

**DETECCIÓN DE UNA ENFERMEDAD AUTOSÓMICA DOMINANTE MEDIANTE
MARCADORES MOLECULARES DE TIPO SSCP: IDENTIFICACIÓN DE
PORTADORES DE PKD FELINO.**

**DETECTION OF AN AUTOSOMAL DOMINANT DISEASE USING SSCP
MOLECULAR MARKERS: FELINE PKD CARRIERS IDENTIFICATION.**

Isaac Crespo Casajús, María Asunción García-Atance Fatjó, Susy Méndez Delgado

TUTOR: Susana Dunner Boxberger

Dpto. de Producción Animal. Fac. de Veterinaria. UCM

RESUMEN

El PKD felino (Polycystic Kidney Disease) es una enfermedad hereditaria causada por una mutación en un gen autosómico dominante, el *PKDI*, que afecta al 38 % de la población mundial de gato persa y exótico. Mediante el uso de marcadores moleculares de tipo SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) es posible obtener un perfil electroforético diferenciador de genotipos de fácil lectura en un gel de poliacrilamida y que nos va a servir para la identificación de portadores de la forma mutada del *PKDI*, pudiendo de esta forma evitar la reproducción de estos individuos con objeto de eliminar la variante mutada del gen de la especie felina. Presentamos en este trabajo los resultados obtenidos tras el procesamiento de 405 muestras en el laboratorio de genética de la Facultad de Veterinaria, habiéndose detectado 107 heterocigotos para la forma anómala del gen, lo que equivale hablar de un 26,4 % de prevalencia de portadores de la mutación.

PALABRAS CLAVE: PKD, SSCP, FELINO, RIÑÓN, POLIQUÍSTICO

ABSTRACT

Feline PKD (Polycystic Kidney Disease) is an inherited disease caused by a mutation in an autosomal dominant gene, the *PKDI*, that affects 38 % of Persian and exotic cats worldwide. The use of the SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) technique allows the detection of those individuals which are carrier of a particular mutation in that gene, enabling breeders to avoid reproduction between carriers. After genotyping 405 samples, we have detected 107 heterozygotes with a 26,4 % of mutation prevalence.

KEYWORDS: PKD, SSCP, FELINE, KIDNEY, POLYCYSTIC

INTRODUCCIÓN

La enfermedad del riñón poliquístico o PKD (Polycystic Kidney Disease) afecta al 38 % de la población mundial de gato persa y exótico, apareciendo también esporádicamente en otras razas que se han originado por cruzamiento con aquellas, como Selkirk Rex, Scottish Fol., Birmano, Ragdoll, American Rex Devon, Maine Coon, Bosque de Noruega, Sphynx, Cornisa Rex, Abisinio y Somalí.

Es una enfermedad hereditaria de tipo autosómico dominante causada por una mutación puntual en el exón 29 del gen PKD1, situado en el cromosoma 18 (E3), donde una adenina es sustituida por una citosina en la posición 3284, generándose de esta manera una señal de paro que traerá como consecuencia la formación de una proteína anómala, la policistina, que será la responsable directa de la formación de quistes en riñón, hígado y páncreas.

No se han encontrado individuos portadores de la mutación que no estuvieran afectados ni homocigotos para el gen mutado, siendo todos los animales afectados heterocigotos; por lo que se supone que el carácter es letal en homocigosis para el embrión.

Los individuos portadores suelen manifestar la enfermedad entre los 3 y los 10 años, siendo la edad media de presentación los 7. Aunque hay una gran variabilidad en la severidad de los síntomas y en el momento de la manifestación clínica de la enfermedad, ésta siempre cursa con insuficiencia renal causada por la presencia de quistes en el riñón.

Debido a la presencia de portadores asintomáticos de la enfermedad hasta un momento que puede ser muy posterior al comienzo de la edad reproductiva, y, siendo el objetivo final eliminar la variante mutada del gen en la especie felina, surge la necesidad de detectar precozmente los heterocigotos para impedir su reproducción.

La prueba disponible en el Servicio de Genética de la Facultad de Veterinaria permite cubrir esta necesidad con una alta fiabilidad y un bajo coste a partir de muestras de sangre o hisopados bucales. El SSCP es un método capaz de identificar la variación de un solo nucleótido en un segmento de ADN basándose en que, bajo condiciones no desnaturalizantes, una hebra simple de ADN adopta una conformación espacial que es específica de su

secuencia de nucleótidos, ya que es consecuencia de la hibridación entre distintas regiones de esta cadena simple al replegarse sobre sí misma. Las distintas configuraciones obtenidas a partir de segmentos con una base diferente se pueden evidenciar por el distinto comportamiento electroforético que presentarán al migrar a través de una matriz de poliacrilamida.

MATERIAL Y MÉTODOS

El ADN fue obtenido a partir de 103 muestras de sangre y 302 hisopados bucales por un método fenol-cloroformo en el caso de las primeras y por columna en las segundas siguiendo las recomendaciones del fabricante (Qiagen). La amplificación por PCR se realizó en un volumen total de 15 µl utilizando U de Taq Polimerasa (Biotools), 50 mM de MgCl₂, XXmM de dNTPs, XX pmol de cada cebador y XX ng de ADN siguiendo el protocolo siguiente: 31 ciclos (94° C, 20 segundos, 65° C 15 segundos, 72° C 15 segundos) precedidos de 4 minutos a 94° C y terminando con 5 minutos de extensión final a 72° C.

Para la carga en geles SSCP, se mezcla el volumen de PCR con 10 µl de un tampón desnaturalizante (0,05% Azul de Bromofenol, 0,05% Xilene-cyanol, 5,5 mM EDTA pH 8.0 en formamida).

Condiciones de la electroforesis y de los geles de poliacrilamida.

Una vez añadido 10 microlitros del tampón el producto de PCR se va a desnaturalizar durante 3 minutos a 90 ° C, tras los cuales será enfriado rápidamente en hielo y mantenido en él hasta que sea cargado en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 29/1. Tras una electroforesis de 5 horas a 10 ° C y 300 voltios, se tiñe el gel con nitrato de plata siguiendo un procedimiento estándar lo que permite visualizar los segmentos amplificados y llevar a cabo la lectura de resultados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dada la fácil interpretación de los resultados obtenidos con esta técnica, la lectura se realiza por inspección visual directa, utilizándose en cada gel controles positivos y negativos como referencia para determinar la presencia o ausencia de la banda diagnóstica (Figura 1).

Tras el análisis de 405 muestras se han detectado 107 heterocigotos, lo que nos da una prevalencia global de 26,4 %. El análisis por razas detecta 80 heterocigotos en la raza Persa entre 276 muestras indicando una prevalencia de 28,9 % y de 24,6 % en la raza Exótico en la que hemos analizado 75 muestras (16 heterocigotos detectados).

Tabla 1. Resultados.

Gráfico 1.

Gráfico 2.

Gráfico 3.

Gráfico 4.

Gráfico 5.

DISCUSIÓN

Frente a otros métodos que requieren reactivos y equipos sofisticados que aumentan su complejidad y costo operativo, el método de análisis de los portadores por ADN mediante SSCP es una alternativa sencilla, rápida y económica.

A pesar de que se ha descrito un rango de sensibilidad variable para el SSCP (80-90 % para detectar mutaciones en fragmentos menores de 200 nucleótidos en condiciones ideales del SSCP -Sheffield et al., (1993); cercano al 100%, Barroso y col., (1998)) esta técnica ha sido fiable para la detección de la banda de PKD1 en todos los casos de los controles utilizados.

Hay que tener en cuenta la posibilidad de que existan otras mutaciones del *PKD1* o de otros genes capaces de causar PKD, tal y como ocurre en la especie humana, donde las mutaciones del *PKD1* constituyen solo el 85 % de los casos de la enfermedad del riñón poliquístico. Esta podría ser la razón de que la prevalencia obtenida en nuestro servicio de genética sea menor que las obtenidas en otros trabajos basados en el diagnóstico ecográfico (Bonazzi et al., 2007) y coincidente con las de otros trabajos basados en la detección de la misma mutación que en nuestra prueba (Helps et al., 2007) mediante PCR en tiempo real.

La gran variabilidad en la edad de presentación de la enfermedad y en la severidad de los síntomas hace sospechar que otros genes pudieran influir sobre la sensibilidad o resistencia frente a la forma anómala del *PKDI* que detecta esta prueba y sobre la cual no se aporta ninguna información. Esto último es irrelevante desde el punto de vista de la toma de decisiones para eliminación de la mutación de la población felina, pero sí es importante para poder dar un pronóstico de evolución de la enfermedad en un individuo afectado.

CONCLUSIONES

La técnica descrita es sencilla y barata y permite detectar de forma rápida si un animal es portador o no de la mutación en el gen *PKD1*, dando la posibilidad a los criadores de controlar los cruces entre sus reproductores.

BIBLIOGRAFÍA

- Barroso A, Barroso, Dunner, S, Cañon, J. 1998. Detection of Bovine Kappa-Casein Variants A, B, C, and E by Means of Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP). *J. Anim. Sci.* 76:1535–1538
- Bonazzi M, Volta A, Gnudi G, Bottarelli E, Gazzola M, Bertoni G. Prevalence of the polycystic kidney disease and renal and urinary bladder ultrasonographic abnormalities in Persian and Exotic Shorthair cats in Italy. *J Feline Med Surg.* 2007 May 9
- Helps CR, Tasker S, Barr FJ, Wills SJ, Gruffydd-Jones TJ. Detection of the single nucleotide polymorphism causing feline autosomal-dominant polycystic kidney disease in Persians from the UK using a novel real-time PCR assay. *Mol Cell Probes.* 2007 Feb;21(1):31-4.
- Lyons LA, Biller DS, Erdman CA, Lipinski MJ, Young AE, Roe BA, Qin B, Grahn RA. Feline polycystic kidney disease mutation identified in *PKD1*. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Oct;15(10):2548-55.
- Young AE, Biller DS, Herrgesell EJ, Roberts HR, Lyons LA. Feline polycystic kidney disease is linked to the *PKD1* region. *Mamm Genome.* 2005 Jan;16(1):59-65.

Gráfico 1:

TOTALES

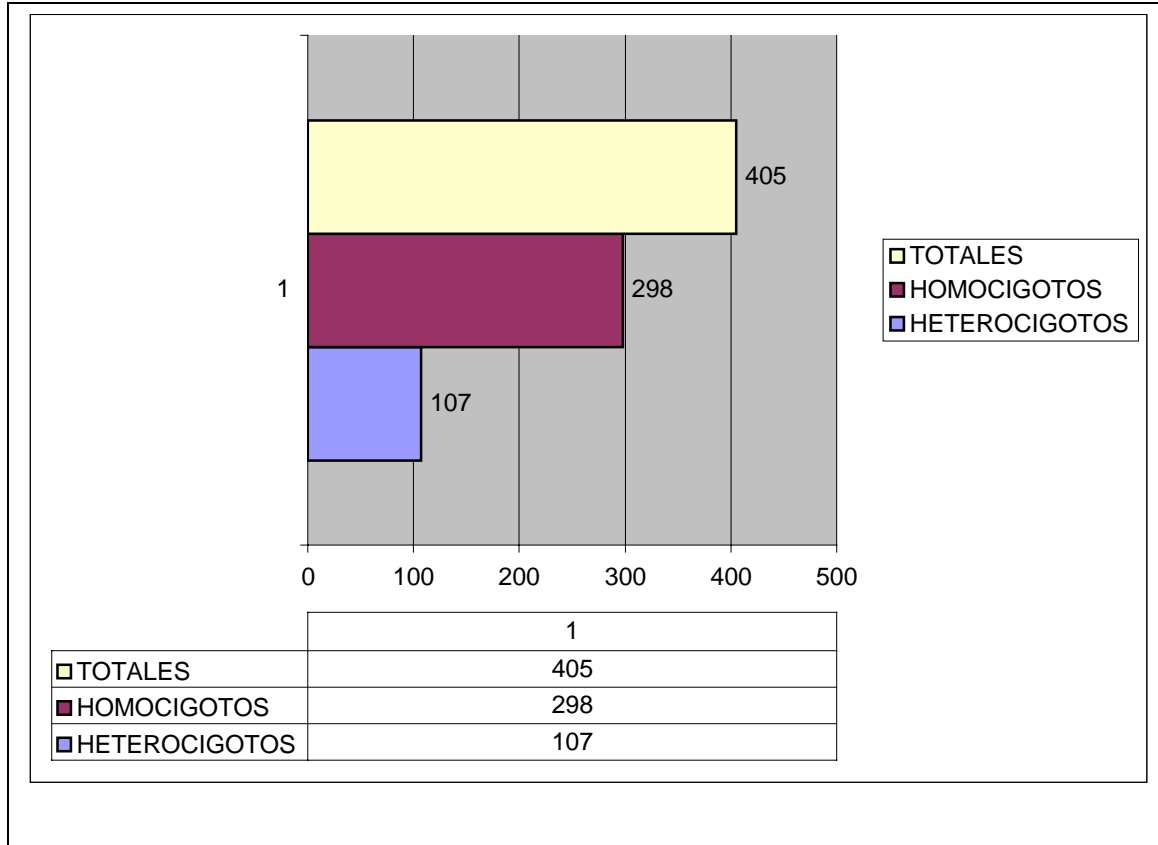


Gráfico 2:

PERSAS

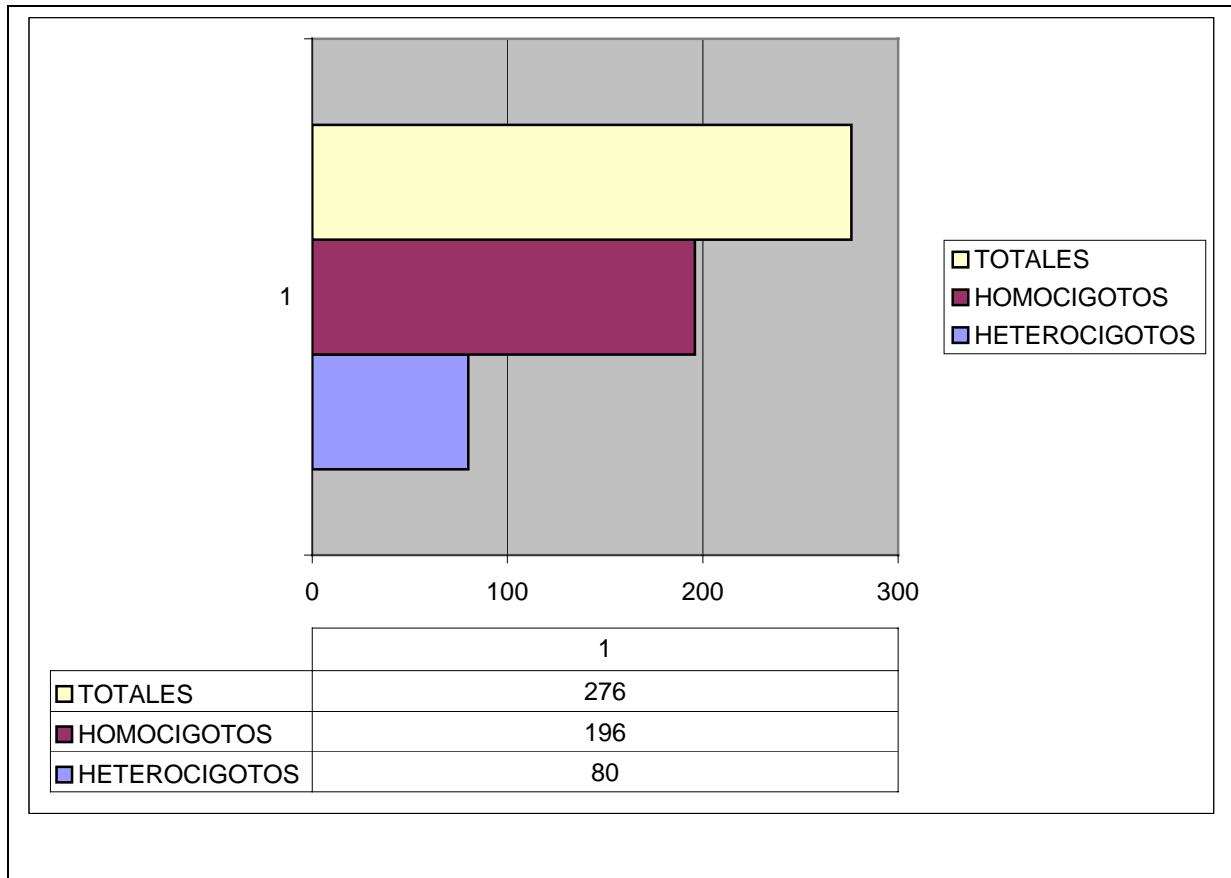


Gráfico 3:

EXÓTICOS

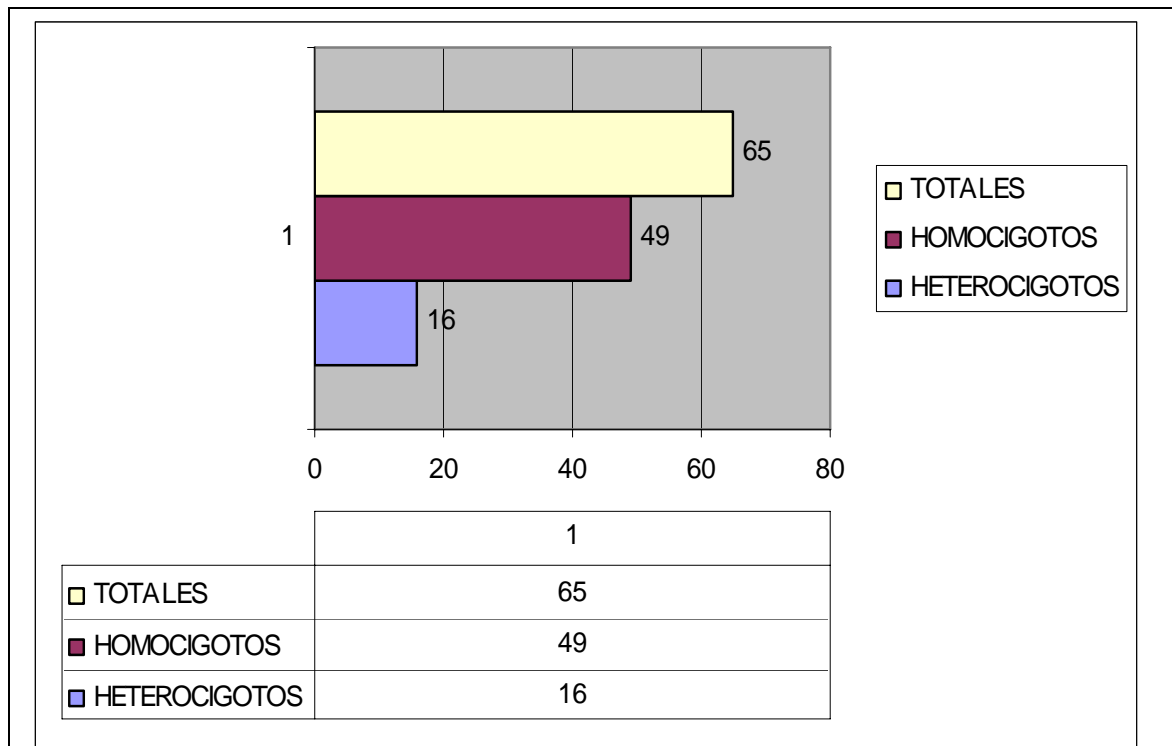


Gráfico 4:

HEMBRAS

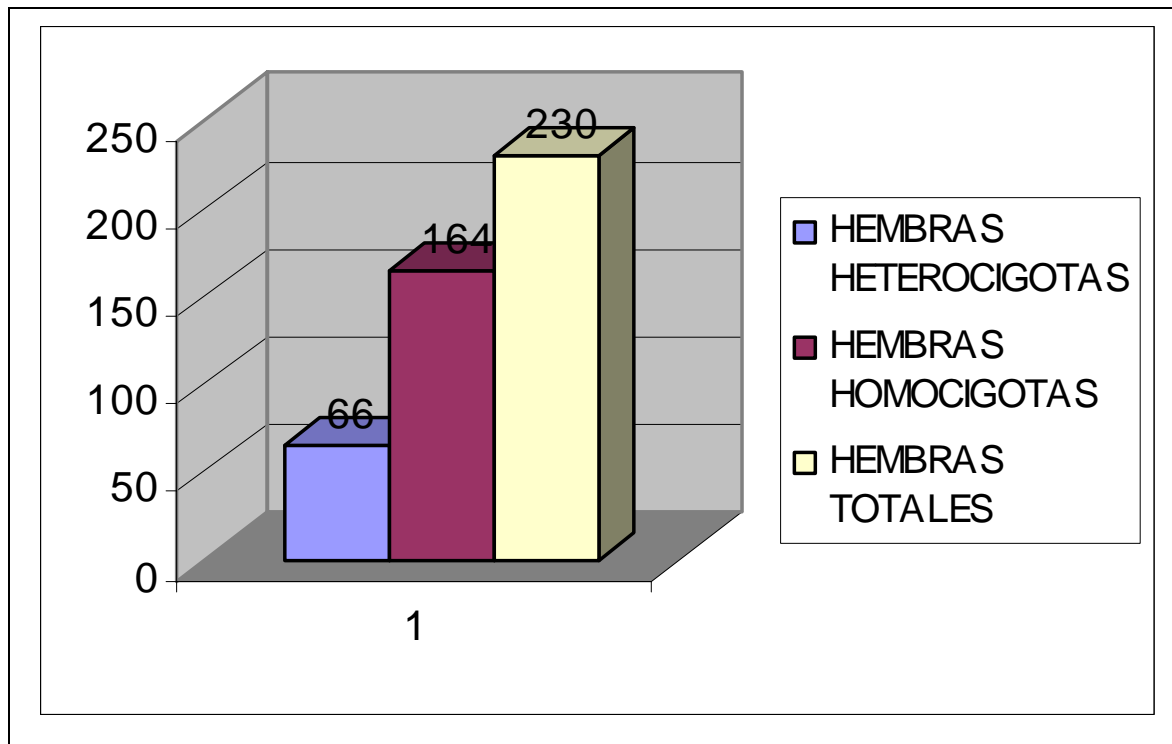
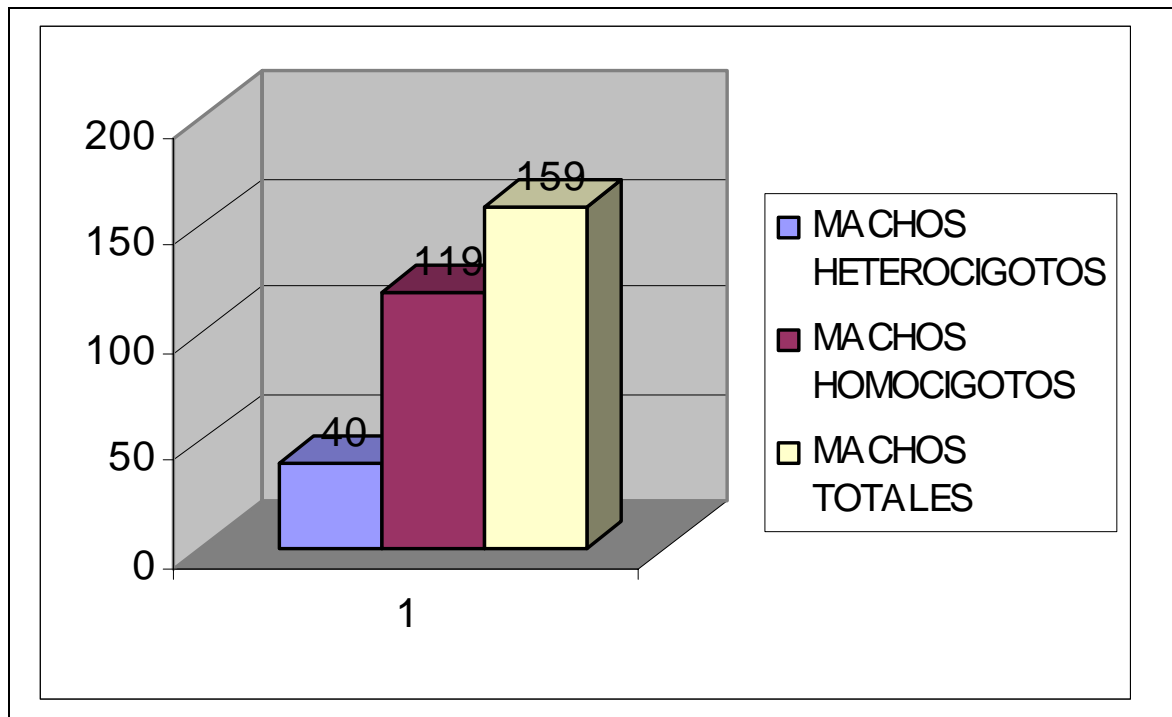


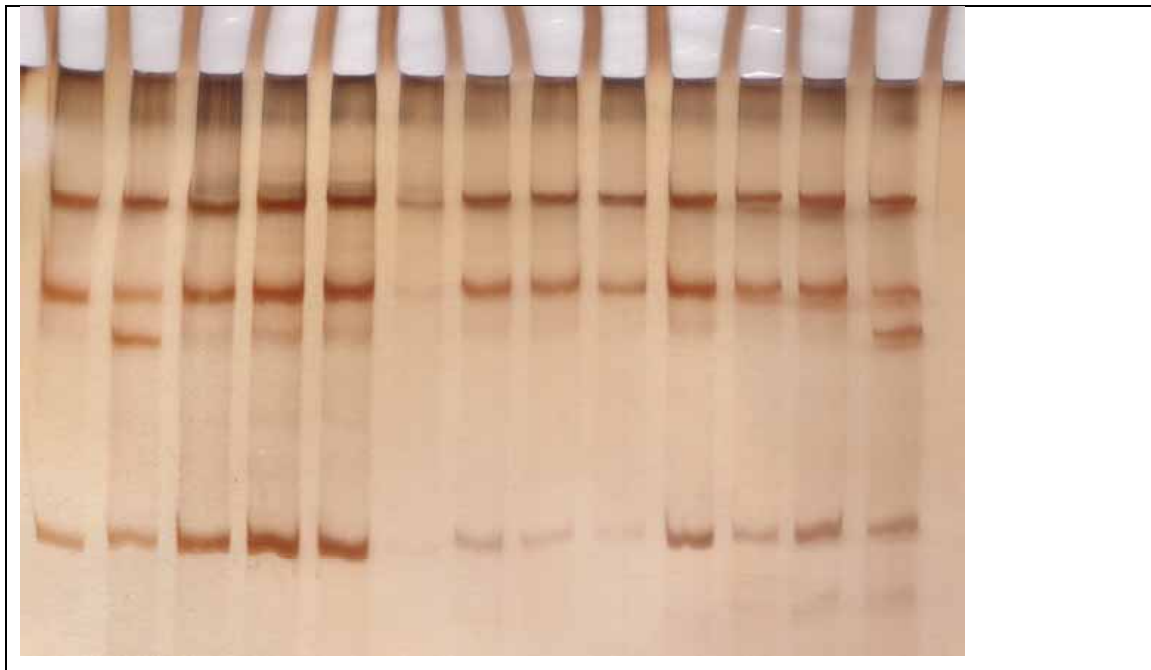
Gráfico 5:

MACHOS

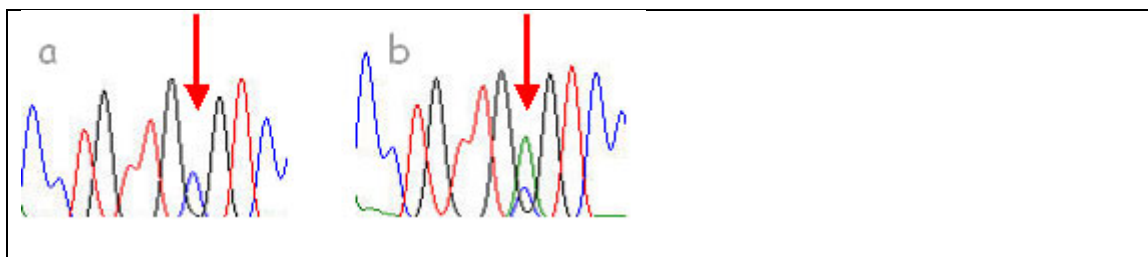


COMPARATIVA ECONÓMICA

Prueba genética	Diagnóstico ecográfico	
Precio para muestras de sangre: 35 euros	Consulta: 28 euros	
Precio para muestras de hisopo: 44 euros	Ecografía: 52 euros	







Tipo de muestra procesada	Prevalencia en raza persa	Prevalencia en raza exótico	Prevalencia por sexos	Prevalencia global
103 muestras de sangre	Heterocigotos: 28,9 %	Heterocigotos: 24,6 %	Hembras 28,6 %	Heterocigotos: 26,4 %
302 muestras de hisopado bucal	Homocigotos: 71,0 %	Homocigotos: 73,5 %	Machos: 25,1 %	Homocigotos: 73,5 %