

Limitaciones de los estudios de genética molecular en el proceso diagnóstico de fibrosis quística

*Dra. Alicia Vaglio**, *Lics. Lucilla Pizzo†*, *Andrea Quadrelli‡*,
Dra. Rosario Gueçaimburú§, *Quím. Farm. Sinthia Pagano¶*,
Dr. Roberto Quadrelli††

Resumen

Introducción: *la fibrosis quística (FQ) es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva causada por mutaciones en el gen que codifica una proteína con función de canal de cloruro (CFTR). Se manifiesta como una enfermedad multiorgánica y se caracteriza por una gran heterogeneidad clínica. Existen pacientes que no manifiestan las características clínicas de la forma clásica y se describen como FQ atípica o no clásica. El diagnóstico se basa en un fenotipo clínico consistente más evidencia de disfunción del canal CFTR y/o en la identificación de dos mutaciones causantes de FQ. Ninguna de estas definiciones es suficiente por sí misma para establecer el diagnóstico.*

Objetivos: *mostrar algunas limitaciones de los estudios de genética molecular en el proceso diagnóstico de FQ.*

Material y método: *se consideran cinco casos clínicos de niños referidos con dato clínico de probable FQ y solicitud de estudio genético para la confirmación diagnóstica.*

Resultados: *los estudios realizados no permiten confirmar el diagnóstico de FQ ni descartar un posible diagnóstico de FQ atípica.*

Conclusiones: *la mayoría de las veces el diagnóstico de FQ es claro y los estudios genéticos permiten la confirmación diagnóstica, el asesoramiento genético y eventual diagnóstico prenatal. Sin embargo, el uso y la interpretación de los análisis genéticos presentan diversas dificultades relacionadas con la condición clínico-paraclínica del paciente, las limitaciones técnicas y la elección del conjunto de mutaciones a ser analizadas, especialmente en los casos de FQ atípica. Este trabajo muestra el desafío que puede implicar para el clínico interpretar un resultado molecular e integrarlo en el proceso diagnóstico de FQ.*

Palabras clave: *FIBROSIS QUÍSTICA - diagnóstico.*
FIBROSIS QUÍSTICA - genética.

Keywords: *CYSTIC FIBROSIS - diagnosis.*
CYSTIC FIBROSIS - genetics.

* Médica Pediatra Genetista. Instituto de Genética Médica (IGM). Uruguay.

† Licenciada en Bioquímica. IGM. Uruguay.

‡ PhD. en Antropología. Licenciada en Biología. IGM. Uruguay.

§ Médica Pediatra Genetista. IGM. Uruguay.

¶ PhD. Química Farmacéutica. IGM. Uruguay.

†† Académico. Médico Genetista. IGM. Uruguay.

Correspondencia: Dra. Alicia Vaglio
Instituto de Genética Médica, Hospital Italiano. Bulevar Artigas
1632, CP 11600. Montevideo, Uruguay
Correo electrónico: rquadr@dedicado.net.uy
Recibido: 2/5/11.

Aceptado: 11/7/11.

Conflicto de intereses: No existen conflictos de orden financiero u otros entre los autores.

Introducción

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad genética con herencia autosómica recesiva, es decir, un individuo debe tener mutaciones con pérdida de función en ambas copias de su gen CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) para manifestar la enfermedad. La incidencia de la enfermedad es de alrededor 1:3.300 recién nacidos vivos en las poblaciones definidas como caucásicas y la frecuencia de portadores sanos de una mutación (no identificables por síntomas clínicos ni por elevaciones en el test de sudor) es de 1:25^(1,2). Es una enfermedad multiorgánica y los síntomas son consecuencia del transporte deficiente de cloruro a través de los epitelios de las glándulas exócrinas debido a la ausencia o disfunción del canal de cloruro del CFTR⁽³⁾. La FQ se caracteriza por un amplio rango en su expresión clínica y una gran variación en la severidad y grado de progresión de los diferentes órganos involucrados⁽⁴⁾. En su forma clásica y más habitual se manifiesta como una enfermedad pulmonar obstructiva crónica, insuficiencia pancreática exócrina (IP), elevación de cloruro en sudor e infertilidad en varones por azoospermia obstructiva. Un número importante de pacientes tiene afectación leve y es relativamente frecuente el diagnóstico en niños mayores, adolescentes y aun adultos⁽⁵⁾.

La FQ es causada por mutaciones en el gen que codifica para la proteína reguladora de la conductancia transmembrana CFTR. El gen, situado en el cromosoma 7, se aisló en 1989; desde entonces, se han identificado más de 1.600 mutaciones, actualizadas permanentemente en la base de datos del Consorcio de Análisis Genético para Fibrosis Quística (CFGAC)^(4,6-9). Las mutaciones en el gen CFTR pueden clasificarse en cuatro grupos según sus consecuencias clínicas: a) mutaciones que causan la FQ; b) mutaciones que originan un desorden relacionado con CFTR; c) mutaciones cuyas consecuencias clínicas no se conocen, y d) mutaciones cuyas consecuencias clínicas no están probadas o son inciertas. La frecuencia de las mutaciones del CFTR difiere entre las poblaciones. La mutación F508del (antes denominada DF508) es la más frecuente y se encuentra en 70% o más de los cromosomas de pacientes con FQ en las poblaciones de Europa septentrional; se observan frecuencias muy inferiores de F508del en las poblaciones de Europa meridional⁽³⁾. Para una población dada, existen mutaciones específicas de etnia que alcanzan frecuencias desde 1% hasta incluso 7%^(3,10,11). Actualmente se dispone de análisis comerciales que detectan sistemáticamente un conjunto de unas 30 mutaciones con una prevalencia superior a 0,5%, la mayoría de las cuales se asocian a FQ clásica; una tasa de detección de mutaciones de 90% en una población específica significa que una mutación será identificada en ambos

genes CFTR en 81% de los pacientes con FQ típica⁽³⁾. En general, los métodos de análisis para detectar mutaciones en el gen CFTR van desde los paneles que contienen los alelos más comunes causantes de la enfermedad hasta métodos de secuenciación y búsqueda que permiten la detección de mutaciones nuevas o rearrreglos más complejos y extensos; sin embargo, aun el estudio más extenso de búsqueda de mutaciones no permite detectar todos los alelos de FQ en la mayoría de las poblaciones con FQ⁽⁴⁾.

Se ha demostrado que pacientes con características clínicas diversas son portadores de dos mutaciones de CFTR: pacientes con FQ clásica; pacientes con síntomas más leves e inicio de la enfermedad durante la adolescencia o la edad adulta; pacientes con una única característica clínica como, por ejemplo, pancreatitis recurrente, colangitis esclerosante, bronquiectasia "idiopática" o infertilidad masculina⁽³⁾. Las dos últimas categorías se asocian con FQ atípica o no clásica. La heterogeneidad en los fenotipos observados puede atribuirse a varios factores tales como el genotipo CFTR, genes modificadores (otros genes que alteran o influyen en la expresión de la función del gen CFTR) y factores ambientales⁽⁴⁾; por esta razón, se observa una enorme variación en la evolución de la enfermedad aun entre pacientes que presentan el mismo genotipo CFTR y reciben tratamientos similares⁽⁴⁾.

La confirmación diagnóstica de FQ se basa en un fenotipo clínico consistente más evidencia de una disfunción en el canal CFTR (prueba del sudor o diferencia en el potencial transepitelial nasal) y/o en la identificación de dos mutaciones causantes de FQ en posición *trans* (en cromosomas separados)⁽⁴⁾. La prueba del sudor con la determinación de la concentración de cloruro continúa siendo la principal herramienta para confirmar el diagnóstico. La mayoría de las veces el diagnóstico de FQ es claro y sencillo de realizar: las características clínicas son típicas y los valores anormales en la concentración de cloruro apoyan el diagnóstico clínico⁽⁴⁾. En estos casos, los estudios genéticos no son estrictamente necesarios, si bien son útiles para confirmar el diagnóstico y para facilitar los estudios en probables portadores y realizar asesoramiento genético y diagnóstico prenatal en la familia. En el caso de una prueba del sudor limítrofe, en un paciente con síntomas coherentes con FQ típica, el análisis genético podría respaldar el diagnóstico de FQ; si bien, incluso si se detecta una mutación, su participación en la enfermedad puede no ser evidente pues se desconocen las consecuencias funcionales de numerosas mutaciones del CFTR^(3,4). En este sentido, en el gen CFTR puede ocurrir un amplio espectro de alteraciones moleculares y mutaciones poco frecuentes que ocasionan una disfunción parcial o residual del canal CFTR y pueden estar asociadas con presentaciones atípicas de FQ con un fenotipo

clínico muy variable⁽¹²⁾.

En Uruguay son muy incipientes los estudios sobre las mutaciones más frecuentes para nuestra población específica^(10,13). El preliminar conocimiento epidemiológico de FQ en nuestro país genera algunas dificultades en el diagnóstico molecular que repercuten en el tratamiento, pronóstico y asesoramiento genético de la enfermedad. Por este motivo, la interpretación del análisis molecular se hace más compleja debiendo maximizar el número de mutaciones estudiadas con el fin de asegurar que la mayoría de los alelos causantes de enfermedad se encuentren considerados.

En el Instituto de Genética Médica (IGM), la mayoría de las veces los estudios genéticos se plantean para confirmar el diagnóstico y realizar asesoramiento genético y eventual diagnóstico prenatal. En función del caso clínico y del estudio solicitado por el médico tratante se encuentran a disposición dos niveles de análisis para detectar mutaciones en el gen CFTR. El primero consiste en la búsqueda de las mutaciones causantes de enfermedad más frecuentes en la población mundial (aproximadamente 104); para ello, se realiza una secuenciación parcial de los exones e intrones del gen CFTR en los que se hallan presentes dichas mutaciones (aproximadamente 66% de la región codificante). El segundo nivel de análisis corresponde a la secuenciación de toda la región codificante del gen CFTR. Como se indicó antes, este método permite detectar mutaciones o rearrreglos nuevos o más complejos. En el caso de una prueba del sudor limítrofe en un paciente con síntomas coherentes con FQ atípica, puede ser necesaria una extensa detección sistemática de mutaciones de ambos genes CFTR para respaldar este diagnóstico y solo la secuenciación completa se aproximará a una sensibilidad de 100%⁽³⁾. El objetivo del presente trabajo es mostrar las dificultades en el uso e interpretación de los estudios de genética molecular para el diagnóstico de FQ, realizados en nuestro instituto, a través del análisis de cinco casos clínicos.

Material y método

Caso clínico 1 (CC1)

Paciente de sexo masculino de 7 años y 10 meses de edad al momento de la consulta en el IGM del Hospital Italiano, enviado para la realización de estudio molecular para FQ. Del análisis genealógico surge que el niño es producto de tercera gestación de la unión de pareja no consanguínea. Según relato de la madre, por línea paterna tendría un tío fallecido por FQ, tíos gemelares varones fallecidos en el período neonatal inmediato de causa desconocida y una tía que –por relato familiar– sería portadora de FQ. Peso

de 30 kg (percentil 20-30), estatura de 131 cm (percentil 80) y perímetro cefálico de 53 cm (+ 1DE). Al examen físico se mostró reactivo, colaborador y sin dismorfias. Paladar ojival. Antecedentes perinatales: parto de término a las 37 semanas de edad gestacional con peso al nacimiento de 4 kg, talla de 53 cm y perímetro cefálico de 36 cm. La puntuación de Apgar fue de 8 al minuto y 9 a los 5 minutos. Expulsó meconio antes de las 24 horas de vida. Alta conjunta a las 48 horas de vida. Reingresó a los dos días del alta con diagnóstico de atelectasia de pulmón derecho permaneciendo internado por tres meses. Permaneció en su domicilio durante cuatro días reingresando con igual diagnóstico, con una internación de dos meses en esta oportunidad. Antecedentes posnatales: buen crecimiento, asma con persistencia moderada que nunca requirió internación en centro de tratamiento intensivo ni asistencia ventilatoria mecánica. Durante la crisis se trató con salbutamol y corticoides vía oral y durante los períodos intercríticos con corticoides inhalatorios.

Varias neumopatías agudas (NA) a múltiples lóbulos. De la paraclínica se destaca: test de van de Kamer normal, tres pruebas de sudor con valores de 23, 12 y 24 mmol/L, y dos pruebas de diferencia de potencial transepitelial nasal. La primera con los siguientes valores: fosa nasal derecha -61.3 mV y fosa nasal izquierda -59.5 mV; la segunda con valores de -60.7 mV para fosa nasal derecha y -58.9 mV para fosa nasal izquierda.

Caso clínico 2 (CC2)

Paciente de sexo masculino de 9 años y 10 meses de edad al momento de la consulta en el IGM, enviado con dato clínico de FQ. El análisis genealógico muestra que el niño es producto de tercer embarazo y parto de pareja joven no consanguínea. Tiene cinco hermanos sanos. Peso de 29 kg (percentil 10-25), talla de 131 cm (percentil 50) y perímetro cefálico de 53 cm (percentil 50). Al examen físico no presentó dismorfias. Paladar alto. Antecedentes perinatales: parto de término con peso al nacimiento de 2,8 kg. Se desconocen otros datos antropométricos. Antecedentes posnatales: crecimiento normal; a partir de los 2 meses de vida comenzó con crisis de broncoespasmo asociado a infección respiratoria baja que requirió internación. Hasta los 2 años, múltiples episodios similares, uso de broncodilatadores inhalatorios en forma crónica, posteriormente se fueron espaciando. En los últimos dos años presentó alrededor de cuatro crisis por año. Pautas madurativas levemente retrasadas, marcha liberada a los 2 años. Historia de reflujo gastroesofágico tratado con cisapride y medidas posturales de los 3 a los 5 años. De la paraclínica se destaca: tres pruebas del sudor con valores de 40-49 mmol/L y una con un valor de 68 mmol/L.

Caso clínico 3 (CC3)

Paciente de sexo masculino de 6 años de edad al momento de la consulta derivado con solicitud de estudio molecular para FQ. El análisis genealógico muestra que el niño es producto de tercer embarazo de pareja joven no consanguínea. Una hermana de la madre tuvo tres hijos varones con FQ de los cuales vive solamente uno; este último fue estudiado en nuestro instituto identificándose en doble heterocigosis las mutaciones patogénicas N1303K y R334W. Peso de 19 kg (percentil 10), talla de 116,5 cm (percentil 50) y perímetro cefálico de 55,5 cm (+ 2DE). Al examen físico no se apreciaron malformaciones externas mayores ni menores. Antecedentes perinatales: cesárea a término por presentación podálica. Peso al nacimiento 2,8 kg, talla de 45 cm y perímetro cefálico de 34,5 cm. La puntuación de Apgar fue de 9 al minuto y 10 a los 5 minutos. Estuvo una semana internado en tratamiento con antibióticos. Alta a domicilio a los 15 días de vida. Antecedentes posnatales: desarrollo madurativo dentro de lo esperado. Múltiples internaciones por cuadros infecciosos respiratorios. Primera internación a los 6 meses de edad durante un mes con diagnóstico de bronquiolitis viral. Oxígeno dependencia hasta los 5 años y medio de edad. De la paraclínica se destaca: test van de Kamer normal y tres pruebas del sudor con valores de 15, 56 y 49 mmol/L.

Caso clínico 4 (CC4)

Paciente de sexo masculino de 6 años de edad al momento de la consulta, enviado con dato clínico de prueba de sudor con valores limítrofes. Se solicita estudio molecular para FQ. El análisis genealógico muestra que el paciente es producto de primer embarazo de pareja joven no consanguínea. Existe el antecedente de un hermano fallecido por íleo meconial con probable FQ. Peso de 25 kg (percentil 90-97), talla 122 cm (percentil 90-97) y perímetro cefálico de 54 cm (percentil 97). Al examen físico se observó epicanto bilateral y muesca en el hélix del pabellón auricular derecho. Antecedentes perinatales: parto a término con peso al nacimiento de 4 kg, talla de 52 cm y perímetro cefálico de 32 cm. La puntuación de Apgar fue de 9 al minuto y 10 a los 5 minutos. Expulsó meconio el primer día de vida. Alta a los dos días. Antecedentes posnatales: crecimiento y pautas madurativas acordes a la edad. Dificultad en la motricidad gruesa así como en la lectura y memoria numérica. Portador de terreno atópico (uso esporádico de antihistamínicos). Es constipado habitual. Probable megacolon. Respirador bucal con adenoidismo. Dos episodios de infección respiratoria baja que requirió tratamiento con antibióticos, tos persistente por un lapso de tres meses (hasta los 3 años). Catalogado como asmático. Convulsión con fiebre a los 5 años y medio. De la paraclínica

se destaca: tres pruebas del sudor con resultados de 21, 22 y 29 mmol/L.

Caso clínico 5 (CC5)

Paciente de sexo femenino de 6 años y 1 mes de edad al momento de la consulta, enviada para estudio molecular de FQ. El análisis genealógico muestra que la niña es producto de segundo embarazo y primer parto de pareja joven no consanguínea. Al examen presentó peso de 20 kg (percentil 50), talla 115 cm (percentil 3-10) y perímetro cefálico de 51,5 cm (percentil 50). Epicanto, prognatismo, orejas con hélix hiperplegado y clinodactilia del quinto dedo a izquierda. Antecedentes perinatales: parto de término, peso al nacimiento 2,7 kg (percentil 10), talla de 49 cm (percentil 40). Antecedentes posnatales: entre los 6 y 12 meses presentó infecciones urinarias. Reflujo vesicoureteral, con intervención quirúrgica a los 14 meses. A los 6 meses diagnóstico de reflujo gastroesofágico. A los 14 meses presentó convulsiones, por lo que recibió medicación durante dos años. A los 2 años y medio fue adenoidectomizada. Bronquitis a repetición. Crisis de broncoespasmos tratados con broncodilatadores y fisioterapia respiratoria. Diarreas a repetición, uso de enzimas pancreáticas desde los 6 años, así como suplementos vitamínicos. De la paraclínica se destaca, electroencefalograma (EEG) que muestra "pequeño foco epiléptico" y pruebas del sudor con valores que varían entre 44 y 64 mmol/L. A los 13 años y 7 meses de edad se evaluó nuevamente a la paciente. En lo antropométrico, peso de 44 kg (percentil 25), talla de 159 cm (percentil 10-25) y perímetro cefálico de 55,5 cm (percentil 75). Sin dismorfias craneofaciales. Presentó dos infecciones respiratorias bajas tratadas en domicilio. Portadora de reflujo gastroesofágico con tratamiento quirúrgico. Actualmente cursa primer año de secundaria con buen rendimiento. De la paraclínica se destaca prueba del sudor con un valor de 61 mmol/L.

Análisis molecular

Para el primer nivel de análisis se realizaron las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) necesarias, a partir de ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico extraído según Grimberg y colaboradores, 1989⁽¹⁴⁾, para cubrir los exones 3, 4, 5, 6, 8, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 20, 22, 23 y 24 y las regiones colindantes exón-intrón correspondientes. Para el segundo nivel de análisis se realizaron las reacciones de PCR necesarias para cubrir los exones del 1 al 27. Se realizó secuenciación bidireccional con primers marcados de cada amplicón (Applied Biosystems); las secuencias resultantes fueron analizadas por electroforesis capilar automática (ABI 310, Applied Biosystems). Con este estudio, para el primer nivel de análisis, se secuencia

aproximadamente 66% de la región codificante del gen CFTR, donde se encuentran cerca de 92% de las mutaciones conocidas causantes de la enfermedad.

En suma, para el CC1 y CC4 se aplicaron el primer y el segundo nivel de análisis, mientras que para el CC2 y CC3 se aplicó únicamente el primer nivel. Adicionalmente, en el CC4 se realizó estudio cromosómico en linfocitos de sangre periférica con técnicas de bandeado G según protocolo estándar. En el CC5, en la historia clínica consta la realización, a los 6 años de edad, de un primer análisis molecular en el Centro Hospitalario de Nantes, Francia. A los 13 años y 7 meses de edad se realizó en el IGM, en colaboración con el Centro de Genética Humana de la Universidad de Boston (Estados Unidos), un segundo estudio de genética molecular que analizó la presencia de 104 mutaciones. A los 16 años y 7 meses de edad se realizó, en el IGM, la secuenciación completa del gen CFTR (segundo nivel de análisis).

Resultados

Caso clínico 1

En el primer nivel de análisis se identificó una mutación en heterocigosis reportada como patogénica: 4006-1 G>A⁽¹⁵⁾. No se registraron otras mutaciones causantes de enfermedad en el segundo nivel de análisis según Castellani y colaboradores, 2008⁽⁴⁾.

Caso clínico 2

En el primer nivel de análisis no se detectaron mutaciones reportadas como patogénicas según Castellani y colaboradores, 2008⁽⁴⁾.

Caso clínico 3

Con el primer nivel de análisis se identificó una mutación patogénica definida como N1303K en heterocigosis.

Caso clínico 4

El primer análisis molecular en el gen CFTR identificó la mutación F508del en heterocigosis. No se registraron otras mutaciones causantes de enfermedad en el segundo nivel⁽⁴⁾. En el estudio cromosómico, en el total de las metafases analizadas, se encontró una anomalía numérica con un total de 47 cromosomas, siendo identificado el cromosoma extra como un cromosoma X; fórmula cromosómica 47,XXY, que corresponde clínicamente al síndrome de Klinefelter.

Caso clínico 5

El primer análisis molecular (realizado a los 6 años de edad) en el gen CFTR realizado en el Centro Hospitalario de Nantes informa ausencia de mutaciones en los exones 4, 7, 10, 11, 13, 17b, 19 y 20. El segundo estudio de genética molecular, realizado a los 13 años de edad, no detectó la presencia de mutaciones patogénicas en el panel de 104 mutaciones. El tercer estudio realizado en el IGM, secuenciación completa del gen CFTR, no detectó ninguna mutación patogénica, definidas según el último consenso en el uso y la interpretación del análisis de mutaciones de FQ en la práctica clínica⁽⁴⁾.

Discusión

En este trabajo se presentan cinco casos clínicos que corresponden a niños que consultan por primera vez en el IGM con dato clínico de FQ o probable FQ, tres de ellos con antecedentes familiares de la enfermedad, y donde se plantea el análisis de genética molecular como parte de la elaboración diagnóstica. En todos los pacientes se observan diversas manifestaciones sinopulmonares, algunas de ellas indicativas de FQ pero menos específicas que otras consideradas “muy indicativas” (como, por ejemplo, infección respiratoria persistente por *Pseudomonas aeruginosa* mucóide o pólipos nasales en niños). Asimismo, tres de los casos analizados presentan manifestaciones gastrointestinales del mismo orden, “indicativas pero menos específicas”, a excepción del CC5 que manifiesta insuficiencia pancreática exócrina (tabla 1). Por otra parte, el test de van de Kamer, realizado en el CC1 y CC3, mostró resultados normales, mientras los valores de la prueba del sudor –una de las herramientas principales para confirmar el diagnóstico de FQ– mostraron valores considerados normales en el CC1, CC3 y CC4 y valores patológicos (superior a 60 mmol/L) en el CC2 y CC5, en este último en dos oportunidades. Asimismo, para el CC1 los valores de la prueba de diferencia de potencial nasal serían patológicos (valores inferiores a -40mV).

Como se indicó antes, el diagnóstico de FQ se basa en un fenotipo clínico consistente más evidencia de una disfunción en el canal CFTR (prueba del sudor, que continúa considerándose el “estándar de oro” para la confirmación diagnóstica, o diferencia en el potencial transepitelial nasal) y/o en la identificación de dos mutaciones causantes de FQ; no obstante, ninguna de estas definiciones es suficiente, por sí misma, para establecer el diagnóstico. En el caso de los pacientes presentados en este trabajo, el análisis genético es sugerido para respaldar u orientar un posible diagnóstico de FQ⁽⁴⁾. En los casos aquí presentados se realizaron dos tipos de estudios identificados como

primer (secuenciación parcial) y segundo (secuenciación completa) nivel de análisis del gen CFTR. Ambos niveles de análisis fueron realizados en el CC1, donde se identificó una única mutación patogénica (4006-1 G>A). Por otra parte, la secuenciación completa del gen CFTR mostró dos polimorfismos definidos como M470V y 4700del T. Los polimorfismos se refieren a variaciones en la secuencia de ADN que presentan una frecuencia de, al menos, 1% en la población general. Las consecuencias clínicas de los polimorfismos observados en el gen CFTR son objeto de intensa y dispersa discusión. Algunos estudios demuestran que en el caso de mutaciones CFTR varios polimorfismos en CFTR podrían influir en la severidad de la enfermedad en sujetos con desórdenes relacionados al CFTR y FQ, y polimorfismos en genes modificadores podrían, asimismo, contribuir a la severidad de la FQ^(4,16), o sea que la combinación de una mutación severa en un alelo con una variación en la secuencia en el alelo opuesto podría, en principio, ser responsable de la aparición de fenotipos atípicos como ausencia congénita de vasos deferentes, enfermedades pulmonares como bronquiectasia, pancreatitis idiopática crónica, sinusitis, aspergilosis broncopulmonar alérgica o asma, si bien en todos estos fenotipos hay una enorme influencia de otros factores genéticos (no relacionados con el gen CFTR) y factores no genéticos como influencias ambientales⁽¹²⁾. Por estas razones, en el último consenso, citado repetidas veces, sobre el uso y la interpretación del análisis de mutaciones para FQ, se sugiere no informar los polimorfismos en la práctica clínica, fundamentalmente debido a la aún discordante información sobre las consecuencias clínicas de los mismos. Por ello, en este trabajo se resolvió no comunicar la presencia de polimorfismos en los resultados pero sí en este espacio de discusión para mostrar la complejidad en la interpretación y el análisis de los resultados de los estudios de genética molecular. En suma, para el CC1 el análisis de mutaciones en el gen CFTR no es la respuesta al dilema diagnóstico y sus limitaciones deben ser entendidas por el médico tratante que debe interpretar el análisis y utilizarlo en el contexto del escenario clínico (además, la mayoría de las mutaciones CFTR no han sido funcionalmente caracterizadas y para la mayoría el potencial diagnóstico no está claro)⁽⁴⁾. Dados los criterios diagnósticos de FQ, el CC1 presenta manifestaciones clínicas limitadas al pulmón, mientras que las evaluaciones de funcionalidad del CFTR muestran una prueba de sudor normal y una diferencia de potencial nasal transepitelial patológica. Este último estudio presentó valores patológicos en dos oportunidades, por lo tanto no es posible descartar el diagnóstico de FQ atípica, donde pueden observarse valores normales o limítrofes en la prueba de sudor⁽¹²⁾. En este caso el seguimiento clínico del paciente es muy importante.

En el CC2 se realizó el primer nivel de análisis en el gen

CFTR. No se identificaron mutaciones reportadas como patogénicas según Castellani y colaboradores, 2008; sin embargo, y siguiendo el criterio indicado más arriba, de exponer en este espacio de discusión resultados cuya relevancia clínica se encuentran por determinar, se registró una variación en la secuencia definida como L967S que ha sido reportada previamente como un polimorfismo⁽¹⁷⁾, siendo luego encontrada en un hombre con oligospermia y pancreatitis idiopática⁽⁹⁾. Por tanto, la patogenicidad de esta variación en la secuencia del gen CFTR es aún motivo de discusión. En este paciente, que además presenta un valor patológico de la prueba del sudor, se justificaría la realización de una secuenciación completa del gen CFTR, que se encuentra pendiente. Para este caso, los resultados no permiten confirmar un diagnóstico de FQ ni descartar un posible diagnóstico de FQ atípica o no clásica.

En el CC3 se realizó el primer nivel de análisis en el gen CFTR, donde se identificó una mutación patogénica en heterocigosis. No se detectaron polimorfismos. El CC3 tiene antecedentes familiares de FQ y la mutación encontrada (N1303K) es una de las mutaciones presentes en la familia. Al igual que en el CC2, en este paciente se justifica la realización de una secuenciación completa del gen CFTR. Con estos resultados preliminares no es posible confirmar un diagnóstico de FQ ni descartar un posible diagnóstico de FQ atípica.

En el CC4, con antecedente de hermano fallecido con probable FQ con fleo meconial, se realizó, en primer término, el primer nivel de análisis (secuenciación parcial) que identificó la mutación patogénica frecuente F508del en heterocigosis. La secuenciación completa del gen CFTR mostró los polimorfismos M470V y 1525-61A>R. La interpretación de estos resultados es similar a la planteada en el CC1; no es posible confirmar el diagnóstico de FQ pero tampoco puede descartarse un posible diagnóstico de FQ atípica, siendo muy importante el seguimiento clínico del paciente. Por otra parte, la presencia del síndrome de Klinefelter (47,XXY) es un hecho concurrente dada la frecuencia de esta patología (1 en 1.000 varones nacidos vivos), sin relación con la FQ.

Finalmente, el CC5 corresponde a una paciente, sin antecedentes familiares de FQ, que consultó por primera vez a los 6 años de edad, con seguimiento clínico hasta los 13 años. Desde niña, esta paciente presentó manifestaciones clínicas indicativas de FQ, con dos valores patológicos en la prueba de sudor (tabla 1). Tanto el primer estudio genético para FQ realizado con un panel de mutaciones (efectuado en un centro de referencia extranjero), como el segundo (realizado en nuestro instituto), que consistió en la secuenciación completa del gen CFTR, dieron resultados negativos para mutaciones patogénicas, sin detección de polimorfismos. La interpretación de estos resultados, y del caso clínico en su conjunto, no es sencilla.

Tabla 1. Datos clínicos de los pacientes estudiados

	<i>Caso clínico 1</i>	<i>Caso clínico 2</i>	<i>Caso clínico 3</i>	<i>Caso clínico 4</i>	<i>Caso clínico 5</i>
Edad	7 años y 10 meses	9 años y 10 meses	6 años	6 años	6 años y 1 mes con seguimiento hasta 13 a 7m
Antecedentes familiares	Tío paterno fallecido por FQ Tía probable portadora FQ Tíos varones gemelares fallecidos período neonatal por causa desconocida	Sin antecedentes a destacar	Tres primos maternos con FQ	Hermano fallecido con probable FQ con íleo meconial	Sin antecedentes a destacar
Historia clínica	Atelectasia de pulmón al nacimiento Neumopatías agudas múltiples lóbulos Asma moderada	Broncoespasmos con infección respiratoria Reflujo gastro-esofágico	Cuadros infecciosos respiratorios múltiples Bronquiolitis viral Oxígeno dependencia hasta los 5 años y medio	Alérgico. Respirador bucal Infecciones respiratorias Tos persistente Asmático. Constipado habitual Probable megacolon	Reflujo gastro-esofágico Convulsiones. Bronquitis Broncoespasmos. Diarreas Uso de enzimas pancreáticas y suplementos vitamínicos
Pruebas del sudor	23 mmol/L 12 mmol/L 24 mmol/L	40 mmol/L 49 mmol/L 68 mmol/L	15 mmol/L 56 mmol/L 49 mmol/L	21 mmol/L 22 mmol/L 29 mmol/L	44 mmol/L 64 mmol/L 61 mmol/L
Análisis molecular	SP: 4006-1G>A	SP: no se detectaron mutaciones	SP: N1303K	SP: F508del	SC: no se detectaron mutaciones
Otros estudios	Van de Kamer normal TAC normal DPTN (1): FND: -61.3 mV; FNI: -59.5 mV DPTN (2): FND: -60.7mV FNI: -58.9 mV	-	Van de Kamer normal	Estudio cromosómico: 47,XXY	-
SP: secuenciación parcial; SC: secuenciación completa; DPTN: diferencia de potencial transepitelial nasal; FNI/D: fosa nasal izquierda/derecha					

lla. Esta paciente reúne los principales criterios para el diagnóstico clínico para la forma clásica de FQ, manifestaciones sinopulmonares y pancreáticas indicativas específicas y dos valores patológicos de la prueba del sudor. Sin embargo, el estudio molecular no permite identificar mutaciones patogénicas. Este es un claro ejemplo de un caso con manifestaciones clínicas y paraclínicas consistentes con FQ, pero sin hallazgos moleculares indicativos de la enfermedad. Es importante recordar, como ya se indicó, que aun el estudio más extenso de búsqueda de mutaciones no permite detectar todos los alelos de FQ en la mayoría de las poblaciones. La imposibilidad, al momento actual, para detectar todas las mutaciones puede ser parcialmente explicada por el hecho de que aún los análisis genéticos más avanzados para las mutaciones CFTR estudian solamente la región codificante y las uniones adyacentes exones/intrones. Las mutaciones localizadas en las regiones intrónicas y promotoras, así como secuencias reguladoras más distantes, no se examinan en forma rutinaria asistencialmente y pueden, por lo tanto, perderse. Por otra parte, existe alguna evidencia de que otros genes, además del gen CFTR, podrían ser los causantes de FQ en una pequeña fracción de pacientes, pero estos descubrimientos son todavía muy preliminares para ser usados en el contexto clínico⁽⁴⁾.

En Uruguay, como se mencionó antes, el preliminar conocimiento epidemiológico acerca de la prevalencia de FQ y de la frecuencia génica de las mutaciones causantes de la enfermedad genera mayores dificultades en la interpretación del análisis molecular, debiendo maximizar el número de mutaciones estudiadas para asegurar que la mayoría de los alelos patogénicos se encuentren considerados. Adicionalmente, causa que la sensibilidad clínica que se estima del estudio (proporción de individuos con FQ que tienen un estudio molecular positivo: con dos mutaciones causantes de enfermedad), si bien es aproximada, no sea precisa para nuestra población. La conferencia convocada por la Sociedad Europea de Fibrosis Quística insistió en la relevancia de conocer la frecuencia de mutaciones específicas de FQ en la población a estudiar, ya que permite proveer de estudios moleculares con un nivel de sensibilidad razonable⁽⁴⁾. Al momento, se encuentra en curso el proyecto "Desarrollo de herramientas para mejorar el diagnóstico molecular y asesoramiento genético de fibrosis quística en Uruguay" (ANII FMV 2009_1_2668) a cargo de una de las autoras (Lic. Lucilla Pizzo), el cual tiene entre sus objetivos relevar, a partir de la base de datos del IGM, valores de prevalencia de FQ y de frecuencias alélicas de mutaciones causantes de enfermedad mediante una discriminación entre las distintas formas de presentación de la FQ. Por otra parte, también es importante destacar que en nuestro país no se encuentra disponible el estudio paraclínico de medida de la diferen-

cia de potencial transepitelial nasal que valora la funcionalidad del CFTR limitando, asimismo, la elaboración clínica diagnóstica.

En suma, los avances en genética molecular deben equipararse con un progreso similar en la interpretación clínica y en la comunicación con los pacientes⁽⁴⁾. El significado de mutaciones raras, la correlación genotipo/fenotipo en un individuo, la relevancia clínica de alelos complejos y genes modificadores son todas cuestiones que originan más preguntas que respuestas; en general, es un desafío para el clínico interpretar un resultado molecular e integrarlo en el proceso de diagnóstico de FQ⁽⁴⁾.

Summary

Introduction: cystic fibrosis is an autosomal recessive hereditary disease caused by mutations of the gene which encodes a protein with a CFTR chloride channel function. It appears as a multi-organ disease and is characterized by a great clinical heterogeneity. There are patients who do not evidence the classic clinical characteristics and are described as atypical or non-classic cystic fibrosis. Diagnosis is based on a consistent clinical phenotype and evidence of dysfunction in the CFTR channel and/or in the identification of two mutations causing cystic fibrosis. None of these definitions is enough in itself to confirm diagnosis.

Objectives: to show a few limitations on the molecular genetic studies in the cystic fibrosis diagnostic process

Method: five clinical cases of children referred with clinical data of probable cystic fibrosis were considered, and they were requested a genetic study to confirm diagnosis

Results: studies conducted do not enable the confirmation of cystic fibrosis diagnosis and neither do they allow discarding a possible diagnosis of atypical cystic fibrosis.

Conclusions: in most cases the diagnosis of cystic fibrosis is clear and genetic studies enable the confirmation of diagnosis, genetic counseling and the final prenatal diagnosis. However, use and interpretation of genetic analysis result in several difficulties regarding the clinical and paraclinical characteristics of patients, technical limitations and choosing the mutations to be analysed, especially in the case of atypical cystic fibrosis. The present study shows the challenge faced by clinicians when interpreting a molecular result to incorporate it into the cystic fibrosis diagnostic process.

Resumo

Introdução: a fibrose cística FC é uma doença hereditária autossômica recessiva causada por mutações no gene que

codifica uma proteína com função nos canais de cloretos CFTR. É uma doença com manifestações múltiplas e se caracteriza por apresentar-se com grande variedade clínica. Alguns pacientes não apresentam as características clínicas clássicas e nesses casos a doença é chamada FC atípica ou não clássica. O diagnóstico é feito através do fenótipo clínico mais consistente associado a evidência de disfunção do canal CFTR e/ou na identificação de duas mutações causadoras da FC. Nenhuma dessas definições é suficiente para estabelecer o diagnóstico.

Objetivos: mostrar algumas limitações dos estudos de genética molecular no diagnóstico de FC.

Material e método: são discutidos cinco casos clínicos de crianças referidas com história clínica de FC provável e pedido de estudo genético para confirmação do diagnóstico.

Resultados: os estudos realizados não permitem confirmar o diagnóstico de FC nem descartar um possível diagnóstico de FC atípica.

Conclusões: na maioria dos casos o diagnóstico de FC é claro e os estudos genéticos permitem confirmar o diagnóstico, o assessoramento genético e eventual diagnóstico pré-natal. No entanto, o emprego e a interpretação das análises genéticas apresentam várias dificuldades relacionadas com a condição clínica do paciente, as limitações técnicas e a escolha do conjunto de mutações a ser estudadas, especialmente nos casos de fibrose cística atípica. Este trabalho mostra o desafio que o médico clínico enfrenta para interpretar um resultado molecular e integrá-lo ao processo de diagnóstico de FC.

Bibliografia

1. Grody WW, Cutting GR, Klinger KW, Richards CS, Watson MS, Desnick RJ; Subcommittee on Cystic Fibrosis Screening, Accreditation of Genetic Services Committee, ACMG. American College of Medical Genetics. Laboratory standards and guidelines for population-based cystic fibrosis carrier screening. *Genet Med* 2001; 3(2): 149-54.
2. Welsh MJ, Ramsey BW, Accuso F, Cutting GR. Cystic fibrosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8 ed. Nueva York: McGraw-Hill, 2001: 5121-88.
3. De Boeck, K. Procedimientos diagnósticos, características clínicas y asesoramiento en la fibrosis quística. *Ann Nestlé*

- [Esp] 2006; 64(3): 119-30.
4. Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros* 2008; 7(3): 179-96.
 5. Segal, E. ¿Es de interés para el pediatra un consenso sobre diagnóstico y tratamiento de los pacientes con fibrosis quística? *Arch Argent Pediatr* 2008; 106(4): 293-4.
 6. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and dumping. *Science* 1989; 245(4922): 1059-65.
 7. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245(4922): 1066-73.
 8. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245(4922): 1073-80.
 9. Canada. Hospital for Sick Children. Cystic Fibrosis Centre. Cystic Fibrosis Mutation Database. Disponible en: www.genet.sickkids.on.ca/cftr. [Consulta: 20/11/2010].
 10. Luzardo G, Aznárez I, Crispino B, Mimbaca A, Martínez L, Poggio R, et al. Cystic fibrosis in Uruguay. *Genet Mol Res* 2002; 1(1): 32-8.
 11. Mateu E, Calafell F, Ramos MD, Casals T, Bertranpetit J. Can a place of origin of the main cystic fibrosis mutations be identified? *Am J Hum Genet* 2002; 70(1): 257-64.
 12. Noone PG, Knowles MR. 'CFTR-opathies': disease phenotypes associated with cystic fibrosis transmembrane regulator gene mutations. *Respir Res* 2001; 2(6): 328-32.
 13. Cardoso H, Crispino B, Mimbacas A, Cardoso ME. A low prevalence of cystic fibrosis in Uruguayans of mainly European descent. *Genet Mol Res* 2004; 3(2): 258-63.
 14. Grimberg J, Nawoschik S, Belluscio L, McKee R, Turck A, Eisenberg A. A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. *Nucleic Acids Res* 1989; 17(20): 8390.
 15. Mitter H, Duhamel JF, Abeguile G, Lemaire M, Leymarie P. A novel splice mutation, 4006-1G>A, in intron 21 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Hum Mutat* 2000; 15(1): 121.
 16. Groman JD, Hefferon TW, Casals T, Bassas L, Estivill X, Des Georges M, et al. Variation in a repeat sequence determines whether a common variant of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene is pathogenic or benign. *Am J Hum Genet* 2004; 74(1): 176-9.
 17. Claustres M, Laussel M, Desgeorges M, Giansily M, Culard JF, Razakatsara G, et al. Analysis of the 27 exons and flanking regions of the cystic fibrosis gene: 40 different mutations account for 91.2% of the mutant alleles in southern France. *Hum Mol Genet* 1993; 2(8): 1209-13.