

ADDENDA

Anàlisi mutacional a la FQ

Els resultats de l'anàlisi mutacional queden, en bona part, recollits a l'article *Human Genetics 1997, 101: 365-370*. No obstant, l'interval de temps de llavors ençà, requereix una actualització de les dades.

La Taula 4 recull 780 pacients de diferents famílies estudiades entre 1988 i agost de 2003. Els pacients i/o mostres van ser trameses per diagnòstic o sospita clínica de les Unitats de FQ o bé per hipertripsinèmia dins del Programa de Detecció Precoç que es porta a terme a Catalunya (Setembre 1999-2003).

Les mostres s'han analitzat d'acord amb les diferents estratègies indicades a l'apartat de Metodologia. L'avantatge de disposar d'equips comercials ha agilitzat l'estudi molecular, reduint el percentatge de mostres que necessiten el cribatge total del gen. L'anàlisi de 31 mutacions freqüents iniciat el 1998, té un nivell de detecció del 76% a la nostra població i permet caracteritzar totalment el 59% dels pacients.

Respecte al treball de 1997 s'ha incrementat tan el nombre de famílies com el de mutacions. Les famílies han passat de 640 a 780 ($\Delta = 22\%$) i les mutacions, de 75 a 108 ($\Delta = 44\%$). S'han caracteritzat 1.516 gens del total analitzat ($n=1.560$), assolint un nivell de detecció del 97% (Taula 4). Trenta-quatre de les mutacions han estat descrites per primer cop a la població espanyola, 20 d'elles formen part d'aquesta memòria. Les mutacions identificades corresponen als diferents tipus, 37% amb "error de sentit", 21% "sense sentit", 19% "*splicing*", 15% "canvi de pauta" i 8% delecions/insercions de diferent tamany. Dotze mutacions (11%) tenen una freqüència superior a l'1% i identifiquen el 76% dels gens FQ. Com a la majoria de poblacions, la mutació F508del és la més freqüentment trobada (51%) sent homocigots per aquesta mutació el 27,5% dels pacients i heterocigots el 47,8%. Altres 13 mutacions (12%) tenen freqüències entre el 0,5% i 1%. Conjuntament, 25 mutacions caracteritzen el 85,8% dels gens. Dintre el grup de mutacions rares, 37 (34%) presenten freqüències entre 0,1% i 0,5% i la resta, 46 mutacions (43%) s'han observat en un únic pacient. La Figura 3 mostra la distribució de les mutacions identificades.

L'anàlisi de microsatèl·lits permet establir l'associació haplotip-mutació. La taula 5 recull els haplotips majoritaris per les mutacions més freqüents.

Taula 5. Haplotips associats a les mutacions més freqüents a la població FQ espanyola

Mutació	(T)n	Haplotip IVS8CA - IVS17bTA	
		majoritari	altres
F508del	9	23-31	++++
G542X	9	23-33	+++
N1303K	9	23-31	++
R334W	7	17-46	+
1811+1.6kbA>G	7	16-46	+
711+1G>T	7	16-25	+
R1162X	7	17-31	+
L206W	9*	16-7	+
Q890X	7	16-7	+
R1066C	7	17-7	+
2789+5G>A	7	17-7	+
I507del	7	16-7	+
G85E	7	16-24	+
1609delCA	7	16-7	+
2869insG	7	16-45	+
712-1G>T	9	23-31	+
W1282X	7	17-7	+
3272-26A>G	7	16-7	+
2183AA>G	7	16-30	+
2184insA	7	16-24	+
K710X	7	16-31	ni
A1006E, 5T	5	16-7	ni
1078delT	7	16-31	ni
621+1G>T	9	21-31	ni
V232D	9	23-35	+

*, 9T-9TG; ni, no identificat

Diagnòstic prenatal

Es consideren dos tipus de parelles, les que tenen un risc de recurrència de 1/4 (alt risc) i les parelles formades per un portador i un membre de la població general, amb un risc inferior ($< 1/260$).

Cent vint-i-dos parelles amb risc de FQ 1/4 han sol·licitat diagnòstic prenatal. En aquest grup s'han realitzat 151 diagnòstics atès que 29 famílies han fet més d'una sol·licitud. Dues parelles presentaven consanguinitat. L'anàlisi directe en les parelles d'alt risc ha estat totalment informativa en 91 casos (60%), si bé, comptabilitzant les parelles entre 1998 i 2003 ($n = 33$) el percentatge arriba al 94% (31/33). Al moment del diagnòstic, l'anàlisi directe no va ser factible en 16 casos i altres 87 van necessitar la combinació d'anàlisi directe i indirecte.

A les parelles de baix risc, l'estimació de FQ al fetus ha variat dependent de les possibilitats d'anàlisi (1/260, 1/400, 1/500). L'utilització d'equips comercials iniciada a l'any 1998, amb un nivell de detecció del 76% a la població espanyola, permet disminuir el risc fins 1 per 400. A més, la detecció de pacients FQ a partir del Programa de Detecció Precoç ha permès una estimació de la prevalença pròxima a 1/5.000 i conseqüentment, el risc *a priori* de ser portador es pot modificar, seguint conservadors, a 1/30. Per tan, ha hagut un canvi quantitatiu important, passant de 1/260 (quan només s'analitzaven les dues mutacions més freqüents) fins a 1/500.

Del grup de parelles de baix risc, 43 van sol·licitar diagnòstic prenatal, una de les parelles presentava consanguinitat. Amb l'excepció de dos casos, les mostres de líquid amniòtic (LA) obtingudes entre les 17-19 setmanes de gestació s'han processat per estudi bioquímic (Dpt. Bioquímica, Hospital Clínic) i molecular.

Les 194 mostres analitzades es distribueixen en: Vellositats corials (VC), $n = 128$ i LA, $n = 62$, de les quals 16 foren post-cultiu i en 4 casos, es van estudiar VC i LA. L'abordatge de l'anàlisi molecular ha estat subjecte a les següents variables: 1) risc de recurrència; 2) setmanes de gestació; 3) estudi genètic previ; 4) disponibilitat de la mostra de l'afectat i 5) informativitat obtinguda en cada cas.

Posteriorment a la prova invasiva es van produir quatre avortaments espontanis (2%), no hi ha constància d'una relació causa-efecte entre ambdós esdeveniments. L'estudi citogenètic evidencià dues alteracions cromosòmiques (1%).

A l'anàlisi de microsatèl·lits, es va detectar diferent grau de contaminació materna en 5 mostres (2,6%), en dos casos es va sol·licitar nova mostra per repetir l'estudi. Amb les diferents estratègies utilitzades, es van diagnosticar 93 portadors (48%), 45 afectats (23%), 31 sans (16%) i 25 no-afectats (13%). El diagnòstic molecular va ser erroni en 1 cas (0,5%).

Detecció de portadors

L'estudi molecular als pares (n = 1.356) corrobora la correcta segregació de les mutacions i ofereix l'informació necessària per altres familiars. A banda dels pares, les sol·licituds per estudi de portadors han estat 1.232, de les quals 1.024 presentaven antecedents familiars i 208 foren membres de la població general.

S'han diagnosticat 611 portadors de la malaltia i 410 sans (Taula 6). A la resta, quatre casos familiars (en els quals no va ser possible un diagnòstic definitiu) i 204 membres de la població general es va fer una estimació de risc en funció de l'estudi molecular.

Taula 6. Resultats obtinguts en la detecció de portadors

Consultant	Portador	Sa	Risc estimat	Total
Pares	1.355	1*	-	1.356
Germans	400	196	2	598
Tiets	140	132	-	272
Cosins/nebots	67	81	2	150
Població general	4	-	204	208
Total	1.966	410	208	2.584

*, família amb la mutació *de novo*

Espectre mutacional a l'agenèsia de conductes deferents

El nombre actual de pacients ABCD és de 163, en els quals s'han caracteritzat 53 mutacions, 37 d'elles són mutacions amb “error de sentit” (70%) i d'aquestes 27 (73%) no s'han observat als pacients FQ.

En relació als genotips, es manté el 15% de pacients sense cap mutació (n = 24), altre 23% (n = 38) presenten una sola mutació i 62% (n = 101) presenten dues. La variant 5T continua sent la més prevalent en aquest grup, 39% (63/163) dels pacients, seguida de la mutació F508del, 37% (60/163). El 29% dels pacients presenten un genotip CFTR / 5T.

Per l'avaluació conjunta dels fenotips relacionats amb *CFTR*, s'ha estimat la freqüència de la variant 1716G/A que representa el 6% (10/163).

Al grup AUCD, n = 61, s'han identificat 18 mutacions en el 54% dels pacients, 33% (20/61) presenten una mutació i 21% (13/61) presenten dues. Així, el percentatge de pacients sense mutacions s'ha reduït al 46% (28/61). La variant 5T s'ha trobat en el 21% dels individus i la variant 1716G/A a l'11%.

Per tant, es mantenen les diferències genotípiques entre ambdós grups, ABCD i AUCD. L'aparent millora de sensibilitat al grup AUCD probablement es deguda al tamany de la mostra, més que a les tècniques moleculars.

Les diferències més significatives observades posteriorment al treball presentat a la memòria (*Hum Reprod 2000, 15: 1476-1483*) són: 1) La detecció de la mutació D443Y a l'exó 9, generalment associada a les mutacions G576A i R668C. La polivariant (D443Y, G576A, R668C) s'ha identificat en el 5% (9/224) dels pacients ACD; 2) L'anàlisi sistemàtica de la seqüència (T)_n-(TG)_m ha evidenciat dos haplotips, sent el 5T-12TG el més prevalent (74%) vers l'haplotip 5T-11TG (26%).

Un llistat de les mutacions amb “error de sentit” identificades en els fenotips relacionats amb FQ i a la població general es recull a la Taula 7.

Finalment, la Figura 3 mostra la distribució en els diferents exons de les mutacions identificades.

Taula 7. Mutacions amb "error de sentit" identificades en fenotips relacionats amb FQ i població general

Mutació	Fenotip	Mutació	Fenotip
S50P *	ABCD /	Q890R *	AUCD
R75Q	AUCD / PC / BQ / HT / PG	S945L	ABCD
D110Y *	ABCD /	M952T	ABCD
R170H	PC	L967S	ABCD
R170C	PC	S977F	ABCD
Q179K	BQ	L997F	ABCD / PC / BQ / HT / PG
R258G	ABCD / PC	Y1014C	ABCD / BQ / HT
M281T *	PC	P1021S *	ABCD
R297Q	PC	K1060T *	ABCD
A349V	ABCD	R1070W	ABCD
L383S *	ABCD / AUCD	F1074L *	ABCD
D443Y #	ABCD / PC	N1148K *	BQ
H484Y *	ABCD	R1162L	PC
G576A	ABCD / PC / BQ / PG	S1235R	ABCD / PC / BQ / HT
V562L	BQ	G1237S *	BQ
H609R	ABCD	N1303H	ABCD
D614G	ABCD	Y1307C *	AUCD
R668C	ABCD / PC / BQ / PG	S1426F *	AZ
V754M	ABCD / BQ		

#, polivariant D443Y, G576A, R668C; *, mutacions noves que recull la memòria ABCD, agenèsia bilateral de conductes deferents; BQ, bronquiectàsies; PG, població general PC, pancreatitis crònica; AUCD, agenèsia unilateral de conductes deferents HT, hipertripsinèmia; AZ, azoospermia

Figura 3. Distribució de les 160 mutacions *CFTR* identificades a la població espanyola

