

DIAGNOSTICO DE POLINEUROPATIA AMILOIDOTICA FAMILIAR TIPO I EN LA ARGENTINA

GLADYS PEREZ¹, MARIA CRISTINA ROMERO^{1,2}, PEDRO TRIGO², JAVIER LENDOIRE²,
OSCAR IMVENTARZA², ALCIRA NESSE¹

¹Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires;

²Laboratorio Central y Unidad de Trasplante Hepático, Hospital General de Agudos Dr. Cosme Argerich, Buenos Aires

Resumen La polineuropatía amiloidótica familiar (PAF) es un tipo de amiloidosis hereditaria. Constituye un desorden autosómico dominante caracterizado por el depósito sistémico de material amiloide en tejidos especialmente en nervios periféricos. El principal componente del amiloide es una variante mutada de la transtiretina (TTR), proteína transportadora de tiroxina y retinol. Han sido descritas numerosas mutaciones en el gen TTR que causan alteración de la secuencia primaria de la proteína. La PAF portuguesa o PAF Tipo I se origina por la variante TTR Val30Met en la cual una valina en posición 30 es reemplazada por una metionina. Es fundamental la identificación temprana de portadores de la mutación porque una vez declarada la enfermedad el único tratamiento efectivo es el trasplante hepático, órgano de síntesis de la TTR. La PAF Tipo I ha sido muy estudiada en la Argentina debido al hallazgo de un área endémica donde habitan familias descendientes de inmigrantes portugueses. El presente trabajo ha sido enfocado a resolver la necesidad diagnóstica de la comunidad, ya que la ausencia de una metodología apropiada en nuestro país ha impedido, hasta ahora, que individuos con antecedentes familiares de PAF puedan tener un diagnóstico precoz y acceder al trasplante hepático temprano. En consecuencia, nuestro objetivo fue optimizar una metodología para detectar la mutación Val30Met adaptando técnicas previamente descritas. La fiabilidad, sencillez y rapidez en la obtención de los resultados, así como el requerimiento de pequeño volumen de muestra, hacen que la técnica desarrollada en este trabajo sea una herramienta apropiada para procedimientos de *screening*, permitiendo contar con un marcador preclínico de la enfermedad.

Palabras clave: transtiretina, polineuropatía amiloidótica familiar, mutación TTR Val30Met

Abstract *Diagnosis of familial amyloid polyneuropathy type I in Argentina.* Familial amyloid polyneuropathy (FAP) is an autosomal dominant inherited disease, characterized by systemic deposition of amyloid fibrils in various tissues, especially in peripheral nerves, being a variant of transthyretin (TTR) the principal component of amyloid fibrils. TTR is a normal plasma protein (previously called prealbumin) that functions as a transport protein binding tiroxine and retinol. Among many mutations that have been found in the TTR gene, the variant with a single amino acid substitution of methionine for valine at position 30 (TTR Val30Met) is the responsible of the Portuguese-type Familial Amyloidotic Polyneuropathy (FAP Type I). Interest in this pathology has arisen in Argentina because of the finding of an endemic area where a group of Portuguese immigrant families is localized. Since liver transplantation is a widely accepted treatment because it results in the disappearance of variant transthyretin from plasma, an early detection of the altered gene is essential. Thus, the objective of the present work was to optimize a methodology to detect the Val30Met mutation introducing modifications into techniques that were previously developed. The simple method here described is useful to confirm the diagnosis of the potential disease and, therefore, make it possible for patients to gain access to early liver transplantation.

Key words: transthyretin, familial amyloidotic polyneuropathy, TTR Val30Met mutation

El término amiloidosis define a un grupo de enfermedades caracterizadas por la formación de depósitos extracelulares de proteínas fibrilares. Algunas de estas

enfermedades son localizadas mientras que otras son sistémicas, las cuales a su vez pueden ser esporádicas, secundarias a otras condiciones o hereditarias.

La polineuropatía amiloidótica familiar (PAF) constituye el tipo más prevalente de amiloidosis sistémica hereditaria. Es una enfermedad autosómica dominante, progresiva, invalidante y fatal que se caracteriza por el depósito de material amiloide en diversos tejidos, especialmente en nervios periféricos¹.

Recibido: 19-IX-2007

Recibido: 8-V-2008

Dirección postal: Dra. Gladys Pérez, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, 1428 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11)4576-3342 e-mail: gperez@qb.fcen.uba.ar

El principal componente del amiloide es una variante mutada de la proteína transtiretina (TTR)², cuya función biológica normal es la de transportar tiroxina y retinol en plasma. Esta proteína, antes conocida como prealbúmina, es un tetrámero compuesto por cuatro subunidades idénticas asociadas en forma no covalente. Cada monómero consta de 127 aminoácidos y su masa molecular es de, aproximadamente, 14 kDa³⁻⁵.

Han sido descriptas varias isoformas no patológicas de TTR^{6,7}, pero se han identificado alrededor de 100 mutaciones que dan origen a variantes de TTR asociadas a amiloidosis en humanos^{1,8}. Con excepción de Val122Ile, que es el resultado de una delección en el exón 4, todas las variantes descriptas hasta ahora provienen de mutaciones puntuales que tienen como consecuencia la sustitución de un aminoácido en la cadena proteica⁹.

La variante patogénica de TTR se encuentra en circulación y forma placas proteicas por mecanismos todavía no bien conocidos. Es probable que las sustituciones en la estructura primaria de la molécula induzcan cambios conformacionales que desestabilicen a la proteína provocando su agregación. El crecimiento de estos agregados proteicos daría por resultado una estructura fibrilar plegada (material amiloide) que se deposita en los tejidos, causando disfunción orgánica y conduciendo, finalmente, a la muerte. Es así que las variantes de TTR constituyen marcadores bioquímicos de PAF. Más aún, estas proteínas mutadas pueden ser consideradas marcadores preclínicos de la enfermedad, ya que pueden ser detectadas no sólo en los pacientes con manifestaciones clínicas asociadas a PAF, sino también en sus familiares, transportadores asintomáticos, quienes padecen el riesgo de desarrollar la enfermedad y/o transmitirla a sus descendientes.

Una de las variantes más frecuentes de TTR es la que posee una sustitución del aminoácido valina por metionina en la posición 30 (Val30Met) y es característica de la PAF Portuguesa o PAF tipo I¹⁰. Inicialmente, este tipo de PAF ha sido demostrada en tres áreas endémicas restringidas a Oporto en Portugal, Skelleftea en Suecia y Arai y Ogawa en Japón¹¹. En la Argentina, esta variante ha sido estudiada debido a su detección en un grupo de familias descendientes de inmigrantes portugueses que habitan en la localidad de 25 de Mayo de la provincia de Buenos Aires^{12, 13}.

La PAF tipo I se manifiesta, generalmente, entre los 25 y 35 años y es acompañada por polineuropatía progresiva seguida de disfunción cardíaca e insuficiencia renal. Estos signos fueron inicialmente descriptos por Andrade (1952)¹⁴ en familias del norte de Portugal. Otras manifestaciones típicas incluyen pérdida de sensibilidad en la piel de las manos, aumento de la motilidad intestinal con diarrea y malnutrición, proteinuria y dificultad para caminar¹⁵. Estas y otras complicaciones relacionadas con neuropatía autonómica conducen al desenlace fatal entre los 7 y 10 años luego de declarada la enfermedad^{16,17}.

Desde el punto de vista terapéutico, se han realizado experiencias con plasmaféresis e inmunoadsorción de TTR en un número restringido de pacientes, pero no existen evidencias definitivas de un aporte terapéutico exitoso¹⁸. También se están analizando moléculas que estabilicen la TTR Val30Met en un intento por detener su depósito como material amiloide¹⁹. En la actualidad, el único tratamiento definitivo lo constituye el trasplante hepático, el cual comenzó a ser utilizado en Suecia en 1990^{20, 21}.

La mayor parte de la TTR (98%) es sintetizada en el hígado y una pequeña proporción proviene del plexo coroideo, intestino delgado, páncreas, pituitaria y epitelio de la retina ocular²²⁻²⁴. A pesar de constituir el mayor sitio de síntesis, el hígado no parece estar macroscópicamente dañado en pacientes con PAF²⁵, ya que si bien se hallan depósitos de material amiloide, la función hepática no se encuentra alterada¹. El fundamento de la terapéutica exitosa mediante el trasplante hepático consiste en eliminar la mayor fuente de producción de la proteína mutada. Al sustituir el hígado por otro órgano que no posee alteraciones en el gen TTR, se sintetiza la proteína normal y, por lo tanto, no progresa el depósito de amiloide.

Debido a la importancia del trasplante hepático como único tratamiento disponible y a la necesidad de evitar el deterioro físico del paciente, resulta fundamental realizar la detección temprana de los portadores de una mutación en el gen TTR. La importancia del diagnóstico y trasplante precoz reside en que muchas de las lesiones causadas por la enfermedad no retrogradan a pesar de la síntesis de TTR normal con el hígado implantado²⁶.

Hasta el momento no se disponía en nuestro país de una metodología apropiada para la detección de la mutación Val30Met. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue desarrollar un método que resolviera esta necesidad diagnóstica. A través de nuestra investigación y en base a técnicas previamente utilizadas por otros investigadores^{27, 28}, hemos optimizado un método simple, basado en la técnica de Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (*Restriction Fragment Length Polimorfism*, RFLP) luego de la amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) de un fragmento del gen TTR. La metodología desarrollada fue empleada en estudios familiares para identificar portadores de la mutación Val30Met característica de PAF tipo I, la cual presenta elevada prevalencia en nuestro país.

Materiales y métodos

En el Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA), fueron analizadas muestras de 37 posibles portadores de la mutación Val30Met derivados por el Servicio de Trasplante Hepático del Hospital

General de Agudos Dr. Cosme Argerich. De ellos, 19 individuos pertenecen a 3 generaciones de una misma familia (*Familia I*) y son descendientes directos de una persona de origen portugués que desarrolló PAF tipo I (JD). La paciente AP perteneciente a la primera generación de dicha familia, se encontraba al momento del análisis en una etapa avanzada de la enfermedad, requiriendo apoyo para caminar, estadio que coincide con el score III B de la clasificación de Suhr *et al*²⁹. Esta paciente, de 49 años, tenía contraindicado el trasplante hepático por lo avanzado de la enfermedad. La población analizada de la segunda generación incluyó 9 mujeres y 5 varones (rango de edad: 16-33 años) y de la tercera generación 3 mujeres y un varón (rango de edad: 13-22 años). Ninguno de los individuos estudiados de la segunda y tercera generación de esta familia presentaba, al momento del estudio, manifestaciones clínicas de PAF (estadio 0).

Otros 16 pacientes que conforman el grupo en estudio son integrantes de una familia no relacionada con la anterior (*Familia II*). Pertenecen a dos generaciones, la primera de las cuales está constituida por hermanos descendientes de la misma madre. Uno de ellos (HP) mostraba al momento del estudio manifestaciones coincidentes con el score III A²⁹.

Además, fueron analizados dos pacientes de los cuales no existen hasta la actualidad evidencias que permitan relacionarlos con ninguna de las dos familias anteriormente mencionadas.

Como controles, fueron incorporados al estudio individuos que no presentaban manifestaciones clínicas ni antecedentes familiares de la enfermedad. El estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética del Hospital Dr. Cosme Argerich y el consentimiento de los pacientes e individuos controles.

Se extrajeron muestras de sangre con anticoagulante. Inmediatamente se realizaron las pruebas bioquímicas y una alícuota fue conservada a -20°C para su posterior análisis por técnicas de biología molecular.

Se realizaron determinaciones bioquímicas en suero para evaluar la función renal y hepática de los individuos en estudio. Se utilizó un autoanalizador *Hitachi 917 (Boehringer Mannheim Diagnostica, EE.UU.)*, con calibradores, controles y reactivos *Roche Diagnostica GmbH, Alemania*. El Laboratorio Central del Hospital General de Agudos Dr. Cosme Argerich se encuentra incorporado al Programa de Control de Calidad Externo Buenos Aires-CEMIC (República Argentina).

Se efectuaron:

a) Pruebas de la función renal: urea por test cinético UV, creatinina por método cinético basado en la reacción de Jaffé y ácido úrico por test enzimático.

b) Pruebas de la función hepática: colesterol (colesterol *ICHOD-PAP*), bilirrubina total (*Bilirrubina DPD*), bilirrubina directa (*JENDRASSIK-GROF*), proteínas totales por test colorimétrico basado en la reacción de biuret, albúmina por método BCG, aspartato-aminotransferasa (AST) mediante AST IFCC sin activación por piridoxalfosfato, alanino-aminotransferasa (ALT) por ALT IFCC sin activación por piridoxalfosfato, fosfatasa alcalina (ALP) por método optimizado, utilizando *buffer* DEA, gamma-glutamiltanspeptidasa (γ GT) por método gamma-glutamiltansferasa líquida.

Por otra parte, se realizó el estudio genético para investigar la presencia de la mutación Val30Met. La metodología utilizada se describe a continuación:

a) Extracción de ADN

A una alícuota de 500 μ l de sangre entera anticoagulada se agregó, aproximadamente, 1 ml de solución de lisis de eritrocitos (*buffer* TE: Tris 10 mmol/l, EDTA 1 mmol/l, pH 8).

Luego de homogeneizar, se centrifugó a 17000 *g* durante 2 min a 20 °C. El sobrenadante fue descartado y se repitieron los lavados hasta eliminar totalmente las trazas de hemoglobina, la cual posee un efecto inhibitorio sobre la reacción de amplificación en la técnica de PCR³⁰.

El *pellet* fue suspendido en solución de lisis nuclear (Tris 10 mmol/l, KCl 50 mmol/l, MgCl₂ 2.5 mmol/l, *Tween* 20 0.5%, pH 9). Se agregó proteinasa K en concentración final de 0.1 mg/ml y se incubó durante la noche en baño de agua a 56 °C.

La concentración de ADN fue estimada midiendo la absorbancia a 260 nm (A_{260}) y considerando que una unidad de A_{260} corresponde a una concentración de 50 μ g/ml. El grado de purificación del ADN obtenido fue determinado a través del índice A_{260}/A_{280} (relación entre ADN/proteína)³¹.

b) Amplificación del ADN genómico

Un fragmento de 362 pares de bases comprendiendo al exón 2 del gen TTR⁵, fue amplificado por PCR (*Mastercycler gradient, Eppendorf*) a partir de un volumen conteniendo 0.5-1.0 μ g de ADN genómico.

Las secuencias de los *primers* utilizados (*Invitrogen Life Technologies*), de acuerdo a Date *et al*⁷, se indican a continuación:

Forward 5' - ATT GTC GAC ACT TAC GTT CCT GAT
Reverse 5' - TTC TTT AGC AGA TGA TGT GAG CCT

Luego de una desnaturalización inicial de 5 min a 94 °C, se desarrollaron 30 ciclos de amplificación (94 °C por 30 s, 63 °C por 40 s y 72 °C por 1 min) y una última etapa de elongación durante 8 min a 72 °C.

La longitud del fragmento amplificado fue analizada por electroforesis en gel de agarosa conteniendo bromuro de etidio.

c) Análisis de restricción de los productos amplificados

Una alícuota del producto de amplificación fue digerida con 5 U de la endonucleasa de restricción *Nsi* I (*Invitrogen Life Technologies*), incubando a 37 °C durante toda la noche para garantizar una digestión completa^{27, 28}.

El producto de la reacción de digestión fue sometido a electroforesis en gel de agarosa 2% (p/v) con bromuro de etidio. El tamaño de las bandas observadas fue determinado por comparación con las del marcador de pares de bases (*Biodynamics SRL*) por observación en transiluminador.

Resultados

Las Tablas 1 y 2 muestran los resultados de las pruebas de laboratorio realizadas para evaluar la función renal y hepática de los individuos en estudio (n=37).

Los valores de las determinaciones bioquímicas descriptivas de la función renal se encontraron dentro del rango de referencia, con una excepción. La paciente AP perteneciente a la primera generación de la Familia I, única en estadio avanzado de la enfermedad, presentó alteración de la función renal con valores de urea y creatinina elevados.

La mayoría de los valores de las pruebas de laboratorio practicadas para describir la función hepática se encontraron dentro del rango de referencia, con algunas excepciones que presentaron valores aumentados de AST (3/37), ALT (2/37) y bilirrubina (1/37).

TABLA 1.- Evaluación de la función renal del grupo en estudio

	Valores observados	Valores de referencia
Creatinina mg/l	5.0 - 17.1	5.0 - 12.0
Urea g/l	0.2 - 0.9	0.1 - 0.5
Ac. úrico mg/l	27 - 67	24 - 70

TABLA 2.- Evaluación de la función hepática del grupo en estudio

	Valores observados	Valores de referencia
AST U/l	11 - 65	0 - 38
ALT U/l	6 - 61	0 - 41
ALP U/l	101 - 781*	(*)
γGT U/l	6 - 43	7 - 50
Colesterol g/l	1.1 - 2.5	1.5 - 2.0
Proteínas totales g/l	64 - 88	66 - 87
Albumina g/l	35 - 51	34 - 48
Bilirrubina total mg/l	3 - 22	0 - 11
Bilirrubina directa mg/l	0.2 - 5.4	0.2 - 3.0

(*): ver explicación en el texto

Con respecto a la ALP (Tabla 2, *), los adolescentes de entre 13 y 18 años (n=6) presentaron niveles ubicados dentro de los rangos de referencia, ya que los valores límites correspondientes a la metodología utilizada son 930 U/l para los varones y 440 U/l para las mujeres (Manual de Procedimientos Autoanalizador Hitachi 917). Entre los sujetos mayores a 18 años, 7/31 mostraron valores de ALP superiores al rango de referencia (hasta 250 U/l).

No se encontraron asociaciones entre las observaciones clínicas y los datos bioquímicos fuera del rango de referencia.

Los índices de purificación (relación ADN/proteínas) obtenidos con la metodología de extracción de ADN empleada, variaron entre 1.3 y 1.5. Estos valores son inferiores a lo recomendado (≥ 1.7), indicando una concentración de proteínas residuales mayor a lo sugerido como óptimo. Sin embargo, este factor no interfirió con el proceso de amplificación, siendo el producto obtenido a partir de este material adecuado para la detección de la mutación Val30Met. Por lo tanto, y teniendo en cuenta la sencillez de la técnica de extracción, no fue necesario realizar etapas adicionales para incrementar el grado de pureza del ADN.

La Figura 1 representa esquemáticamente al gen TTR y resume el fundamento de la técnica utilizada para la detección de la presencia de la mutación Val30Met.

El fragmento de 362 pb amplificado por PCR abarca la secuencia de ADN entre las posiciones 1464 a 1825 del gen TTR. La mutación puntual que caracteriza a la PAF tipo I es una sustitución en la posición 1679 (G es reemplazada por A). En el ADN con la secuencia normal no existe ningún sitio de corte para la enzima de restricción *Nsi*I. Sin embargo, cuando la secuencia está mutada, se genera un sitio de corte para la enzima, originándose dos fragmentos de 216 y 146 pares de bases como consecuencia de la digestión del producto de amplificación.

En el marco de la estandarización y control de calidad de la metodología desarrollada, se utilizaron diferentes condiciones para realizar la amplificación del ADN genómico y su posterior digestión:

a) Fueron ensayadas diferentes temperaturas de apareamiento de los *primers*, observándose mayor nivel de amplificación cuando el procedimiento fue desarrollado a 63 °C.

b) Se analizaron diferentes masas iniciales de ADN en un rango de 0.5 a 8.0 µg/50 µl de volumen final de reacción, encontrándose una relación inversa entre la cantidad del producto de amplificación obtenido y la masa inicial de ADN, cualquiera fuera la temperatura de apareamiento de *primers* utilizada. En base a los resultados obtenidos se seleccionó el rango comprendido entre 0.5 y 1.0 µg como masa de ADN óptima de trabajo.

c) Se ensayaron distintas concentraciones de la enzima de restricción. Los resultados obtenidos con 5 o 10 U de *Nsi*I, en un volumen final de reacción de 25 µl, fueron similares. Por lo tanto, se decidió emplear 5 U de la enzima en el protocolo final.

En la Figura 2 se observan las bandas obtenidas en el análisis electroforético de los productos de amplificación por PCR (líneas A y C) y de digestión con la enzima de restricción *Nsi*I (líneas B y D) a partir del ADN extraído de un individuo control (líneas A y B) y de otro previamente diagnosticado como portador de la mutación Val30Met (líneas C y D)¹³.

El tamaño de los fragmentos obtenidos en cada caso fue determinado mediante un marcador de número de pares de bases (M). Comparando las bandas de las líneas A y B puede observarse que el fragmento de 362 pb producto de la reacción de PCR no fue cortado por la enzima de restricción, indicando ausencia de la mutación puntual. En cambio, en la línea D aparecen dos fragmentos de 216 y 146 pb como productos de la digestión con *Nsi*I, demostrando la presencia de la sustitución G→A en el paciente con PAF tipo I. La coexistencia del fragmento de 362 pb con los de 216 y 146, demuestra que el individuo es heterocigota para la mutación Val30Met.

Una vez estandarizado el método y controlado frente a los respectivos controles positivo y negativo, fue apli-

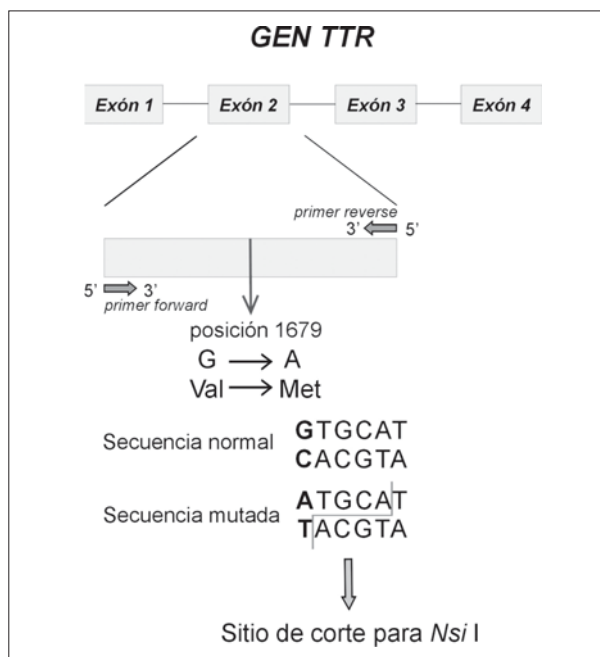


Fig. 1.— Esquema del gen TTR y detección de la mutación Val30Met.

El fragmento que comprende la secuencia de ADN en la que se produce la mutación característica de PAF tipo I, posición 1679, es amplificado por PCR.

Cuando se produce la mutación puntual, una G es reemplazada por una A, generando un sitio de corte reconocido por la enzima de restricción *Nsi* I. La secuencia normal no posee dicho sitio de corte.

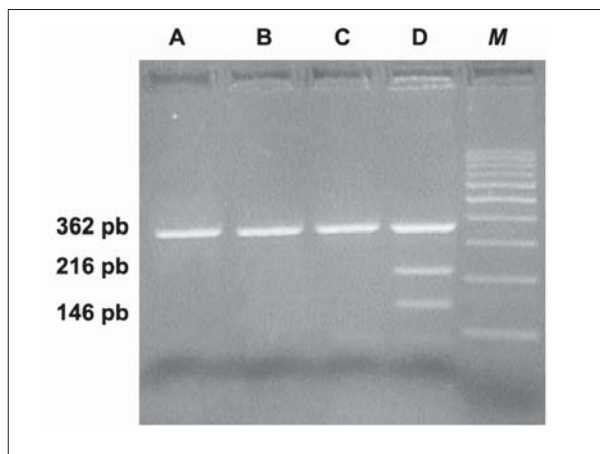


Fig. 2.— Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR y digestión con *Nsi* I.

Los productos de amplificación por PCR (líneas A y C) y posterior digestión con la enzima de restricción *Nsi* I (líneas B y D) del ADN de un individuo control negativo (líneas A y B) y de otro portador de la mutación Val30Met (líneas C y D), fueron analizados en gel de agarosa 2% conteniendo bromuro de etidio.

La digestión con *Nsi* I originó fragmentos de 216 y 146 pb en la muestra del portador de la mutación (línea D) mientras que no modificó el fragmento amplificado de 362 pb del control negativo (línea B).

cado al estudio de integrantes de grupos familiares con historia previa relacionada con PAF tipo I.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, en conjunto con los de los estudios previos realizados en Suecia¹³, permitieron construir las historias familiares de ambos grupos afectados con PAF tipo I, las cuales se esquematizan en la Figura 3 (A y B).

Los miembros de la Familia I (Figura 3A) son descendientes de una inmigrante portuguesa (JD) que tuvo manifestaciones clínicas de la enfermedad y falleció como consecuencia de la misma antes de que en nuestro país se empleara el trasplante hepático como tratamiento para PAF. Como se indica en la Figura, cinco de los miembros de la segunda generación habían sido diagnosticados previamente como portadores de la variante Val30Met. Cuatro de ellos (OD, ND, SD y MD), presentaron signos de PAF tipo I por lo que fueron sometidos a trasplante hepático. Con el objeto de utilizar la detección de la mutación Val30Met como marcador preclínico de la enfermedad, en nuestro laboratorio se estudiaron individuos jóvenes de esta familia para identificar a los portadores asintomáticos (PF, HF, RD, FD, MD, CD, AD, SD, DA y JA).

Entre los miembros de la Familia II (Figura 3B), se diagnosticó la mutación en el paciente que mostraba signos clínicos de PAF tipo I (HP), como así también en cinco de sus hermanos (JP, LA, JA, MA y RA) y en tres integrantes de la segunda generación (JG, MG y MV). Aunque no se dispone de información de la historia clínica de la madre, ya fallecida, ni de sus cónyuges, los resultados obtenidos en nuestro análisis sugieren el origen materno de la herencia de la mutación Val30Met.

Finalmente, la mutación fue también detectada en los otros dos pacientes analizados (JL y CA) de los cuales no existen al momento indicios que permitan establecer su parentesco con ninguno de los dos grupos familiares estudiados en el presente trabajo.

Discusión

La PAF es un tipo de amiloidosis hereditaria en la cual mutaciones en el gen que codifica para TTR producen alteración en la secuencia de la proteína¹. En su informe inicial, Costa *et al*² mostraron evidencias que permitían sugerir la asociación entre TTR y el componente principal de las fibrillas amiloides depositadas en tejidos de pacientes de origen portugués que presentaban signos de polineuropatía. Esa proteína fue identificada como una variante de TTR, en cuya estructura primaria un residuo valina en la posición 30 es reemplazado por metionina (TTR Val30Met)³². Si bien esta mutación en la TTR es la más frecuente entre los pacientes afectados de PAF, en la actualidad se conocen muchas otras variantes derivadas de distintas mutaciones puntuales en el gen TTR.

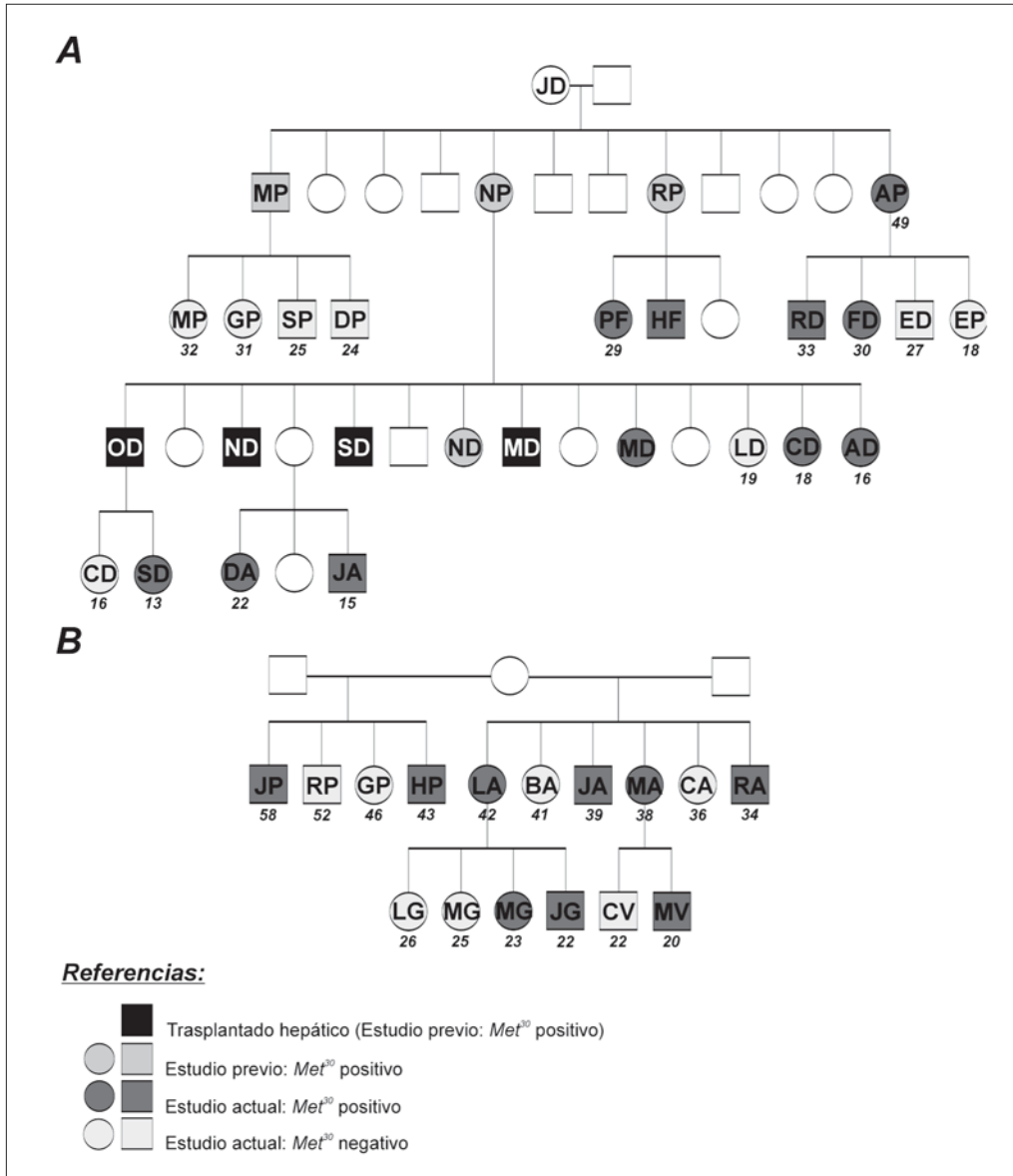


Fig. 3.- Historia familiar de amiloidosis portuguesa
 A: integrantes de la Familia I. B: integrantes de la Familia II.
 Los círculos indican sexo femenino y los cuadrados, masculino.
 JD presentó manifestaciones clínicas de PAF y falleció como consecuencia de la enfermedad sin habersele realizado el estudio genético.

El trasplante hepático como tratamiento definitivo para la PAF fue propuesto por Holmgren *et al* en 1991 como forma de detener la síntesis de TTR anormal²⁰. Tras el trasplante, se ha constatado un acusado descenso de la proteína mutada y, en general, una evolución favorable del cuadro clínico, con mejoría progresiva de las manifestaciones neurológicas y la función normal del injerto^{24, 33, 34}. Por lo tanto, es fundamental la identificación de individuos portadores de la mutación genética asociada a esta enfermedad antes de que se establezcan serias complicaciones neurológicas. El tratamiento está especialmente indica-

do en pacientes jóvenes, portadores de la variante más prevalente en nuestro país (TTR Val30Met), cuando aún presentan síntomas leves³⁵. Por esta razón, el objetivo de nuestro laboratorio fue desarrollar un método apropiado para detectar la mutación Val30Met.

Para investigar la presencia de variantes de TTR en sangre y tejidos han sido empleados diferentes métodos, basados en análisis por espectrometría de masa^{34, 36}, electroforesis^{37, 38} e *immunoblotting*³⁹. La técnica de ESI-MS (*electrospray ionization mass spectrometry*) permite determinar variantes de la proteína en base a las peque-

ñas diferencias de tamaño que presentan las isoformas de TTR. Esta metodología requiere de etapas previas para el aislamiento de la proteína. La TTR es aislada a partir de sangre por inmunoprecipitación, y el complejo antígeno-anticuerpo disociado por centrifugación a través de membranas de *cut off* definido³⁴, o bien la TTR es extraída de plasma empleando una resina de inmunofinidad³⁶. En otros trabajos, la TTR sérica nativa fue separada de varias isoformas mutadas por un procedimiento en dos etapas: electroforesis en gel de poliacrilamida nativo y posterior análisis de la banda correspondiente a la TTR por isoelectroforesis bajo condiciones parcialmente desnaturizantes³⁷. Altland et al³⁸ desarrollaron un método, basado en la técnica de isoelectroforesis, sensible a las diferencias de estabilidad de las formas tetramérica y monomérica de algunas variantes de TTR. De esta manera, resulta especialmente apropiado para estudiar mutaciones en las que las sustituciones son indetectables por técnicas de separación basadas en diferencias de carga eléctrica. Saraiva et al³⁹ identificaron la presencia de TTR Val30Met en suero mediante una secuencia de etapas que incluye aislamiento de la proteína por cromatografía, clivaje con bromuro de cianógeno e identificación de los péptidos resultantes por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (*SDS-PAGE*), electrotransferencia y reacción inmunológica empleando antisuero anti-TTR.

Por otra parte, las mutaciones del gen TTR han sido investigadas por análisis de ADN. Los ensayos están basados en la amplificación de regiones codificantes para la proteína empleando PCR y el análisis de los productos de digestión obtenidos con enzimas de restricción. En la metodología descrita por Nichols y Benson²⁸, el ADN genómico es obtenido a partir de leucocitos periféricos, requiriendo elevados volúmenes de sangre (30 ml).

El método optimizado en nuestro laboratorio permite detectar la presencia de la mutación Val30Met utilizando la técnica de PCR-RFLP. La fiabilidad, sencillez y rapidez en la obtención de los resultados, así como el requerimiento de pequeño volumen de sangre entera, hacen de esta técnica una herramienta apropiada para ser utilizada en procedimientos de *screening* en gran número de individuos. De esta manera, a través de estudios familiares, la variante TTR Val30Met puede constituir un marcador bioquímico diagnóstico de PAF en la etapa preclínica de la enfermedad.

El método desarrollado ofrece las siguientes ventajas con respecto a otros similares publicados: a) la extracción de ADN se realiza a partir de sangre entera anticoagulada y b) para el ensayo se emplea un pequeño volumen de muestra (500 µl), el cual provee una cantidad de ADN suficiente para repetir los análisis, o bien, para encarar el estudio de otras mutaciones. Esto hace

que la metodología resulte sencilla y rápida, dado que no se necesita el aislamiento previo de los leucocitos periféricos ni realizar pasos adicionales de purificación del material genético. Si bien este método es apropiado para el estudio de los miembros de familias en las que se conoce o sospecha una determinada mutación, puede ser aplicado para la detección de otras mutaciones si se emplea una batería de enzimas de restricción, tal como ha sido informado por otros autores^{28, 37}.

En la Argentina, se han identificado varios grupos familiares con antecedentes de PAF tipo I^{12, 13}, relacionados, en general, con inmigrantes portugueses. De hecho, en la Unidad de Trasplante Hepático del Hospital General de Agudos Dr. Cosme Argerich, los casos de polineuropatía amiloidótica familiar constituyen el 6% de todas las indicaciones de trasplante hepático⁴⁰. Algunos de esos pacientes habían sido diagnosticados como portadores de la mutación TTR Val30Met, estudios que fueron realizados en Suecia y EE.UU.¹³. La carencia de una metodología apropiada impidió que los individuos pertenecientes a sus grupos familiares pudieran tener un diagnóstico precoz y, así, acceder a un tratamiento de trasplante hepático temprano. De hecho, algunos miembros de la primer familia estudiada no pueden ser trasplantados actualmente debido al grado avanzado de la enfermedad. El impacto del presente estudio reside en la posibilidad de contar con un marcador preclínico de la enfermedad hasta ahora no desarrollado en nuestro país.

La técnica descrita posibilita resolver la necesidad diagnóstica en un importante número de miembros de la comunidad, número que continúa en aumento debido a la relativamente alta prevalencia de la PAF tipo I en Argentina.

Esto redundará en beneficio de los pacientes portadores de la mutación Val30Met, ya que el creciente riesgo que involucra el trasplante en individuos en estadios avanzados de la enfermedad, enfatiza la necesidad de realizar el trasplante en forma temprana, mientras la sintomatología es aún leve y el estado nutricional es satisfactorio.

En conclusión, podemos afirmar que el desarrollo de la metodología descrita para detectar la mutación Val30Met de la TTR, constituye un avance importante para el diagnóstico de la PAF tipo I, la amiloidosis de mayor prevalencia en la Argentina.

La identificación temprana de los portadores de esta mutación permite que estos individuos puedan acceder al trasplante hepático antes de que se establezcan serias complicaciones neurológicas. Por otra parte, se otorga a los familiares no portadores de la mutación la posibilidad de descartar el riesgo de desarrollar la enfermedad y/o transmitirla a sus descendientes. En ambos casos, se logra mejorar la calidad de vida de los miembros de la comunidad.

Bibliografía

1. Benson MD, Uemichi T. Transthyretin amyloidosis Review. *Int J Exp Clin Invest* 1996; 3: 44-56.
2. Costa PP, Figueira A, Bravo F. Amyloid fibril protein related to prealbumin familial amyloidotic polyneuropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 4499-503.
3. Branch WT, Robbins J, Edelhoch H. Thyroxine-binding prealbumin. *Arch Biochem Biophys* 1972; 152: 144-51.
4. Kanda Y, Goodman DS, Caufield RE, Morgan FJ. The amino acid sequence of human plasma prealbumin. *J Biol Chem* 1974; 249:6796-805.
5. Tsuzuki T, Mita S, Maeda S, Araki S, Shimada K. Structure of the human prealbumin gene. *J Biol Chem* 1985; 260: 12224-7.
6. Strahler JR, Rosenblum BB, Hanash SM. Identification and characterization of a human transthyretin variant. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 148: 471-7.
7. Fitch NJ, Akbari MT, Ramsden DB. An inherited non-amyloidogenic transthyretin variant, [Ser6]-TTR, with increased thyroxine-binding affinity, characterized by DNA sequencing. *J Endocrinol* 1991; 129: 309-313.
8. Ando Y, Nakamura M, Araki S. Transthyretin-related familial amyloidotic polyneuropathy. *Arch Neurol* 2005; 62: 1057-62.
9. Connors LH, Lim A, Prokaeva T, Roskens VA, Costello CE. Tabulation of human transthyretin (TTR) variants. *Amyloid* 2003; 10: 160-84.
10. Tawara S, Nakazato M, Kangawa K, Matsuo H, Araki S. Identification of amyloid prealbumin variant in familial amyloidotic polyneuropathy (Japanese type). *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 116: 880-8.
11. Shu-ichi Ikeda. Is familial amyloid polyneuropathy rare? DNA testing is changing the concept of this disease. *Neurology* 2007; 69: 627-8.
12. Lendoire J, Trigo P, Aziz H, et al. Liver transplantation in transthyretin familial amyloid polyneuropathy: first report from Argentina. *Amyloid* 1999; 6: 297-300.
13. Lendoire JC, Trigo P, Aziz H, et al. Variant transthyretin (TTR) amyloidosis in Argentina. Detection of the trait by electrospray ionization mass spectrometry of lyophilized TTR immunoprecipitate. *Scand J Clin Lab Invest* 1999; 59: 613-8.
14. Andrade C. A peculiar form of peripheral neuropathy. Familial atypical generalized amyloidosis with special involvement of peripheral nerves. *Brain* 1952; 75: 408-27.
15. Ikeda S, Hnayu N, Hongo M, et al. Hereditary generalized amyloidosis with polyneuropathy. Clinicopathological study of 65 Japanese patients. *Brain* 1987; 110: 315-47.
16. Cohen AS, Connors LH. The pathogenesis and biochemistry of amyloidosis. *J Pathol* 1987; 151: 1-10.
17. Trigo P, Lendoire J, Braslasky G, et al. Hallazgos clínicos en pacientes con Polineuropatía Amiloidótica Familiar tipo I por transtiretina, candidatos a trasplante hepático. *Acta Gastroenterol Latinoamer* 2000; 30 (supl.4): 308.
18. Lobato L. Portuguese-type amyloidosis (transthyretin amyloidosis, ATTR V30M). Review. *J Nephrol* 2003; 16: 438-42.
19. Green NS, Foss TR, Kelly JW. Genistein, a natural product from soy, is a potent inhibitor of transthyretin amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 14545-50.
20. Holmgren G, Steen L, Ekstedt J, et al. Biochemical effect of liver transplantation in two Swedish patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP, Met30). *Clin Genet* 1991; 40: 242-6.
21. Herlenius G, Wilczek HE, Larsson M, Ericzon G; Familial Amyloidotic Polyneuropathy World Transplant Registry. Ten years of international experience with liver transplantation for familial amyloidotic polyneuropathy: results from the familial amyloidotic polyneuropathy world transplant registry. *Transplantation* 2004; 77: 64-71.
22. Soprano DR, Herbert J, Soprano KJ, Schon EA, Goodman DS. Demonstration of transthyretin mRNA in the brain and other extrahepatic tissues in the rat. *J Biol Chem* 1985; 260: 11793-8.
23. Dickson PW, Aldred AR, Marley PD, Guo-Fen T, Howlett GJ, Schriber G. Prealbumin and transferrin mRNA levels in the coroid plexus of rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 127: 890-5.
24. Lewis WD, Skinner M. Liver transplantation for familial amyloidotic polyneuropathy: a potential curative treatment. *Int J Exp Clin Invest* 1994; 1: 143-4.
25. Amante M, Trigo P, Lendoire J, Inventarza O, Parisi C. Transthyretin familial amyloidotic polyneuropathy: histopathological study of the explanted livers. *Ann Hepatol* 2003; 2: 171-4.
26. Trigo P, Aziz H, Braslasky G, Scuzzuso F, Cueto G, Lendoire J. Evolución al año de los pacientes trasplantados por Polineuropatía Amiloidótica Familiar tipo I (PAF I). *Acta Gastroenterol Latinoam* 1998; 25 (supl. 5): 391.
27. Date Y, Nakazato M, Kangawa K, Shirieda K, Fujimoto T, Matsukura S. Detection of three transthyretin gene mutations in familial amyloidotic polyneuropathy by analysis of DNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *J Neurol Sci* 1997; 150: 143-8.
28. Nichols WC, Benson MD. Hereditary amyloidosis: detection of variant prealbumin genes by restriction enzyme analysis of amplified genomic DNA sequences. *Clin Gen* 1990; 37: 44-53.
29. Suhr O, Holmgren G, Steen L, et al. Liver transplantation in familial amyloidotic polyneuropathy: follow up of the first 20 Swedish patients. *Transplantation* 1995; 60: 933-8.
30. Al-Soud WA, Rådström P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 485-93.
31. Sambrook J, Russell D. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
32. Saraiva MJ, Costa P, Birken S, Goodman DS. Presence of an abnormal transthyretin (prealbumin) in Portuguese patients with familial amyloidotic polyneuropathy. *Trans Assoc Amer Phys* 1983; 96: 261-70.
33. López Andreu FR, Munar-Qués M, Parrilla P, et al. Trasplante hepático para el tratamiento de la polineuropatía amiloidótica familiar tipo I. *Med Clin (Barc)* 1993; 101: 581-3.
34. Ando Y, Ohlsson P-I, Suhr O, et al. A new simple and rapid screening method for variant transthyretin (TTR) related amyloidosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 228: 480-3.
35. Stangou AJ, Hawkins PN. Liver transplantation in transthyretin-related familial amyloid polyneuropathy. *Curr Opin Neurol* 2004; 17: 615-20.
36. Bergen HR, Zeldenrust SR, Butz ML, et al. Identification of transthyretin variants by sequential proteomic and genomic analysis. *Clin Chem* 2004; 50: 1544-1552.
37. Connors LH, Ericsson T, Skare J, Jones LA, Lewis WD, Skinner M. A simple screening test for variant transthyretins associated with familial transthyretin amyloidosis using isoelectric focusing. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1407: 185-92.

38. Altland K, Winter P, Sauerborn MK. Electrically neutral microheterogeneity of human plasma transthyretin (prealbumin) detected by isoelectric focusing in urea gradients. *Electrophoresis* 1999; 20: 1349-64.
39. Saraiva MJ, Costa PP, Goodman DS. Biochemical marker in familial amyloidotic polyneuropathy, Portuguese Type. Familial study on the Transthyretin (Prealbumin)-Methionine-30 Variant. *J Clin Invest* 1985; 76: 2171-7.
40. Trigo P, Aziz H, Lendoire J, et al. Trasplante hepático en adultos: casuística del Hospital Dr. Cosme Argerich. *Acta Gastroenterol Latinoam* 1998; 25: 394.

LA TAPA

Células nerviosas

Atlas de Histología de Sobotta (1901)

“Lámina 7”. (*Células nerviosas*)

“Figura 1.- *Dos células nerviosas multipolares aisladas de la médula del hombre.* Aumento, 160:1. Figura 2.- *Dos células nerviosas multipolares del inflamamiento lumbar de la médula de un niño, con masas tigroides.* Aumento, 180:1 Figuras 3 a 5.- *Tres células de un ganglio espinal del hombre.* Aumento, 420:1.”

Ilustración tomada de la primera traducción castellana del Atlas de Histología de Johannes Sobotta (1869-1945) publicado en 1901 (*Atlas und Grundriss der Histologie und Mikroskopischen Anatomie der Menschen*). Es un atlas con 80 láminas litográficas coloreadas y 68 figuras “en negro”; las litografías fueron “ejecutadas con el auxilio de más de treinta colores, é impresas con el mayor cuidado y exactitud”. “Las láminas han sido hechas en el establecimiento de *Fr. Reichhold* de Munich, por medio de la prensa rotatoria”. “Los dibujos originales para todas las figuras fueron ejecutados ejemplarmente con el mayor cuidado y exactitud por el señor *W. Freitag*, dibujante de la Universidad”. El método empleado, para casi todas las figuras, consistió en fotografiar las preparaciones y utilizar las fotografías como fundamento del dibujo. En el prólogo (5 páginas), fechado en Würzburg, noviembre de 1901, el autor expone los detalles de cómo se elaboró el libro. El Atlas tuvo numerosas ediciones y traducciones, mantiene el nombre de Sobotta en el título, sigue en prensa y en las librerías.