudios sobre la fenilcetonuria en Jalisco. V Congreso Nacional de Investigación en Salud Pública. II Congreso regional de la Asociación Internacional de Epidemiología, enero, 1994.
16. WOO SLC: Molecular basis and population genetics of phenylketonuria. *Biochemestry,* 28(1):1-7, 1989.