

Artículo original

Fibrosis quística: diagnóstico molecular en 93 pacientes argentinos y detección familiar de portadores. Impacto asistencial y proyección a nuevos avances terapéuticos

Molecular diagnosis of cystic fibrosis in 93 argentinean patients and detection of heterozygotes in affected families. Impact on health services and therapeutic advances

Dra. Ana M. Oller de Ramírez*, Téc. Lab. Addy Ghio*, Bioq. Myrna Melano de Botelli** y Dra. Raquel Dodelson de Kremer*

RESUMEN

Introducción. La fibrosis quística es una enfermedad autosómica recesiva causada por más de 1.500 mutaciones y variantes en el gen regulador de la conductancia transmembrana.

Objetivos. Establecer el espectro y frecuencia de mutaciones en este gen en pacientes argentinos. Detectar portadores en las familias involucradas.

Material y métodos. Se investigó en 91 pacientes, clínica y bioquímicamente confirmados con 2 pruebas de sudor positivas y en 2 adultos estériles. Se trabajó con 165 familiares. El diagnóstico molecular comprendió 3 etapas consecutivas: a) determinación de 29 mutaciones frecuentes; b) haplotipos por microsatélites; c) pesquisa completa del gen por análisis conformacional de hebra simple y electroforesis en gel de gradiente desnaturante con secuenciación de los patrones anormales. Determinado el genotipo de los pacientes, se investigó el estado de portador en los familiares.

Resultados. 1º Objetivo: Se identificaron 14 mutaciones, se detectaron otras 3 mutaciones y se caracterizaron otras 11 mutaciones, tres de ellas nuevas (p.G27R, c.622-2A>G, p.W277R). En total, se identificaron 28 mutaciones responsables del 90,3% de los alelos mutados, 14 con una frecuencia superior al 1%. 2º Objetivo: De 165 personas investigadas, 143 fueron portadores y 22 con genotipo normal.

Conclusiones. Este trabajo contribuyó a la caracterización molecular de pacientes con fenotipos clásicos y atípicos y a la detección de numerosos portadores. Las investigaciones fármaco-terapéuticas recientes se basan en el tipo de mutación. Por lo tanto, conocer las mutaciones de los pacientes (genotipo) tiene significativa importancia para la futura aplicación de terapias específicas.

Palabras clave: fibrosis quística, autosómica recesiva, gen CFTR, diagnóstico molecular, farmacogenética.

Summary

Introduction. The cystic fibrosis is an autosomal recessive disease caused by more than 1500 mutations and variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene.

Objectives. To establish the spectrum and frequency of mutations on this gene in Argentinean patients.

To detect heterozygotes in affected families.

Patients and methods. We investigated 91 clinical and biochemically confirmed patients with 2 elevated sweat tests and 2 sterile adults. We worked with 165 relatives. The molecular diagnosis was accomplished in 3 serial stages: a) determination of 29 frequent mutations; b) haplotypes for microsatellites; c) an extensive screening of gene through single strand conformation analysis and multiplex denaturing gradient gel electrophoresis with sequencing of abnormal patterns. Once patient's genotype was confirmed, we investigated the heterozygotes' state in the relatives.

Results. 1st Objective: Fourteen mutations were identified. Three more mutations were detected and other 11 mutations were characterized, 3 of them novel (p.G27R, c.622-2A>G, p.W277R). In total, we have identified 28 mutations responsible for 90.3% of the mutated alleles, 14 with a higher frequency than 1%. 2nd Objective: From 165 investigated people, 143 were confirmed as heterozygotes and with normal genotype 22.

Conclusions. This work contributed to the molecular characterization of patients with classic and atypical phenotypes and to the detection of great numbers of carriers. New pharmacological therapeutic investigations are based on the mutation type. Therefore, knowledge of patients, mutations (genotype) has significant importance for the future application of specific therapies.

Key words: cystic fibrosis, recessive autosomal, CFTR gene, molecular diagnosis, pharmacogenetic.

* Centro de Estudio de las Metabolopatías Congénitas, CEMECO, Cátedra de Clínica Pediátrica, Facultad de Ciencias Médicas, UNC, Hospital de Niños de la Santísima Trinidad.
** Fundación para el Bienestar del Niño, Programa de Asistencia a la Fibrosis Quística y Hospital de Niños de la Santísima Trinidad. Córdoba, Argentina.

Declaración de intereses: Investigación realizada con aportes de la Fundación para el Bienestar del Niño, Programa de Asistencia a la Fibrosis Quística, Córdoba, Argentina y de la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba, SECYT.

Correspondencia: Dra. Ana M. Oller de Ramírez. ramirezoller@gmail.com

Recibido: 31-10-07
Aceptado: 25-4-08

INTRODUCCIÓN

La fibrosis quística (FQ, MIM# 219700) es la enfermedad hereditaria autosómica recesiva más frecuente en la población mundial.^{1,2} Es multisistémica y afecta principalmente el páncreas y los pulmones. Las mutaciones en el gen regulador de la conductancia transmembrana (CFTR,

ABCC7, MIM# 602421) son responsables de la FQ clásica y de las presentaciones denominadas atípicas, como agenesia bilateral congénita de conductos deferentes (sigla en inglés "CBAVD"), pancreatitis idiopática crónica, bronquiectasias y otras.³⁻⁸ La "CBAVD" es un trastorno heterogéneo, pero en 70-85% de los casos hubo mutaciones en el gen CFTR.^{9,6}

En la provincia de Buenos Aires, los primeros estudios de pesquisa neonatal con tripsina inmunorreactiva elevada mostraron una incidencia de 1/6.573.¹⁰

Gen y proteína CFTR

El gen CFTR está constituido por 27 exones en el cromosoma 7q31.2 (www.genet.sickkids.on.ca/cftr/¹¹, Figura 1). Codifica para un ARNm de 6.5 Kb, traducido a una proteína de 1.480 aminoácidos, que actúa como canal de cloro regulador del transporte iónico a través de la membrana apical de las células epiteliales.¹² La proteína CFTR es un miembro de la familia de proteínas de membrana transportadoras con sitios de unión al ATP denominadas ABC (Figura 1).

Espectro de mutaciones

En la actualidad, se han identificado más de 1.500 cambios (mutaciones y polimorfismos) en el gen CFTR. La mutación más común a nivel mundial es una delección de fenilalanina en posición 508 (p.F508del, sigla anterior Δ F508). Sin embargo, las mutaciones comunes (p.F508del, p.G542X, p.G551D, p.N1303K, p.W1282X) han mostrado diferentes frecuencias entre distintos grupos étnicos y localizaciones geográficas.^{11,14} La mayoría de las restantes mutaciones son menos frecuentes y generalmente se limitan a una región geográfica o a la aparición familiar exclusiva.

Las mutaciones que provocan el cambio de un aminoácido por otro (en inglés "missense") representan un 41% de las mutaciones asociadas a enfermedad; las que provocan un codón de terminación prematuro (en inglés "nonsense"), un 10%; las inserciones o delecciones que causan un cambio en el marco de lectura (en inglés "frameshift"), un 18% y aquellas que alteran nucleótidos conservados en sitios de unión intrón-exón y afectan el procesamiento del pre-ARNm (en inglés "splicing"), un 13%.

Existen 3% de rearrreglos genómicos (grandes delecciones o inserciones) y otro 1% que afecta la zona promotora. Se han publicado datos sobre alrededor de un 14% de cambios neutros que no ocasionan enfermedad denominados polimorfismos.²

¿Mutación o polimorfismo?

Se puede predecir que las mutaciones "nonsense", "frameshift" o de "splicing" (en este caso, en secuencias altamente conservadas en los intrones) afectan al transcrito primario o a la síntesis de la proteína.^{15,16} Pero estimar la consecuencia de los cambios de un aminoácido por otro es más dificultoso, ya que pueden ocasionar enfermedad o tratarse de polimorfismos.

Demostrar que estos cambios son causal de enfermedad exige comprobar alguna de las siguientes consideraciones:

1. Evidencia de alteración de la función del CFTR (es decir estudios moleculares *in vitro* que demuestren que el cambio observado afecta a la función de la proteína).
2. Aminoácidos altamente conservados entre especies o diferentes miembros de la superfamilia ABC (por ende pueden considerarse críticos para la función de la proteína y concluir que se trata de una mutación).
3. Descripciones de múltiples mutaciones diferentes que afectan al mismo codón, lo cual sugiere que este aminoácido es esencial y se lo considera una mutación.
4. En general, la ausencia de una mutación específica en al menos 100 individuos sanos descarta la posibilidad de que se trate de un polimorfismo.
5. El análisis de la región codificante entera del gen permite demostrar que una sustitución de un aminoácido en particular es el único cambio en el gen.^{2,17}

Diagnóstico de FQ

El diagnóstico se basa en dos criterios: presencia de al menos una característica clínica y evidencia de disfunción del CFTR.^{18,2}

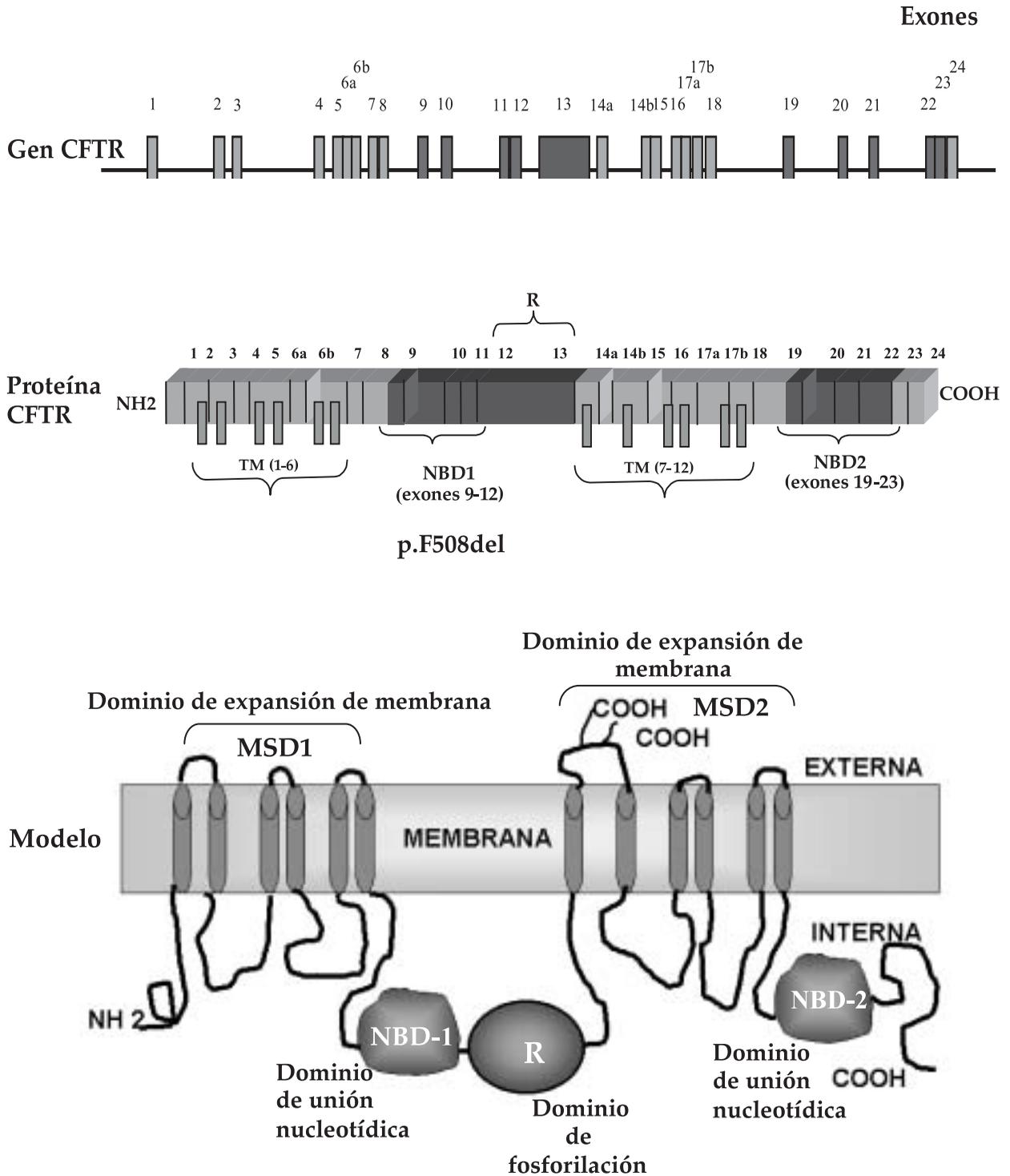
Características clínicas y criterios de sospecha

- Enfermedad sinusal y pulmonar crónica, infección o colonización persistente de vías aéreas con las bacterias habitualmente halladas.
- Alteraciones gastrointestinales y nutricionales: íleo meconial, insuficiencia pancreática exócrina, falla de crecimiento, cirrosis biliar focal.
- Síndrome de pérdida de sal.
- Azoospermia obstructiva.
- Antecedentes familiares.
- Pesquisa neonatal con resultado elevado.

Disfunción de CFTR:

- Dos prueba de sudor positivas (método de Gibson y Cooke),¹⁹

FIGURA 1. Gen CFTR y su síntesis proteica. Esta proteína presenta 5 dominios, 2 dominios de expansión de membrana (MSD 1 y 2), cada uno con 6 segmentos de transmembrana (TM 1-12) que forman el poro del canal; 2 dominios de unión al ATP (NBDs) y 1 dominio regulatorio de fosforilación (R) dependiente de AMPc.¹³



- o identificación de las 2 mutaciones en el gen CFTR,
- o diferencia de potencial de membrana anormal.

OBJETIVOS

- Analizar las mutaciones en el gen CFTR en 93 FQ no consanguíneos argentinos y determinar su frecuencia.
- Detectar o descartar portadores a nivel molecular en familias con diagnóstico de FQ.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población de estudio

1. Pacientes con clínica compatible y 2 pruebas de sudor positivas (91 pacientes índice); más dos adultos estériles: una mujer con valores límite de cloruros en sudor y un varón con fenotipo "CBAVD" con prueba de sudor normal.
2. Integrantes de las 93 familias: 165 personas.
Se trabajó con consentimientos informados aprobados por el Comité Institucional de Ética de Investigación en Salud, CIES, del Polo Hospitalario (Hospital de Niños de la Santísima Trinidad, Nuevo Hospital San Roque, Hospital Rawson).

Métodos

El diagnóstico molecular comprendió 3 etapas consecutivas: 1) Análisis de 29 mutaciones frecuentes, 2) haplotipos por microsatélites y politiminas, 3) pesquisa completa del gen mediante análisis conformacional de hebra simple (SSCA) y electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) con secuenciamiento de los patrones anormales.

Primera etapa

Se analizaron 29 mutaciones (p.F508del, p.N1303K, p.G542X, p.R334W, c.2789+5G>A, c.3659delC, p.W1282X, p.R553X, c.3849+10KbC>T, p.R1162X, c.621+1G>T, p.W1282X, p.R117H, c.1078delT, p.E60X, p.R347P, p.A455E, p.I507del, c.1717-1G>A, p.G551D, [c.2183A>G; c.2184delA], c.3120-1G>A, c.1898+1G>A, c.711+1G>T, p.G85E, p.R560T, p.D1152H y p.S1251N) por diferentes métodos. Las amplificaciones se realizaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), análisis de heterodúplex y amplificación múltiple del alelo mutado.^{20,21}

Segunda etapa

La detección de las mutaciones en los FQ con genotipos incompletos (un solo alelo identificado) y desconocidos (ninguno de los dos alelos detectados) se realizó mediante:

- 1) Análisis de dos microsatélites intragénicos, intrón 8 (IVS8CA) e intrón 17 (IVS17bTA) para definir el haplotipo. Análisis de la existencia de asociación de cada haplotipo a una mutación determinada.²²

Se realizó PCR múltiple y genotipificación en un secuenciador ABI 377. Comprobación de mutaciones específicas mediante PCR/digestión enzimática.²³

- 2) Análisis de la región polimórfica IVS 8-6 (T)_n y posterior secuenciación de las muestras con 5T o variantes.

Se realizó PCR y posteriormente DGGE a 60 °C durante 5 h a 170 V.

Tercera etapa

Se pesquisarón cada uno de los 27 exones del gen en los FQ con genotipos incompletos y desconocidos a través de SSCA en 13 exones²⁴ y por DGGE en los otros 14 exones.²⁵

SSCA: Se realizó PCR en los exones: 1, 2, 4, 6a, 6b, 7, 10, 13, 16, 17a, 19, 22 y 24. Se desnaturizaron las muestras a 98 °C. La electroforesis se realizó a 15°C en geles de acrilamida al 12,5%. Los fragmentos de ADN se visualizaron con tinción argéntica.²⁴

DGGE: Se realizó PCR para las multiplex: A (exones 11, 14b, 17bi), B (exones 14a, 15, 20), C (exones 3, 12, 23), E (exones 5, 8, 18) y por separado los exones 9 y 21. La electroforesis se realizó durante 5 h a 170 V. Los fragmentos de ADN se visualizaron con bromuro de etidio.²⁵

RESULTADOS

Respuesta al primer objetivo

Primera etapa

Análisis de 29 mutaciones frecuentes

Entre los 91 pacientes con FQ clásica se detectaron 13 mutaciones: p.F508del, p.N1303K, p.G542X, p.R334W, c.2789+5G>A, p.G85E, c.3659delC, c.1898+1G>A, p.R553X, p.R1162X, c.621+1G>T, c.711+1G>T, c.3120+1G>T). En los 2 pacientes con FQ atípica se identificaron en el varón un alelo con p.F508del y en la mujer un alelo con c.3849+10KbC>T; ambos, quedaron con genotipos incompletos. Entre los 93 pacientes estudiados, se caracterizó el genotipo completo (dos alelos conocidos) en 59 pacientes (63,44%); el genotipo incompleto en 31 (33,33%) y hubo un genotipo desconocido en 3 (3,23%), detectándose 14 mutaciones en total en esta etapa.

Segunda etapa

Se prosiguió el estudio de los 34 pacientes con FQ y genotipos incompletos y desconocidos a través de:

1) Análisis de microsatélites intragénicos

En función de los haplotipos obtenidos, se estudiaron las siguientes mutaciones: p.R1066C, c.2869insG, CFTRdele2.3 (g.24291_29180del21kb) y c.1811+1,6KbA>G, y se detectó esta última.²²

2) Análisis de la región polimórfica IVS 8-6 (T)_n

Se encontraron 9 pacientes homocigotas (7/7 o 9/9) y 25 heterocigotas (23 con 7/9, uno con 5/9 y otro con 3/7). Los dos últimos se secuenciaron para confirmar el patrón observado. Estas muestras correspondieron a los pacientes FQ atípicos, siendo el primero, un hombre estéril, el cual presentó el alelo 5T 12TG, genotipo p.F508del 9T 10TG/5T 12TG; el segundo, una mujer estéril que presentó un cambio TG en el alelo 5T (TTTGT, hallazgo previamente no descrito), genotipo c.3849+10KbC>T/5T(TTTGT).

Tercera etapa

Pesquisa de los 27 exones del gen CFTR

La conjunción de los datos de la 1ª y 2ª etapa permitió determinar que, en los 34 pacientes FQ, se pudo completar su genotipo en 3. Por lo tanto, se prosiguió con los otros 31 pacientes FQ. Se identificaron otras 11 mutaciones, de las cuales, 3 fueron nuevas: 2 "missense" (p.G27R y P.W277R) y una de "splicing" (c.622-2A>G).²⁶

En total, hemos identificado 28 mutaciones responsables del 90,3% de los alelos mutados. Las mutaciones detectadas y sus frecuencias se observan en la *Tabla 1*.

De los 93 pacientes con FQ, se caracterizó el genotipo completo en 76 (81,72%), genotipo incompleto en 16 (17,20%) y genotipo desconocido en 1 (1,08%). *Tabla 2*.

Respuesta al segundo objetivo

Una vez determinado el genotipo completo de cada paciente índice se puede confirmar o descartar portadores en la familia. En aquellas en donde el paciente presenta un genotipo incompleto se analizó la presencia de la mutación conocida o el haplotipo.

De 165 personas analizadas, se confirmaron 143 portadores (entre heterocigotas obligados y detectados) y 22 personas con genotipo normal.

DISCUSIÓN

Se realizó el análisis molecular a 93 pacientes con FQ no consanguíneos de Córdoba y de las regiones centro y norte de Argentina, pertenecientes a las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán, Catamarca, Santiago del Estero, Santa Fe, La Rioja, San Juan, San Luis y Mendoza. Este trabajo permitió

incrementar la definición del genotipo completo de 63,44 a 81,72%, de genotipos incompletos de 33,33 a 17,20% y de genotipo desconocido de 3,23 a 1,08%. El análisis del gen CFTR en nuestra población posibilitó la caracterización del 90,3% de los alelos mutados mediante la identificación de 28 mutaciones. Además de p.F508del, otras 13 presentaron frecuencias mayores al 1% y fueron responsables del 83,3% de los alelos FQ y, hasta ahora, otras 14 fueron privativas ya que se encontraron en una sola familia.

En la Argentina se han comunicado 67 mutaciones, 28 de este estudio²⁶ y 39 de otro grupo,²⁷ y en nuestra población hubo 52 mutaciones diferen-

TABLA 1. Espectro y frecuencia de mutaciones en 93 pacientes con fibrosis quística

| Mutación | Exón/Intrón | Alelos FQ | % |
|----------------------|------------------|-----------|------|
| p.F508del | Exón 10 | 111 | 59,7 |
| p.N1303K | Exón 21 | 10 | 5,4 |
| p.G542X | Exón 11 | 8 | 4,3 |
| p.R334W | Exón 7 | 3 | 1,7 |
| p.R1066C | Exón 17b | 3 | 1,7 |
| c.2789+5G>A | Intrón 14b | 3 | 1,7 |
| p.G85E | Exón 3 | 2 | 1,1 |
| c.3659del C | Exón 19 | 2 | 1,1 |
| c.1811+1.6kbA>G | Intrón 11 | 2 | 1,1 |
| c.1898+1G>A | Intrón 12 | 2 | 1,1 |
| c.3272-26A>G | Intrón 17a | 2 | 1,1 |
| p.S589I | Exón 12 | 2 | 1,1 |
| p.R553X | Exón 11 | 2 | 1,1 |
| IVS8-5T | Intrón 8 | 2 | 1,1 |
| c.3849+10kb C>T | Intrón 19 | 1 | 0,5 |
| c.621+1G>T | Intrón 4 | 1 | 0,5 |
| p.R1162X | Exón 19 | 1 | 0,5 |
| c.711+1G>T | Intrón 5 | 1 | 0,5 |
| c.3120+1G>A | Intrón 16 | 1 | 0,5 |
| p.Y913C | Exón 15 | 1 | 0,5 |
| c.4005+1G>A | Intrón 20 | 1 | 0,5 |
| p.W1089X | Exón 17b | 1 | 0,5 |
| p.R1283M | Exón 20 | 1 | 0,5 |
| p.W1282X | Exón 20 | 1 | 0,5 |
| p.G27R | Exón 2 | 1 | 0,5 |
| c.622-2A>G | Intrón 4 | 1 | 0,5 |
| p.W277R | Exón 6b | 1 | 0,5 |
| [c.3199del6;p.I148T] | Exón 17a, Exón 4 | 1 | 0,5 |
| Alelos desconocidos | | 18 | 9,7 |

tes. Por lo tanto, es importante destacar la gran variabilidad en el espectro y la frecuencia de las mutaciones en el mismo país. Asimismo, corresponde enfatizar que se describieron 11 nuevas mutaciones (3 de Córdoba y 8 de Buenos Aires)

TABLA 2. Genotipos detectados en los 93 pacientes con fibrosis quística

| Genotipo completo (2 alelos identificados) | n | % |
|--|----|-------|
| Homocigotas mutados | | |
| p.F508del | 30 | 36,5 |
| p.N1303K | 1 | |
| p.G542X | 1 | |
| p.S589I | 1 | |
| c.3272-26 A>G | 1 | |
| Heterocigotas compuestos por p.F508del + otra | | |
| p.F508del/p.N1303K | 7 | 81,72 |
| p.F508del/p.G542X | 3 | |
| p.F508del/p.R334W | 3 | |
| p.F508del/c.2789+5G>A | 3 | |
| p.F508del/p.R1066C | 2 | |
| p.F508del/c.3659delC | 2 | |
| p.F508del/c.1811+1.6 KbA>G | 2 | |
| p.F508del/c.1898+1G>A | 2 | |
| p.F508del/p.G85E | 2 | |
| p.F508del/IVS8-5T | 1 | |
| p.F508del/c.4005+1G>A | 1 | |
| p.F508del/c.3120+1G>A | 1 | |
| p.F508del/p.W1089X | 1 | |
| p.F508del/p.Y913C | 1 | |
| p.F508del/p.R553X | 1 | |
| p.F508del/p.W277R | 1 | |
| p.F508del/c.622-2A>G | 1 | |
| p.F508del/p.G27R | 1 | |
| p.F508del/p.W1282X | 1 | |
| Heterocigotas compuestos por 2 otras mutaciones | | |
| p.R1162X/c.621+1G>T | 1 | 6,45 |
| p.N1303K/p.R1066C | 1 | |
| p.R1283M/c.711+1G>T | 1 | |
| p.G542X/[c.3199del6; I148T] | 1 | |
| c.3849+10 Kb C>T/ IVS8-5T | 1 | |
| p.G542X/p.R553X | 1 | |
| Genotipo incompleto (1 alelo conocido) | | |
| p.F508del | 15 | 17,2 |
| p.G542X | 1 | |
| Genotipo desconocido (ningún alelo conocido) | | |
| ¿/? | 1 | 1,08 |

que aportaron un 21,1% de alelos nativos.²⁶⁻²⁸ Estos hallazgos pueden deberse a que la Argentina posee una población heterogénea: autóctona (diferentes tribus de nativos) e inmigrantes (de Europa y Medio Oriente).²⁶

Diagnóstico molecular

¿Pueden existir 3 o 4 cambios en el mismo gen en una misma persona? ¿Cuáles podrían ser sus implicancias?

Muchos cambios de ADN en el gen CFRT han sido interpretados como mutaciones que provocan enfermedad o como polimorfismos. Incluso determinadas mutaciones fueron caracterizadas según su efecto sobre la expresión fenotípica como graves o leves.

Pero, ¿estos conceptos son modificables? Por ejemplo, ¿la mutación "missense" p.I148T causa FQ? Inicialmente, p.I148T se detectó en un paciente con insuficiencia pancreática, que se consideró como una mutación grave y la segunda más frecuente en la población franco-canadiense.¹¹ En la actualidad, se halló más de 100 veces en la detección selectiva de portadores y en individuos sanos junto con una mutación grave.^{29,30}

La comunicación de la existencia de alelos complejos (varios cambios en el mismo gen) es cada vez más frecuente y se trata de un fenómeno que afecta la expresión fenotípica de la enfermedad.

Se demostró que p.I148T se asocia con un fenotipo FQ solamente como un alelo complejo; es decir, cuando coexiste con otra mutación en el mismo alelo; en consecuencia, ahora se la considera un polimorfismo.^{17,29} Estos estudios tienen implicancias para el asesoramiento genético de pacientes y de parejas caracterizadas con p.I148T, en quienes se tendrá que realizar la búsqueda de la mutación causal de la enfermedad.¹⁷

En nuestra población se detectó un paciente con el genotipo p.G542X/[p.I148T;c.3199del6]. Este paciente fue caracterizado con 2 mutaciones graves, en un alelo la p.G542X y en el otro la presencia de un alelo complejo, donde c.3199del6 es la mutación responsable de la enfermedad.

¿Un mismo cambio puede variar su comportamiento según con quién se asocie?

Un ejemplo muy conocido es el "splicing" alternativo, que provoca transcritos con eliminación del exón 9 según la cantidad de timinas en el intrón 8 (5T, 7T o 9T). Los alelos 7T y 9T se consideran normales, mientras que el alelo 5T provoca mayor cantidad de RNAm anormales y produce niveles bajos de proteína. El transcripto sin exón 9 no produce un canal funcional. En la población nor-

mal, el 5T se considera un polimorfismo, mientras que en las personas con el fenotipo "CBAVD" es una mutación leve, la más común de este grupo. Por otro lado, en la población con FQ, el alelo 5T puede afectar la gravedad del fenotipo cuando se asocia con la mutación p.R117H.³¹

Genotipos CFTR en pacientes con prueba de sudor en valores intermedios o normales

¿Qué sucede cuando la prueba del sudor presenta resultados intermedios en personas con algunas de las características de FQ con suficiencia pancreática exócrina? ¿Puede esta prueba presentar resultados normales con fenotipo FQ atípico?

La prueba del sudor es la herramienta diagnóstica de la FQ; las concentraciones de cloruros o cloruros y sodio mayores a 60 mmol/L (aproximadamente el 98% de los afectados) son patológicas.³² Sin embargo, se han observado valores intermedios (40-60 mmol/L) o incluso normales (<40 mmol/L), en pacientes con suficiencia pancreática exócrina con uno o pocos síntomas clínicos típicos asociados a FQ y dos alelos mutados en el gen CFTR. Las mutaciones más comúnmente detectadas fueron c.3849+10KbC>T, p.R117H, p.G551S, p.A455E, p.L206W, c.3272-26A>G, p.D1152H, IVS8-5T, junto con una mutación grave. Estos hallazgos preanuncian la posible detección de otras mutaciones.

Los síntomas de los pacientes fueron 2-3 de los siguientes: tripsina neonatal elevada, colonización con *Pseudomonas*, bronquiectasias, síntomas pulmonares, insuficiencia pancreática. La edad fue variable (desde meses hasta más de 50 años).^{33,34} En consecuencia, la identificación de mutaciones en este gen se torna crucial para un correcto diagnóstico y asesoramiento genético.³³ Si se hallan dos mutaciones se confirma el diagnóstico de FQ, o un fenotipo "CBAVD" o incluso otros fenotipos atípicos.^{2,7,8}

Pero se torna difícil cuando existe clínica compatible y se detecta una sola mutación, lo que puede deberse a la gran heterogeneidad molecular y a la pesquisa exclusiva de las mutaciones más frecuentes. En estos casos es necesario realizar un análisis exhaustivo del gen CFTR.² Otro trabajo informa que el criterio clínico continuará siendo esencial en estos pacientes aún sin definición.³⁵

En dos adultos estériles de nuestra población se detectaron los siguientes valores de cloruros en pruebas del sudor: normales, en un hombre con fenotipo "CBAVD" y genotipo p.F508del/5T e intermedios en una mujer con genotipo c.3849+10kbC>T/5T.

Avances farmacoterapéuticos

El mejor entendimiento de las bases moleculares y la fisiopatogenia de la enfermedad ha estimulado nuevos intentos terapéuticos, como el reemplazo génico y otras terapias alternativas. El objetivo central de estos trabajos es corregir, al menos parcialmente, la función anormal de la proteína mutada.

Se ha demostrado, a través de numerosos ejemplos, la existencia de un umbral mínimo necesario para mantener un fenotipo clínico normal. Pequeñas cantidades de proteína son suficientes para una función normal del canal; un hecho con implicancias significativas para el manejo terapéutico diseñado para restablecer la función del CFTR.²

Mecanismo molecular de la disfunción en el CFTR

Actualmente, las mutaciones se clasifican en 4 grupos que se ilustran en la Figura 2.^{2,36}

Mutaciones Clase I: Producción reducida o deficiente de proteína

Las mutaciones "nonsense" y "frameshift" resultan en una producción nula, mientras que algunas de "splicing" presentan un porcentaje de transcritos normales.

Ciertos antibióticos aminoglucósidos, por ejemplo gentamicina, serían capaces de suprimir mutaciones "nonsense" permitiendo la producción de una proteína funcional. Estudios *in vitro* demostraron que la gentamicina permitió la producción de proteína (dosis-dependiente) en las células epiteliales bronquiales de pacientes con FQ. Se están comenzando ensayos en seres humanos.^{36,37}

Mutaciones Clase II: Procesamiento defectuoso de la proteína

Varias mutaciones, como p.F508del y p.N1303K, causan un error en el plegamiento durante la biosíntesis y no permiten el transporte hacia la membrana celular.

Un ejemplo paradigmático de alelos complejos son las mutaciones supresoras p.R553M, p.R553Q y p.R555K, que permiten que la p.F508del escape del retículo endoplasmático y genere actividad del canal de Cl.^{17,2}

Por lo tanto, existe un significativo interés en desarrollar chaperonas químicas que permitan el transporte hacia la superficie celular generando una proteína funcional. Se han probado compuestos que mejoran la biosíntesis *in vitro* y en ensayos en seres humanos.^{2,38}

Mutaciones Clase III/IV:

Regulación o conducción defectuosa

Este tipo de mutaciones incluyen proteínas que son sintetizadas y correctamente transportadas a la membrana celular, pero no responden a la estimulación con AMPc y otras que generan una corriente de Cl⁻ reducida.

Se han realizado varios intentos para aumentar la actividad de la proteína mutada presente en la membrana apical; por ejemplo, aumentar los niveles del AMPc mediante la administración de un inhibidor de la fosfodiesterasa. Todavía no se han realizado ensayos en seres humanos. Otros estudios intentan activar los canales de Cl⁻ alternativos con nucleótidos trifosfato. Se han realizado ensayos en seres humanos con aplicación nasal directa de UTP más amiloride, que corrigieron en forma parcial y por corto tiempo la anomalía del transporte de Cl⁻.^{2,31}

Mutaciones que afectan la estabilidad proteica

Los últimos 70-98 aminoácidos en el C-terminal le otorgan estabilidad a la proteína. Ejemplos son la

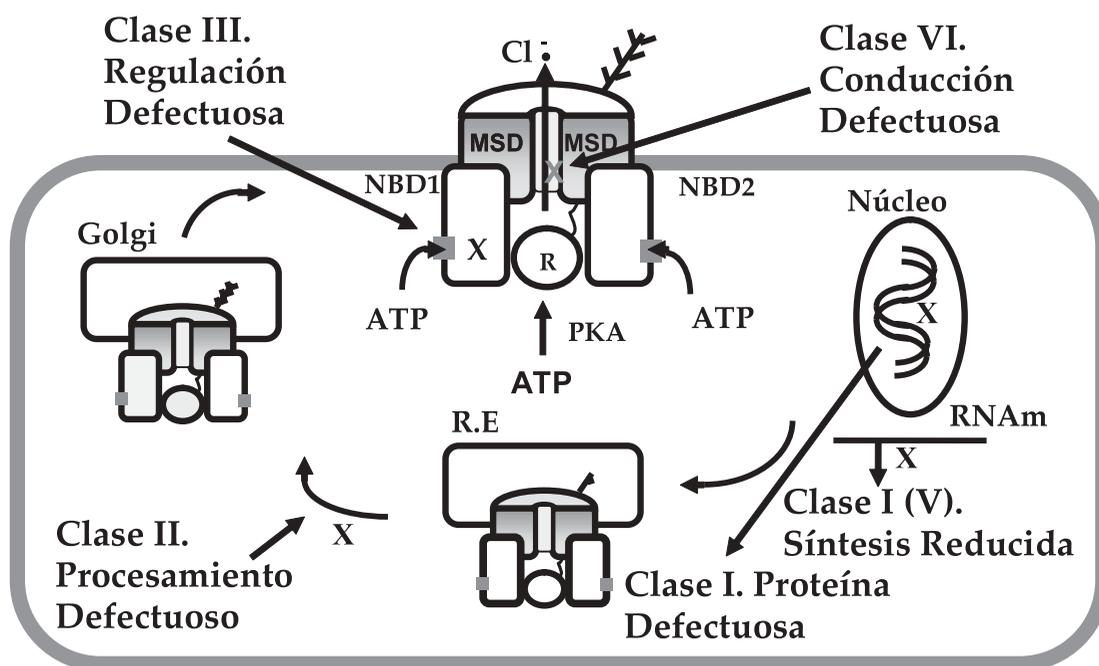
mutación de stop p.Q1412X que carece de los últimos 70 aminoácidos y las mutaciones "frameshifts" resultantes de las deleciones individuales de los aminoácidos 81, 97 y 101 en el C-terminal.³⁶

Esta discusión se puede resumir en las siguientes consideraciones:

A partir de los ejemplos mencionados se puede deducir lo complejo que resulta interpretar un hallazgo molecular:

- Poder definir si un cambio en el ADN es la mutación responsable del fenotipo observado en el paciente o si es un cambio neutro o se trata de un polimorfismo.
- Si es una mutación asociada al fenotipo clásico de FQ o a fenotipos atípicos como "CBAVD".
- Analizar si un cambio, mutación o polimorfismo solo puede tener un efecto o si en conjunción con otro puede expresarse diferente: efecto potenciador o supresor de las manifestaciones fenotípicas del paciente.
- En ocasiones, el efecto que provocan determinadas mutaciones puede correlacionarse con

FIGURA 2. Diagrama de la biosíntesis y mecanismo por el cual las mutaciones alteran la función de la proteína CFTR



MSDs: Dominios de expansión de membrana; NBD1 y 2: Dominios de unión nucleotídica; R: Dominio de fosforilación. PKA: proteinquinasa dependiente de AMPc. RE: Retículo endoplásmico.^{36,39}

el fenotipo, caracterizando algunas mutaciones como graves y otras como leves; en otros casos, no puede asociarse a ningún fenotipo en particular.

- Estos hallazgos permiten avanzar en el entendimiento de la multiplicidad de variaciones genómicas que producen la variabilidad fenotípica intrafamiliar, que también se relaciona con la existencia de uno o varios genes modificadores y polimorfismos en otros genes.
- Un mejor conocimiento sobre los mecanismos moleculares y la patogenia de la enfermedad estimuló nuevos intentos terapéuticos farmacológicos según el tipo de mutación. En consecuencia, la genotipificación de los pacientes reviste una significativa importancia para la futura aplicación de terapéuticas específicas.

CONCLUSIONES

- La identificación de numerosas mutaciones, diferentes en su naturaleza y frecuencia entre los distintos lugares de la Argentina, demuestra la gran heterogeneidad de nuestra población, probablemente debida a su constitución: población nativa e inmigrantes principalmente de España, Italia y, en menor proporción, de Europa del Este.
- El nivel de detección del 90,3% de mutaciones en la región de Córdoba y Centro-Norte de nuestro país fue la más alta registrada y permitió definir el genotipo en un número significativo de pacientes.
- Las 3 nuevas mutaciones identificadas fueron detectadas en pacientes con fenotipo grave.
- La demostración de 2 mutaciones en personas con fenotipos atípicos (varones con "CBAVD" y afectados con uno o pocos síntomas, generalmente con suficiencia pancreática) y con valores de cloruros en sudor intermedios o normales, reafirma la necesidad de considerar el análisis molecular como una herramienta diagnóstica.
- El análisis molecular es la única metodología que permite la confirmación o exclusión del estado de heterocigota (portador sano) en los miembros de las familias involucradas.
- Es importante tener en cuenta que a partir del diagnóstico de fibrosis quística se puede realizar un asesoramiento genético adecuado debido a las implicancias familiares, sociales, económicas y la existencia de posibles proyecciones terapéuticas significativas que conllevarían a una medicina específica y más individualizada.

Agradecimientos

Se agradece a: Dr. Carlos Rezzónico y Dr. Ricardo Piñero; Dra. Inés Marques, Dra. Silvia Pereyro; Dra. Caroline Riga, Dr. Joaquín Kohn y Dra. Verónica Petri; Dr. Alberto Nevado; Dr. José Olmedo; Dra. Andrea Chirino Misisian, Dra. Claudia Bogado; Dr. Otmar Bertero; Dra. Alejandra Visich; Lic. Germán Galaverna; Dra. Andrea Tfanche; Dra. Griselda Ray, Dra. Graciela Maíz, Dra. María Maza de Funes y Dr. Leandro Di Yacovo; Dra. Ruth Goñi; Dr. Fernando Salgado, Dra. Yolanda Carolina López y Dra. Gladys Villarreal; Dr. José Pérez Alzaa; Dr. Andrés Juárez Villanueva y Dr. Gustavo Gallardo.

Este trabajo obtuvo el Primer Premio en el Concurso Nacional Bianual "Premio: Fundación-FQ", año 2005, organizado por la Fundación para el Bienestar del Niño, Programa de Asistencia a la FQ, Córdoba. Se encuentra a disposición el trabajo original. ■

BIBLIOGRAFÍA

1. Welsh MJ, Tsui L-C, Boat TF, Beaudet AL. Cystic fibrosis. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Nueva York: Mc Graw-Hill; 1995: Págs. 3799-3876.
2. Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR. Cystic fibrosis. En: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs, Kinzler Vogelstein, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Nueva York: Mc Graw-Hill; 2001: Págs. 5121-5188.
3. Dean M, Santis G. Heterogeneity in the severity of cystic fibrosis and the role of CFTR gene mutations. *Hum Genet* 1994; 93:364-368.
4. Zielenski J, Tsui L-C. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Ann Rev Genet* 1995; 29:777-807.
5. Estivill X. Complexity in a monogenic disease. *Nat Genet* 1996; 12:348-350.
6. Casals T, Bassas L, Egozcue S, et al. Heterogeneity for mutations in the CFTR gene and clinical correlations in patients with congenital absence of the vas deferens. *Hum Reprod* 2000; 15(7):1476-1483.
7. Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, et al. Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *N Engl J Med* 1998; 339:653.
8. Cuppens H, Lin W, Jaspers M, et al. Polyvariant Mutant Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Genes. The Polymorphic (TG)_m Locus Explains the Partial Penetrance of the T5 Polymorphism as a Disease Mutation. *J Clin Invest* 1998; 101(2): 487-496.
9. Chillón M, Casals T, Mercier B, et al. Mutations in the Cystic Fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 1995; 332:1475-1480.
10. Borrajo GJC, Adam MM, Castillo PI, et al. Screening neonatal de fibrosis quística. Experiencia en más de 100.000 neonatos estudiados. IX Congreso Latinoamericano de Fibrosis Quística. 24-27 de Noviembre de 1999. Buenos Aires: Sociedad Argentina de Pediatría 1999; 83.
11. The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (CFGAC). Population variation of common cystic fibrosis mutations.

- Hum Mutat* 1994; 4: 167-177. Disponible en <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>. [Consultado: 11-7-08].
12. Morales Pérez P, Fernández Soria VM. Identificación, estructura y expresión del gen CFTR. En: Salcedo Posadas A, García Novo A. (eds.). *Fibrosis Quística*. Madrid: PC Works SL; 1997. Págs. 11-25.
 13. Tsui L-C, Buchwald M. Biochemical and molecular genetics of cystic fibrosis. En: Harris H, Hirschhorn K, eds. *Advances in Human Genetics*. Nueva York: Plenum; 1991. Pág. 153.
 14. Estivill X, Bancells C, Ramos C. Geographic distribution and regional origin of 272 Cystic Fibrosis Mutations in European Populations. Biomed CF Mutation Analysis Consortium. *Hum Mutat* 1997; 10: 135-154.
 15. Hamosh A, Trapnell BC, Zeitlin PL, et al. Severe deficiency of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator messenger RNA carrying nonsense mutations R553X and W1316X in respiratory epithelial cells of patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest* 1991; 88:1880.
 16. Krawczak M, Reiss J, Cooper DN. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet* 1992; 90:41.
 17. Claustres M, Altiéri JP, Guittard C, et al. Are p.I148T, p.R74W and p.D1270N cystic fibrosis causing mutations? *BMC Med Genet* 2004; 5: 19-25.
 18. Segal E, Grenoville M, Macri CN, et al. Consenso de Fibrosis Quística. *Arch Argent Pediatr* 1999; 97(3): 188-224.
 19. Gibson LE, Cooke RE. A test for the concentration of electrolytes in sweat in Cystic Fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 1959; 23: 545-9.
 20. Campbell PW, Philips JA, Krishnamani MR. Cystic Fibrosis: Relationship between clinical status and DF508 deletion. *J Pediatr* 1991; 118: 238-241.
 21. Ferrie RM, Schwarz MJ, Robertson NH, et al. Development, multiplexing, and application of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene. *Am J Hum Genet* 1992; 51:251-62.
 22. Morral N, Dörk T, Llevadot R, et al. Haplotype analysis of 94 Cystic Fibrosis with seven polymorphic CFTR DNA markers. *Hum Mutat* 1996; 8:149-159. (erratum 8:295-296).
 23. Casals T, Ramos MD, Giménez J, et al. High heterogeneity for cystic fibrosis in Spanish families: 75 mutations account for 90% of chromosomes. *Hum Genet* 1997; 101:365-370.
 24. Chillón M, Casals T, Giménez J, et al. Analysis of the CFTR gene in the Spanish population: SSCP-Screening for 60 known mutations and identification of four new mutations (Q30X, A120T, 1812-1G-A and 3667del4). *Hum Mutat* 1994; 3: 223-230.
 25. Costes B, Fanen P, Goossens M, Ghanem N A rapid, efficient, and sensitive assay for simultaneous detection of multiplex cystic fibrosis mutations. *Hum Mutat* 1993; 2: 185-191.
 26. Oller-Ramírez AM, Ramos MD, Jimenez J, et al. Mutational spectrum of cystic fibrosis patients from Cordoba province and its zone of influence: implications of molecular diagnosis in Argentina. *Mol Genet Metab* 2006; 87(4): 370-5.
 27. Visich A, Zielenski J, Castañón C, et al. Complete screening of the CFTR in Argentine cystic fibrosis patients. *Clin Genet* 2002; 61: 207-213.
 28. Bienvenu T, Chertkoff L, Beldjord C, et al. Identification of three novel mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in Argentinian CF patients. *Hum Mutat* 1996; 7: 376-377.
 29. Rohlfes EM, Zhou Z, Sugarman EA, et al. The I148T CFTR allele occurs on multiple haplotypes: a complex allele is associated with cystic fibrosis. *Genet Med* 2002; 4: 319-323.
 30. Rohlfes EM, Sugarman EA, Heim RA, Allitto BA. Frequency of carriers of two cystic fibrosis mutations in an apparently unaffected adult population. *Genet Med* 2001; 3:237.
 31. Knowles MR, Clarke LL, Boucher RC. Activation of extracellular nucleotides of chloride secretion in the airway epithelia of patients with CF. *N Engl J Med* 1999; 325: 533.
 32. Legrys VA, Rosentein BJ, Doumas BT, et al. Sweat testing: sample collection and quantitative analysis approved guidelines. *NCCLS. USA* 2000; C34-A2.
 33. Feldmann D, Couderc R, Audrezet MP, et al. CFTR genotypes in patients with normal or borderline sweat chloride levels. *Hum Mutat* 2003; 1-7.
 34. Rosenstein BJ. What is a cystic fibrosis diagnosis? *Clin Chest Med* 1998; 19 (3): 423-41.
 35. Rosenstein BJ, Cutting QR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus. *J Pediatr* 1998;132(4):589-95.
 36. Rowntree RK and Harris A. The Phenotypic Consequences of CFTR Mutations. *Ann Hum Genet* 2003; 67:471-85.
 37. Sermet-Gaudelus I, Renouil M, Fajac A, et al. In vitro prediction of stop-codon suppression by intravenous gentamicin in patients with Cystic Fibrosis: a pilot study. *BMC Med* 2007; 5:5-10.
 38. Rubenstein RC, Zeitlin PL. A pilot clinical trial of oral sodium 4-phenylbutyrate (buphenyl) in deltaF508-homozygous cystic fibrosis patients: partial restoration of nasal epithelial CFTR function. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 484.
 39. Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 1993; 73: 1251-94.