

# Diagnóstico genético de la fibrosis quística: Una experiencia provincial de 10 años, Mendoza, Argentina

Dr Eduardo Raúl Lentini,<sup>1</sup> Mgter Luz Marina Navarta,<sup>2</sup> Lic Adriana López Millán<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Ex Jefe de Servicio de Neumonología, Hospital Notti, Mendoza, Argentina

<sup>2</sup> Especialista Biología Molecular, Laboratorio Biología Molecular, Hospital Central. Mendoza, Argentina

<sup>3</sup> Ex coordinadora del Programa Provincial FQ Hospital Notti, Mendoza, Argentina

## Resumen

**Objetivos:** El presente trabajo tiene por objetivo presentar el perfil genético de enfermos fibroquísticos de la Provincia de Mendoza. **Pacientes y método:** Se estudiaron 105 pacientes derivados del Centro de Fibrosis Quística con diagnóstico clínico o test del sudor positivo. **Técnica:** INNO-LIPA-CFTR 19 e INNOLIPA-CFTR17; amplificación genómica mediante PCR multiplex con sondas alelo-específicas. **Resultados:** Se encontraron 18 mutaciones diferentes causantes de fibrosis quística. El 33,3% corresponde a la F508del; N1303K = 8,5%; G542X = 6,2%; W122X = 3,3%. Se detectó la mutación "africana" 3.120 + 1G > A en el 2,8% de los casos. **Conclusiones:** nuestra prevalencia y espectro de mutaciones en fibrosis quística difieren de otras publicadas en el país. El hallazgo de mutaciones reportadas con mayor frecuencia en países africanos sugiere que nuestra población tiene influencias étnicas diferentes. Se discuten las imprecisiones diagnósticas que han generado en pequeños grupos de enfermos los nuevos avances de laboratorio en genética: enfermos "SMAF-Q Y PAF-Q" (explicación en el texto).

**Palabras clave.** Fibrosis quística, genética.

## Genetic diagnosis of cystic fibrosis: A 10-year provincial experience, Mendoza, Argentina

### Summary

**Objective:** To present the genetic background of Cystic Fibrosis Patients from the Province of Mendoza, Argentina. **Patients and method:** 105 patients were studied during 10 years. referred from a Cystic

Fibrosis Center to the genetic laboratory. Cystic Fibrosis phenotype and /or abnormal sweat test were the referral reasons. **Technique:** INNO-LIPA-CFTR19 and INNO-LIPA CFTR 17, genome amplification through PCR multiplex with allele specific probes were used. **Results:** 18 different mutations were detected F508 del frequency was 33.3%; N1303K: 8.5%; G542X: 6.2%; W122X: 3.3%. The "African" mutation 3120 + 1G > A was found in 2.8% of cases. **Conclusions:** Our prevalence of Cystic Fibrosis mutations differs markedly from others reported in our Country. African mutation detection suggests a different ethnic origin for our population. We discuss a small group of patients where genetic studies seem to have created diagnostic difficulties (metabolic syndrome and cystic fibrosis associated pathology).

**Key words.** Cystic fibrosis, Genetics.

### Abreviaturas

PECS: Posible Enfermo Clínicamente Sospechoso.

FQ: Fibrosis Quística.

M: Mutación.

NADA: No se encuentra ninguna mutación.

OTRA: Se encuentra otra mutación diferente.

CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (nombre internacional del gen mutado de la FQ en cromosoma 7).

### Introducción

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad genética severa, autosómica recesiva, más frecuente en la raza blanca. Se caracteriza por enfermedad pulmonar infecciosa progresiva y malabsorción.

El desarrollo de "kits" para estudios genéticos en fibrosis quística ha permitido dar un paso adelante muy importante en la comprensión de esta enfermedad multifacética y letal.<sup>1</sup>

El horizonte diagnóstico se ha ampliado así y complementa los pasos que se están dando en todo sentido para el diagnóstico muy precoz (DP) de la enfermedad, aún antes que sea sintomática.<sup>2</sup> Este

**Correspondencia.** Dr Eduardo Raúl Lentini  
Correo electrónico: doclentini@gmail.com

DP es la suma de desarrollos que comprenden: los mapeos neonatales con tripsinógeno inmuno-reactivo (TIR),<sup>3,4</sup> la contribución de laboratorios con mucha experiencia en la realización del test del sudor según normas muy rigurosas,<sup>5</sup> laboratorios de biología molecular y la creación de grupos/centros con especial interés en este tema que garanticen todas los recursos para conseguir medicación y aseguren el seguimiento coordinado y normatizado para arribar así a la meta del DP y mejorar el pronóstico actual aún más.<sup>3,6,7</sup>

A pesar de los avances que aporta la genética, existen pequeños grupos de “posibles enfermos clínicamente sospechosos” (PECS) en los cuales la genética con su enorme desarrollo ha introducido simultáneamente áreas de incertidumbre.<sup>8</sup> Estos PECS deben ser resueltos por estructuras de Salud que comprendan simultáneamente las complejidades de la genética (genetistas) y clínicos que entiendan la imprecisión temporal que puede tener el diagnóstico definitivo de la FQ, para enfrentar y aconsejar calmadamente a las familias con niños cuyos diagnósticos “están por confirmarse o rechazarse”.<sup>8</sup>

La derivación de PECS al laboratorio del Centro de Fibrosis Quística, para confirmación diagnóstica, nos permite presentar las siguientes hipótesis sobre los eventuales resultados de este trabajo:

a. Existen grupos de enfermos FQ claramente confirmados como tales, al encontrarse 2 mutaciones causantes de FQ (MCFQ), homo o heterocigotas, en el cromosoma 7.

b. Se presentan PECS en los que el hallazgo de una sola mutación causante de FQ o aún dos, donde una de ellas no es patogénica, **no permitiría la confirmación diagnóstica al comienzo de los síntomas**. En estos casos se requerirá una evaluación en el tiempo para que se manifieste más claramente el fenotipo FQ: como la aparición de *Pseudomona aeruginosa*; alteración de la elastasa fecal e inclusive recurrir a esperar la evolución del test del sudor en el tiempo ya descripta en algunos casos.<sup>9</sup> También posiblemente habrá que recurrir a Centros de Investigación Genética más complejos que realicen estudios de secuenciación.

## Pacientes y método

**Criterios de inclusión:** Se estudiaron 105 pacientes (210 cromosomas) con síntomas de la enfermedad y/ o test de sudor elevado, cuyas edades se encontraban entre 1 mes y 32 años derivados del Centro Provincial de Fibrosis Quística.

**Criterios de exclusión:** se excluyeron del presente trabajo los familiares de pacientes FQ portadores de alguna mutación en estado heterocigota, sin manifestaciones clínicas (portadores sanos).

Duración del estudio desde el año 2005 – 2015 inclusive.

**Metodología empleada:** Las muestras de ADN de los 105 enfermos fueron estudiadas mediante los “kits” INNO-LIPA CFTR19 e INNO-LIPA CFTR17+Tn, de *Innogenetics*. Estos “kits” detectan las 36 mutaciones más frecuentes en Europa causantes de FQ según el ACMG (*American College of Medical Genetics*). Éstas proveen un elevado nivel de detección en la población caucásica.

1. Separación de ADN a partir de sangre entera anticoagulada con EDTA.

2. Amplificación genómica mediante PCR multiplex (*Polimerase Chain Reaction*), con sondas alelo específicas.

3. Identificación de las mutaciones y polimorfismos en cada uno de los alelos del paciente (total de 210 alelos), mediante la utilización de *INNO-LIPA CFTR19 e INNO-LIPA CFTR17+Tn*, de *Innogenetics*.

## Resultados

En 56 de los 105 pacientes se detectaron dos mutaciones. Dentro de este grupo, 19 fueron homocigotas y 37 heterocigotas compuestos; es decir, presentaban dos mutaciones diferentes en el gen CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*), cada una proveniente de un progenitor).

En 37 enfermos se halló una sola mutación y en 12 pacientes no se pudo identificar ninguna con el kit utilizado (12,6%) Tabla 1.

**Tabla 1.** Genotipos encontrados en pacientes fibroquísticos de Mendoza.

Genotipos	Pacientes FQ con dos mutaciones identificadas	Pacientes FQ con una mutación identificada	Pacientes FQ con ninguna mutación identificada	Total
Homocigotas	19	0	0	19
Heterocigotas	37	37	0	74
Genotipo no identificado	0	0	12	12
Total	56	37	12	105

En la población de pacientes FQ de Mendoza, estudiados en el presente trabajo, se detectaron 18 mutaciones diferentes causantes de FQ, de las cuales la más prevalente es la F508 del, presente en el 33,3% de los alelos. La siguiente en frecuencia es la N1303K en 8%. Con una prevalencia de 6% se encuentran 3849+10kbC>T y G542X. Mientras que las mutaciones W1282X y 3120+1G>A **se encuentran en alrededor del 3% de los casos (3.120+1G>A: mutación “africana”**.<sup>10</sup> Las frecuencias R1162X y G85E se hallan cerca del 2%, y el resto de las mutaciones se presentan por debajo del 2% de los alelos estudiados Tabla 2.

**Tabla 2.** Espectro y frecuencia de mutaciones del gen CFTR en pacientes FQ.

Mutación	Alelo mutado / Total alelos	%
F508del	70 / 210	33,3
N1303K	18 / 210	8,5
3849+10kbC>T	13 / 210	6,2
G542X	13 / 210	6,2
W1282X	7 / 210	3,3
3120+1G>A	6 / 210	2,8
R1162X	4 / 210	1,9
G85E	4 / 210	1,9
D1152H	3 / 210	1,4
1717-1G>A	2 / 210	0,95
2789+5G>A	2 / 210	0,95
2184 del A	1 / 210	0,47
2183AA>G	1 / 210	0,47
R334W	1 / 210	0,47
R117H	1 / 210	0,47
R553X	1 / 210	0,47
711+1G>T	1 / 210	0,47
G551D	1 / 210	0,47
Total	149 / 210	70,95

En la **Tabla 3**, se puede observar la evidente diferencia entre nuestros resultados y los reportados por otros autores en Latinoamérica,<sup>10</sup> especialmente en lo que respecta a la mutación F508del con 33,3% vs 59,15% y la presencia/ausencia de la mutación “africana” 3120+1G>A **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Comparación de las mutaciones más frecuentes de nuestro trabajo con las reportadas en la literatura latinoamericana.<sup>10</sup>

Referencia	F508del	G542X	N1303K	W1282X	R1162X	3120+1G>A (africana)
Pérez M, Luna M <sup>10</sup>	59,15%	4,90%	2,25%	2,17%	0,72%	NO
Lentini-Navarta	33,3%	6,2%	8,5%	3,3%	1,9%	SI:2,8%

## Discusión

El diagnóstico de la FQ aún descansa firmemente en sus fenotipos y en la determinación del test del sudor según la técnica clásica de Gibson-Cooke.<sup>11</sup> Las normas actuales de diagnóstico de FQ se resumen en la siguiente Cuadro 4.

**Cuadro 4.**

FQ: el diagnóstico actual es una combinación de la presencia de:	
Una de estas situaciones	Más de una de éstas
1+ Características fenotípicas	Aumento test sudor en 2 ocasiones
Hermano con FQ	2 mutaciones CFQ
Test Pesquisa Neonatal. Positivo (TIR)	Potenciales Nasaes anormales
The diagnosis of Cystic Fibrosis: A consensus statement. Rosenstein B. Cutting G for the Cystic Fibrosis Consensus Panel. J Pediatr 1998;132: 589-95. CFQ: causantes de FQ.	

La incorporación de los estudios genéticos a la ecuación diagnóstica permite la mejor definición del fenotipo fibroquístico, pero a la vez presenta las siguientes limitaciones:

a. El elevado número de mutaciones en el gen CFTR del cromosoma 7 (más de 2.000 a la fecha) y el saber que no todas esas mutaciones son causantes de FQ, así como la imprecisión sobre el papel patogénico de algunas.<sup>12</sup>

b. Algunos enfermos pueden tener grandes deleciones y/o otras mutaciones no detectadas con los “kits” habituales, pero sí a través de nuevas técnicas como NGS (*New Generation Sequencing*).<sup>13</sup>

c. El hecho que no todas las mutaciones detectadas en el locus del cromosoma 7 son causantes de FQ enfermedad.<sup>13</sup>

d. Algunas mutaciones (como la R117H) podrán ser causantes de patología FQ o no, dependiendo de su combinación con otros genes FQ anómalos; que pueden estar en posición “cis” o “trans” (en el mismo cromosoma o en el otro) y también dependiendo del acompañamiento de un número variable de “repeticiones” de las bases T (timina) o GT (guanina timina) en su cercanía.<sup>13</sup>

e. La influencia de factores epigenéticos y/o modificadores de la expresión del gen.<sup>13</sup>

f. La disponibilidad de diferentes métodos para estudios genéticos con variable sensibilidad y cuyo espectro de mutaciones detectables, muchas veces no corresponde al patrón predominante en la población donde se aplica.<sup>14</sup>

g. La existencia de “grupos especiales” de “posibles fibroquísticos”: “SMAF” y “PAF” que arrojan más imprecisiones sobre el diagnóstico, como se discutirá más adelante.

Teniendo en cuenta los hallazgos genéticos del presente trabajo podemos decir que la frecuencia de mutaciones difiere sensiblemente de lo publicado por otros autores sobre población FQ en Argentina.<sup>10</sup> Estas diferencias pueden ser atribuidas a la existencia en nuestra provincia de poblaciones con distinto origen étnico.<sup>15</sup> La mayor diferencia observada es sobre todo en la mutación más frecuente descrita en la raza blanca F508del,

que en dichos reportes es del 59% y en este estudio mendocino es de 33,3%.

Además, en nuestro trabajo encontramos una prevalencia del 2,8% para la mutación 3120+1G>A, de origen africano, la cual puede atribuirse a razones poblacionales, ya que Mendoza, a comienzos del siglo XIX, concentró gran número de pobladores de esa procedencia por ser un paso obligado para la venta de esclavos a Chile.<sup>16</sup> A este hecho histórico puede agregarse el rol protector que ejerce el gen CFTR mutado frente a enfermedades como el cólera, lo cual determina la persistencia de la mutación en la población de raza negra heterocigota sobreviviente, en forma selectiva.<sup>17</sup>

Frente a los resultados de este trabajo, nos encontramos con cifras de mutaciones en posibles enfermos clínicamente sospechosos que plantean las siguientes situaciones:

a. Los PECS con resultados genéticos homocigotos (M/M) o heterocigotos (M/OTRA) determinados con un "kit" para 36 mutaciones causantes de FQ, los clasifica definitivamente como enfermos FQ.

b. Los PECS con una sola mutación causante de FQ (M/NADA).

c. Los PECS donde NO se encuentra ninguna mutación (NADA/NADA).

Con respecto a los grupos (b) y (c), seguramente se pueden plantear las siguientes alternativas "confirmatorias": 1) seguimiento especializado para su confirmación con elementos fenotípicos más "precisos" ie: aparición de cultivos positivos para *Pseudomona aeruginosa* o alteración de las determinaciones de elastasa fecal; 2) esperar la "evolución" del test del sudor;<sup>18</sup> 3) derivar directamente las muestras a Centros de Estudios genéticos de mayor complejidad (casi siempre imposible por sus elevados costos).

Por otra parte, la implementación del mapeo neonatal con TIR y los estudios genéticos han dado lugar a las siguientes complicaciones: Diagnósticos no confirmados o inciertos.

1- SMAF-Q (síndrome metabólico asociado a la FQ).<sup>19</sup>

Recién nacido asintomático que presenta TIR anómalo (hipertripsinogenemia) – en mapeo neonatal - debe ser considerado SMAF si tiene: a) test sudor con valores intermedios cuanto menos en 2 ocasiones y menos de dos mutaciones causantes de FQ o b) test sudor normal y 2 mutaciones F.Q. de las cuales sólo una se sabe es causante de FQ.

2- PAF-Q (Patología asociada a la F.Q.).<sup>20</sup>

"Pacientes con valores de test del sudor intermedios que no tienen o que sólo tienen 1 CFTR y con clínica positiva que sugiere disfunción del CFTR se llamarán PAF-Q (azoospermia, bronquiectasias, pancreatitis aguda o recurrente, sinusitis crónica), dependiendo de su cuadro clínico o historia familiar. Estos enfermos están en "riesgo de ser FQ".

## Limitaciones de este trabajo

1- La derivación al laboratorio de genética de PECS no certifica siempre el diagnóstico de FQ. Esto es más evidente en los lactantes donde son tan frecuentes los cuadros respiratorios repetitivos y/o prolongados que pueden determinar la derivación con la sospecha de PECS.

2- El seguimiento: al no participar del mismo, hace que aquellos enfermos con hallazgos genéticos MUTACIÓN/NADA o NADA/NADA no pueden ser certificados definitivamente como FQ al momento de esta publicación. Desafortunadamente razones económicas impiden aplicar la secuenciación genética a todos los no clasificados.

3- Los "kits" utilizados para estudios genéticos introducen una limitación diagnóstica al estar éstos enfocados en la genética de poblaciones europeas. Si bien la inmigración europea ha sido una parte importante de nuestra historia poblacional, este origen no es el único.

Como fortalezas del presente trabajo podemos citar:

- Que se trata de un estudio genético hecho sobre la población más grande de FQ de Mendoza durante un período de 10 años.
- La relación estrecha del laboratorio de biología molecular con el Centro de Fibrosis Quística permite certificar el diagnóstico con mayor certeza.
- La sistematización de estos estudios genéticos a la mayor parte de los enfermos sospechosos de FQ a partir del TIR permite el diagnóstico precocísimo que es lo aconsejado en la actualidad para proceder a la terapéutica en el inicio de la enfermedad.

## Conclusiones

Las Mutaciones Causantes de Fibrosis Quística encontradas en nuestra población FQ muestran frecuencias muy diferentes a otros reportes de Latinoamérica. La mayor diferencia observada es sobre todo en la mutación más frecuente descrita en la raza blanca F508 del que en dichos estudios es del 59% y en nuestro trabajo mendocino es de 33,3%. La existencia del gen mutado "africano" (3120+1G>A) en nuestra población apoyaría este concepto.

Se sugiere que los siguientes hallazgos podrían clarificar los casos dudosos y asegurar el diagnóstico en los Posibles Pacientes Clínicamente Significativos: verificar la aparición de cultivos positivos para *Pseudomona aeruginosa*, el incremento de elastasa fecal, la cual ha reemplazado al test de Van De Kamer, y la posible positivización del test del sudor con el tiempo.

Tras los nuevos avances genéticos, han quedado "zonas grises" de diagnóstico (SMAF-Q y PAF-Q).

Finalmente, los estudios moleculares han permitido ampliar los conocimientos y han contribuido al diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

**A pesar de todo lo expuesto, el diagnóstico de la FQ sigue siendo directo en un gran porcentaje de casos.**

## Bibliografía

1. Dequeker E, Suhrmann M, Morris M, et al. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR related disorders- updated European recommendations. *Eur J Hum Genet* 2009; 17: 51-65.
2. Tiddens AWM, Donaldson SH, Rosenfeld M, et al. Cystic Fibrosis Disease Starts in the Small Airways: Can we treat it More Effectively? *Pediatr Pulmonol* 2010; 45: 107-117.
3. Lentini ER, López Millán A, Guercio AM, et al. Pesquisa neonatal en fibrosis quística: un modelo de coordinación multidisciplinaria. Ha llegado la hora de los Centros de Fibrosis Quística. *Rev A. Med Arg* 2015; 128: 23-28.
4. Borrajo JC. Newborn screening in Latin America at the beginning of 21st. century. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30: 466-481.
5. LeGrys VA, Yankaskas JR, Quittell L, et al. Diagnostic Sweat Testing: The Cystic Fibrosis Foundations Guidelines. 2006 Cystic Fibrosis Foundation Guidelines. *J Pediatr* 2007; 151: 85-89.
6. Kerem E, Conway S, Elborn S, Heijerman H. Standards of care for patients with cystic fibrosis. A European consensus. *J Cyst Fibros* 2005; 4: 7-26.
7. Lentini ER, López Millán A, Lores AM, et al. Fibrosis Quística: aumento de la sobrevida en un centro especializado a 10 años de seguimiento. *Rev Chil Pediatr* 2014; 3: 281-287.
8. Munck A, Mayell SJ, Winters V, Shawcross A, et al. Cystic Fibrosis Screen Positive Inconclusive Diagnosis (CFSPID): A new designation and management recommendations for infants with an inconclusive diagnosis following newborn screening. *J Cyst Fibros* 2015; 14: 706-713.
9. Williams SN, Nussbaum E, Chin TW, et al. Diagnosis of Cystic Fibrosis in the Kindred of an Infant with CFTR-Related Metabolic Syndrome. Importance of follow-up that includes Monitoring Sweat Chloride Concentrations over time. *Pediatr Pulmonol* 2014; 49: E103-E108.
10. Pérez M, Luna MC, Pivetta OH, et al. CFTR gene analysis in Latin American CF patients. Heterogenous origin and distribution of mutations across the continent. *J Cys Fibrosis* 2007; 6: 194-208.
11. Rosenstein B, Cutting G. The diagnosis of Cystic Fibrosis: A consensus statement. The Cystic Fibrosis Consensus Panel. *J Pediatr* 1998; 132: 589-595.
12. Milla CE, Moss RB. Recent advances in cystic fibrosis. *Curr Opin Pediatr* 2015; 27: 317-324.
13. Castellani C, Cuppens H, Macek M, et al. Consensus and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cys Fibros* 2008; 7: 179-196.
14. Culling B, Ogle R. Genetic Counselling Issues in Cystic Fibrosis. *Ped Respir Reviews* 2010; 11: 75-79.
15. Pigna F. ¿Qué pasó con los afroamericanos? [www.elhistoriador.com.ar](http://www.elhistoriador.com.ar)
16. Argentina Investiga. El tercer componente de la población mendocina es de ascendencia africana. Universidad Nacional de Cuyo, Facultad Ciencias Médicas, Enero 10 de 2011. [www.argentinainvestiga.edu.ar](http://www.argentinainvestiga.edu.ar)
17. Sherif ED, Brigman KN, Koller BH, et al. Cystic Fibrosis Heterozygote Resistance to Cholera Toxin in the Cystic Fibrosis Mouse Model. *Science*, 1994; 266: 107-109.
18. Farrel MF, Rosenstein BJ, White TB, et al. Guidelines for the diagnosis of Cystic Fibrosis in Newborns through Older Adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report. *J Pediatr* 2008; 153: S4-S14.
19. Borowitz D, Parad R.B, Sharp JK, et al. Cystic Fibrosis Foundation Guidelines for the Management of Infants with Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Related Metabolic Syndrome during the First Two Years of Life and Beyond. *J Pediatr* 2009; 155: S106-116.
20. Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, et al. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cys Fibrosis* 2011; 10 Suppl 2: S86-S102.