

Estudio Molecular de Fibrosis Quística en Cuba.

Autoría principal

Teresa Collazo Mesa¹.

Otros autores

Ixchel López Reyes¹, Elvia N Santos González¹, Manuel Gómez Martínez¹, Yaixa Piloto Roque¹, Yadira Hernández Pérez¹, Lidice Reyes Navarro¹, Fidel Rodríguez Cala².

Colaboradores

Juan Bautista García Sánchez³, José González Valdez³, Gladis Abreu Suarez³, Lidia Teresita Ramos Carp³, Roberto Razón Behar³, Juana María Rodríguez Cuting³, Fidel R Rodríguez Cala³, Dagmara M. Monagas Travieso³, Dra. C. Teresa Casals⁴.
Genetistas de todo el país.

Entidad ejecutora principal

¹ Centro Nacional de Genética Médica.

Entidades participantes

² Hospital Calixto García.

³ Comisión Nacional de Fibrosis Quística.

⁴ Instituto de Investigaciones Oncológicas de Barcelona.

Autor para correspondencia

Dra. C. Teresa Collazo Mesa

Calle 3ra /222 y 224 # 22206 Jaimanitas - Playa la Habana

tcollazo@infomed.sld.cu

Aporte científico de cada autor al resultado

- ✓ Dra. C **Teresa Collazo Mesa** (50%): Elaboración de los dos proyectos de Investigación ramales y estandarización de las técnicas para la introducción del diagnóstico molecular de Fibrosis Quística en Cuba.
- ✓ Lic. **Ixchel López Reyes** (10%): Diagnóstico molecular de Fibrosis Quística.
- ✓ **Elvia N. Santos González** (10%): Diagnóstico molecular de Fibrosis Quística.
- ✓ **Manuel Gómez Martínez** (5%): Estandarización para la detección de mutaciones.
- ✓ **Yadira Hernández Pérez** (5%): Diagnóstico molecular de Fibrosis Quística.
- ✓ **Yaixa Piloto Roque** (5%): Detección de mutaciones.
- ✓ **Lidice Reyes Navarro** (5%): Extracción de ADN de las muestras.
- ✓ **Fidel Rodríguez Cala** (10%): Diagnóstico clínico de los pacientes con Fibrosis Quística.

Aporte de los colaboradores

- ✓ Juan Bautista García Sánchez, José González Valdez, Gladis Abreu Suarez, Lidia Teresita Ramos Carp, Roberto Razón Behar, Juana María Rodríguez Cuting, Fidel R Rodríguez Cala, Dagmara M. Monagas Travieso: Diagnóstico clínico de los pacientes.

- ✓ Genetistas de todo el país: Diagnóstico clínico de los pacientes.
- ✓ Dra. C. Teresa Casals: Permitió el estudio molecular de nuevas mutaciones en el Instituto de Investigaciones Oncológicas de Barcelona donde trabaja.

Resumen

Antecedentes: La Fibrosis Quística (FQ) es la segunda enfermedad autosómica recesiva más frecuente en Cuba, provoca alteraciones en las glándulas exocrinas y en el período comprendido del año 2001 al 2008 fallecieron un total de 30 pacientes correspondiendo 33% de las defunciones al grupo menor de un año, por lo que es un problema de salud que nos afecta.

Problema que se ha resuelto de acuerdo con los objetivos del trabajo: El estudio realizado ha permitido la caracterización molecular de la FQ en la población cubana, siendo identificadas las mutaciones hasta ahora más frecuentes, permitiendo realizar el diagnóstico prenatal y de portadores de las familias afectadas y el diagnóstico en casos dudosos clínicamente. Conociendo el defecto molecular y teniendo en cuenta factores ambientales ha sido posible conocer el pronóstico y evolución de la enfermedad, ha contribuido en la realización de un diagnóstico precoz lo que resulta de gran importancia ya que mientras más rápido tenga el paciente el tratamiento adecuado, mejor será el pronóstico y calidad de vida del mismo. Ha permitido establecer una estrategia para el diagnóstico molecular de la FQ en Cuba y contribuir a aumentar la supervivencia de los enfermos.

Resultados: Se ha realizado el diagnóstico molecular prenatal y postnatal durante 25 años a 2880 casos que incluyen a los enfermos y familiares afectados por Fibrosis Quística. Se detectaron las mutaciones más frecuentes en la población y se caracterizó molecularmente el 60% de los casos estudiados. Con el desarrollo de la Biología Molecular y el conocimiento de esta enfermedad se han ido incorporando a lo largo de la investigación nuevas técnicas hasta el establecimiento de una estrategia en el país para el estudio y atención de cada uno de las familias afectadas, ya que esta enfermedad constituye un serio problema de salud en muchos casos letal, la cual causa gran daño en la morbilidad física y psicológica al paciente y su familia, permitiendo esta investigación ofrecer la posibilidad de conocer el estatus de su descendencia y la confirmación temprana del diagnóstico, contribuyendo a un mejor asesoramiento genético y calidad de vida del paciente y la familia.

- Se han realizado 11 publicaciones: 6 artículos científicos 2 en revistas de Impacto (Hum Heredity 1,6 y Journal Cystic Fibrosis 2,8, las cuales han sido citadas en 26 y 7 trabajos relacionados respectivamente) y 4 en revistas indexadas en la corriente principal. Además 4 reportes y 1 revisión bibliográfica, 23 presentaciones en eventos, una tesis de doctorado, 1 tesis de maestría y dos tesis de residentes.
- Contribución en la sociedad: permite la realización del diagnóstico molecular posnatal y prenatal de FQ en Cuba, proporcionando una mejor atención y asesoramiento genético a las familias afectadas. Avals: de la Comisión Nacional de Fibrosis Quística, de la Subdirección de Asistencia Médica del Centro Nacional de Genética Médica (CNGM), Consejo Científico del CNGM y Consejo Científico de la Universidad de Ciencias Médicas.
- Conclusiones: Es una Investigación que ha permitido establecer una estrategia para el diagnóstico molecular de Fibrosis Quística, la cual constituye un problema de salud en Cuba y el mundo.

Comunicación Corta

La Fibrosis Quística (FQ) es una enfermedad hereditaria con patrón de herencia autosómico recesivo¹. Según datos recientes publicados por la Comisión Nacional de Fibrosis Quística, la frecuencia en Cuba es de 1/9862 recién nacidos vivos. En el período comprendido del año 2001 al 2008 fallecieron un total de 30 pacientes correspondiendo 33% de las defunciones al grupo menor de un año [2], por lo que es un problema de salud que nos afecta.

Se conoce como una enfermedad de las glándulas exocrinas que afecta principalmente los aparatos digestivo y respiratorio; cursa en las formas clínicas típicas con la siguiente tríada: enfermedad pulmonar obstructiva crónica, insuficiencia pancreática exocrina y cifras anormalmente altas de electrolitos en sudor³.

El descubrimiento de marcadores polimórficos estrechamente ligados a la FQ, constituyó un importante avance que permitió llevar a cabo, de forma indirecta, la detección de portadores y el diagnóstico prenatal, con las limitaciones y riesgos que esta metodología implican. Es a partir del año 1989, tras el clonaje e identificación del gen y de su mutación principal F508del, que fue posible el desarrollo de técnicas de forma directa para detectar ésta y otras mutaciones⁴.

El gen *CFTR* está implicado en un amplio espectro de manifestaciones clínicas, quedando claro que las mutaciones *CFTR* causan la forma clásica de FQ cuando se asocian dos mutaciones “graves” y, de acuerdo a los estudios de ARNm, estos pacientes tienen menos del 1-3% de *CFTR* normal⁵. Sin embargo, la situación es distinta cuando se combina una mutación “grave” con una mutación “moderada”, la cual todavía retiene parte de la función de *CFTR*, o para aquellos casos de una mutación que deja una pequeña porción del *CFTR* normal, el cual es insuficientemente funcional en algunos tejidos (pulmón o páncreas, pero no en los conductos deferentes)⁶.

Los pacientes FQ que presentan esta enfermedad sufren limitaciones físicas y psicológicas, el tratamiento es prolongado y costoso ya que necesitan, con frecuencia, el uso de antibióticos e ingresos hospitalarios de larga duración. Por otra parte la familia sufre también, los padres sobre todo por el sentimiento de culpa, y el temor que los invade ante la posibilidad de futuros hijos afectados y porque presienten la muerte del enfermo.

Por representar un problema de salud, nos propusimos en este trabajo caracterizar molecularmente la FQ en Cuba y definir la mejor estrategia posible para el diagnóstico a partir de la detección de las mutaciones más frecuentes en nuestra población, teniendo en cuenta el origen étnico de la misma y el estudio de marcadores moleculares que nos permitirán brindarles a estas familias afectadas la posibilidad de diagnóstico prenatal y de portadores cuando lo necesiten.

Objetivos

* Caracterizar molecularmente la FQ en un grupo de pacientes diagnosticados clínicamente por la Comisión cubana de FQ- Ministerio de Salud Pública (CCFQ/MINSAP).

* Detectar las mutaciones más frecuentes, de acuerdo con nuestras posibilidades, en los fibroquísticos cubanos.

Resultados

En el caso de la FQ, el descubrimiento de los marcadores polimórficos XV2C y KM19, constituyeron una importante etapa que permitió llevar a cabo de forma indirecta, la detección de portadores y el diagnóstico prenatal.

Con el estudio indirecto de estos marcadores moleculares y realizando la construcción de los haplotipos correspondientes, el 49.15% del total de familias analizadas afectadas con un hijo previo con FQ, resultaron completamente informativas aproximadamente el 50 %, frente a un 10% que fueron no informativas⁷, lo que nos permite brindarle la posibilidad de diagnóstico prenatal y de portadores a aproximadamente la mitad de las familias afectadas.

Con el descubrimiento del gen y de las mutaciones más frecuentes, teniendo en cuenta el origen de nuestra población, buscamos en nuestros pacientes las mutaciones más frecuentes en España y Africa, encontrando los resultados que se muestran en la tabla 1⁸.

Tabla 1. Frecuencia de las mutaciones de Fibrosis Quística en la población cubana (n=153).

Mutación FQ	# de alelos	Porcentaje
p.F508del	116	37.9
p.G542X	21	6.8
p.R334W	16	5.2
p.R1162X	6	2.0
c.3120+1G>A	4	1.3
c.N1303K	0	0
Total	170	55.5

Como en la mayoría de las poblaciones estudiadas, la mutación F508 del resulta ser la causa predominante hasta el momento que provoca esta enfermedad, la cual en la mayoría de los casos cursa con un cuadro clínico severo.

El estudio de estas 6 mutaciones nos permite caracterizar el 55,5 % de los cromosomas fibroquísticos, lo que demuestra la alta heterogeneidad de nuestra población.

Para ampliar las posibilidades diagnósticas realizamos el estudio de los microsatélites IVS17bTA e IVS8CA⁹, estos marcadores en otras poblaciones como España e Italia, mostraron que existe una fuerte asociación entre ciertos haplotipos y mutaciones específicas del gen *CFTR*. Este conocimiento, lo utilizamos para identificar los alelos

mutados aún desconocidos en nuestras muestras afectadas por FQ, ya que la determinación del haplotipo podría orientar acerca de qué tipo de mutación se trata.

Construimos los haplotipos de los marcadores microsatélites IVS17bTA e IVS8CA, buscamos los asociados a mutaciones fibroquísticas específicas y lo usamos para el diagnóstico molecular de FQ en nuestros pacientes. Se realizó la detección de las mutaciones: 1811+1'6kbA→G, 2869insG, G85E y Q1281X.

Para identificar las mutaciones en el resto de los cromosomas, habría que secuenciar todo el gen *CFTR*, el cual tiene 27 exones, lo que resultaría muy costoso. Por lo que se hizo necesario que las muestras aún no caracterizadas fueron analizadas mediante las técnicas de *DGGE* y *SSCP*¹⁰ que permiten localizar las mutaciones en los diferentes exones y posteriormente identificarlas, de lo contrario no podríamos realizarle diagnóstico molecular a estas familias afectadas por FQ en las cuales no se conoce la causa de la enfermedad.

Se identificaron dos pacientes portadores de la mutación I507del y tres patrones anómalos correspondientes a una mutación o polimorfismo aún no identificado, por lo que fue necesaria la secuenciación de estas muestras para la identificación del defecto. En el exón 4, fue detectada la mutación Y109C, la cual se encontró en un paciente heterocigótico para F508del.

En el exón 13a se encontró la mutación 2183AA/G la cual provoca una terminación prematura del codón 38 en el exón 13 y se ha encontrado en heterocigosis con las mutaciones F508del, G542X, G1244E y 2789+5G→A y en todos estos casos cursa con un fenotipo severo.

Otro cambio conformacional correspondió a la mutación 3272-26A→G, localizada en el exón 17b, provocando un RNAm con un nucleótido extra y por consiguiente una terminación prematura del codón de parada.

La caracterización molecular de la Fibrosis Quística en Cuba, así como el estudio de los marcadores moleculares, ha permitido realizar hasta el año 2011, 108 diagnósticos prenatales a parejas con hijos previos afectados por FQ, parejas con hijos afectados fallecidos, fetos con íleo meconial, padres portadores con nuevas parejas y madres fibroquísticas, permitiendo brindarles a las familias la posibilidad de conocer la condición de sano, enfermo o portador de su descendencia y de esta forma poderles brindar un asesoramiento genético más preciso, posibilitando el inicio de un tratamiento precoz de la enfermedad si fuese necesario y contribuyendo a un mejor pronóstico y calidad de vida para el recién nacido¹¹.

Conclusiones.

Este estudio realizado durante 25 años, el cual no es posible realizar en todos los países de América Latina, ha permitido contar con herramientas moleculares para realizar diagnóstico posnatal y prenatal en las familias que lo solicitaron en todas las regiones del país, ofreciéndoles un asesoramiento genético más preciso y

ofreciéndoles que conozcan como será su descendencia en las familias estudiadas, lo que permite a la pareja decidir sobre su futura descendencia y en caso de ser afectado tener atenciones especiales desde su nacimiento lo que contribuirá a un mejor pronóstico y mejor calidad de vida.

Aportes Científicos y Sociales principales de la Investigación

Este estudio realizado por primera vez en Cuba, ha permitido la caracterización molecular de la FQ, han sido identificadas las mutaciones hasta ahora más frecuentes, permitiéndonos realizar el diagnóstico prenatal y de portadores en aproximadamente el 55 % de las familias afectadas. El estudio de los marcadores moleculares nos ha posibilitado en gran medida completar el diagnóstico en aquellos pacientes en los que aún no se han identificado en ambos cromosomas o en uno de ellos las mutaciones responsables, incrementando las posibilidades de diagnóstico y mejorando la calidad de vida de estas familias a las cuales podemos darle la posibilidad de conocer cómo será su descendencia. Además hemos podido identificar mutaciones que se encuentran asociadas a diferentes alelos de los marcadores, sin necesidad de secuenciar el gen, lo que resultaría muy costoso.

Conociendo el defecto molecular y teniendo en cuenta factores ambientales ha sido posible saber el pronóstico y evolución de la enfermedad en familias afectadas, ha contribuido en la realización de un diagnóstico precoz lo que resulta de gran importancia ya que mientras más rápido tenga el paciente el tratamiento adecuado, mejor será el pronóstico y calidad de vida del mismo.

Este estudio nos ha permitido establecer una estrategia para el diagnóstico molecular de la FQ en Cuba y contribuir a aumentar la supervivencia de los fibroquísticos.

Este diagnóstico ha sido generalizado y se le brinda la posibilidad de realizarse el estudio a los casos de todo el país, que lo requieran.

Bibliografía

1. Casals T. Epidemiología y patogénesis. En: Sociedad Científica de lucha contra la fibrosis quística, Manual de Fibrosis Quística 2003: 13- 19.
2. Razón R, Rodríguez F, Rojo M, González J, Abreu G, Pérez T, et al. La fibrosis quística en Cuba. Rev cubana Pediatr. 2009;81(Sup):85-92.
3. Scriver CR, Beaudet AL, Sly GW, Valle D. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases. 7th ed. Vol. 3. Mc Graw-Hill. New York. 1995; 127: 3787-3798.
4. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz DA, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science 1989; 245: 1073- 80.
5. The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium. Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. N Engl J Med 1993; 329: 1309-1313.

6. Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Worldwide survey of the DF508 mutation. Report from the Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. *Am J Hum Genet* 1990; 47: 354-9. 18. EWGGCF Gradient of distribution in European of the major CF mutation and of its associated haplotype. European Working Group on CF Genetics. *Human Genet* 1990; 85: 436-445.
7. Frequency of the deltaF 508 mutation y XV2C/ KM19 haplotypes in Cuban Cystic Fibrosis Families. T.Collazo, C. Magariño, R. Chávez, B. Suardíaz, S. Gispert, M. Gómez, M. Rojo, L. Heredero. *Hum. Hered.*, 1995, 45: 55-57.
8. Common mutations in cuban cystic fibrosis patients, *J Cyst Fibros* (2008), doi:10.1016/j.jcf.2008.09.00 Teresa Collazo, Ana María Bofill, Yulia Clarck, Yadira Hernández, Manuel Gómez, Fidel Rodríguez, María D Ramos, Javier Jiménez, Teresa Casals, Manuel Rojo.
9. Caracterización del marcador microsatélite IVS17bTA y seis mutaciones del gen CFTR en 21 familias cubanas con fibrosis quística. Autores: Laura González, Teresa Collazo, Yulia Clark, Manuel Gómez, Lidice Reyes. *Biotecnología Aplicada* 2013;30:257-261.
10. Detection of mutations using the techniques of single strand conformation polymorphism (SSCP) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in Cuban patients with Cystic Fibrosis. Dra Teresa Collazo Mesa, Lic Yaixa Piloto Roque, Yulia Clark Feoktistova, Téc Ana María Bofill Martínez, Téc Manuel Gómez Martínez, Téc Yadira Hernández Pérez. *Revista de Biotecnología Aplicada*.
11. Antenatal testing for Cystic Fibrosis. Teresa Collazo PhD, Ixchel López, Yulia Clark MS, Yaixa Piloto MS, Laura González, Manuel Gómez, Marilevis García, Lidice Reyes, Fidel Rodríguez MD. *MEDICC Review*, July–October 2014, Vol 16, No 3–4.