

## 4. DISCUSSIÓ

---

### *Caracterització molecular de la FQ a la població espanyola*

El clonatge del gen *CFTR* i la identificació de la mutació F508del va suposar un gran avenç en el diagnòstic molecular. Molt aviat es van conèixer les dades de la prevalença de la mutació a Europa constatant que la seva freqüència declinava de Nord a Sud (85%-40%). La freqüència de la mutació F508del a la població espanyola va ser del 50% (Chillón et al. 1990). L'anàlisi combinat de mutació, haplotip associat i procedència a la població d'origen basc ens van permetre observar una distribució desigual vers d'altres regions de la Península Ibèrica. Aquesta població ha estat intensament estudiada des del punt de vista cultural, lingüístic i genètic i és considerada un romanent de la antiga població europea. L'estudi va identificar la mutació en el 86% dels pacients d'origen basc. Atès l'aïllament de la població i el seu origen anterior a les migracions indoeuropees es va postular que la mutació F508del estava ja present a la població del Paleolític i la seva freqüència s'hauria diluït amb les noves mutacions aportades per les successives migracions. La hipòtesi ha estat posteriorment recolzada per l'anàlisi de microsatèl·lits, amb els quals es va fer una estimació de 50.000 anys per l'origen de la mutació F508del (Morral et al. 1993, 1994a). L'anàlisi de la mutació en regions geogràfiques properes a la basca, amb una freqüència superior a la mitja espanyola suggereix que l'aïllament va abastar una població més enllà dels límits de l'actual País Basc. L'alta prevalença observada en la població asturiana (77%) recolza que, efectivament, bona part del litoral cantàbric es va mantenir al marge d'altres influències migratòries (Coto et al. 1994). Els estudis en famílies procedents de Castella i Lleó, on el 65% dels gens tenen la mutació F508del (Telleria et al. 1999) i d'Andalusia, en les quals, la freqüència de la mutació baixa al 46% (Borrego et al. 1994) senyalen un gradient Nord-Sud de la mutació a la Península Ibèrica.

Amb l'anàlisi de 400 famílies es va desenvolupar un estudi de similars característiques focalitzat en la mutació G542X, la segona mutació freqüent (8%). L'estudi recolza l'heterogeneïtat molecular de la nostra població, identificant l'àrea Mediterrània com la de major prevalença (14%), quedant la resta per sota de la mitja general (6%). L'estimació feta a la població canària (25%) no ha estat posteriorment confirmada, ja que un estudi més ampli sobre 32 famílies recull una freqüència del 4,5% (M. Fernández, comunicació personal). L'anàlisi d'haplotips evidencià un haplotip majoritari que suggeria l'origen comú de la mutació a la Península, a més d'una menor dispersió a la mutació G542X vers la F508del, indicant un origen més recent de la primera. Es va postular una difusió durant el període Neolític o posterior. Així mateix, es va postular que la mutació fos introduïda pels fenicis a través de la Mediterrània. El recolzament a la nostra hipòtesi ha estat aportat pel treball de Loirat i col·l. (1997) on s'analitza la distribució de la mutació G542X a Europa i Nord d'Àfrica. S'han descrit freqüències del 10% al 21% a la regió mediterrània, sovint coincidint amb els ports més utilitzats pels fenicis en el seu comerç. El fet de que Tunísia presenti la major incidència (21%), contribueix a enfortir la hipòtesi, ja que la seva localització és propera a l'antiga Cartago, la major ciutat fenícia.

S'ha atribuït als espanyols un efecte fundador a la població mexicana. Villarreal i col·l. (1996) proposen que la mutació G542X hauria estat introduïda a Mèxic al segle XVI. L'estudi considera l'origen espanyol de la població, estimat en un 40% i l'alta incidència de la mutació G542X (7%) respecte a altres poblacions Llatino-Americanes.

Els estudis desenvolupats amb les mutacions F508del i G542X i els haplotips han contribuït al seguiment de les poblacions i migracions que han succeït al llarg de la història de l'home. En aquest sentit, els treballs iniciats pel nostre grup han estat seguits per altres investigadors, que han aportat treballs descrivint l'origen i evolució de les principals mutacions al gen *CFTR* en diferents poblacions (Mateu et al. 2001, 2002; Lao et al. 2003).

Un dels avantatges de l'anàlisi molecular és la possibilitat d'oferir a les famílies el diagnòstic prenatal davant un nou embaràs. Els recursos moleculars han

permès millorar la fiabilitat del diagnòstic, passant dels marcadors extragènics a l'anàlisi directe de mutacions i/o marcadors intragènics, ja sigui microsatèl·lits o altres polimorfismes. Les mostres de vellositat corial són preferibles a les de líquid amniòtic, oferint grans avantatges. La vellositat corial suposa treballar amb comoditat ja que es disposa de material suficient per l'anàlisi. A més, es pot agilitar l'obtenció de resultats mitjançant l'anàlisi simultània de varies mutacions. L'anàlisi directe en líquid amniòtic requereix condicions especials per la poca quantitat de material disponible. El resultat es pot optimitzar utilitzant una *Taq*-polimerasa de major fiabilitat per la PCR preferentment individual de les mutacions. Cal assenyalar que la mostra de líquid amniòtic post-cultiu és de millor qualitat i es minimitza el risc de contaminació materna.

Independentment de la informativitat disponible per l'anàlisi directe, l'any 1992 es va incloure l'anàlisi de microsatèl·lits a totes les mostres, el que aporta informació de la correcta segregació, de l'haplotip associat al gen mutat i de la possible contaminació materna. La contaminació materna fou motiu d'un cas de diagnòstic erroni i per tant s'ha posat molt d'èmfasi en minimitzar i detectar la seva presència. L'anàlisi sistemàtic de microsatèl·lits, així com la utilització de líquid amniòtic post-cultiu, han estat dos punts clau per aquest objectiu. Després del treball presentat a la memòria, només s'ha detectat contaminació materna en una mostra. Per tant, es valora positivament l'anàlisi de líquid amniòtic post-cultiu, amb la qual l'índex de contaminació s'ha reduït per sota del 3%.

Tot i la millora produïda en l'estimació de risc per les parelles amb únicament un portador, s'observa un augment de sol·licituds en aquest grup. A causa de la gran heterogeneïtat molecular, fins l'any 1997 els estudis a membres de la població general es limitava a l'anàlisi de les dues/quatre mutacions més freqüents, el que permetia reduir el risc del fetus al voltant de 1/260. La introducció de sistemes comercials de detecció de mutacions va permetre l'anàlisi múltiple i ràpida assolint un nivell de detecció del 76% i reduint el risc per sota de 1/400. Aquest és un risc baix i es considera "no indicat" per a un diagnòstic prenatal. No obstant, durant els darrers 6 anys i malgrat el descens de natalitat, el nombre de sol·licituds ha estat similar al període anterior (9 anys), el que indica un increment de la demanda en les parelles de

baix risc. Molt probablement, la pròpia evolució de la malaltia i la manca d'un tractament definitiu són els motius de més pes a l'hora de considerar un estudi genètic amb finalitats diagnòstiques. Altre factor que influeix és la informació continuada de temes relacionats amb la genètica a través dels mitjans de comunicació, sovint poc acurada i que genera una certa angoixa a les parelles i influència el seu plantejament davant un embaràs. Aquesta situació fa que no es pugui rebutjar la sol·licitud d'un estudi prenatal. La implementació de l'assessorament genètic a Espanya permetria una atenció adequada a les parelles i redundaria en un ús més racional dels recursos sanitaris.

La sensibilitat dels equips ecogràfics permet la detecció d'alteracions fètales que anteriorment passaven desapercebudes. Una d'aquestes millores és la detecció de la hiperrefringència intestinal, que es pot atribuir a l'obstrucció intestinal i que per tant, precisa descartar el diagnòstic de FQ. L'observació ecogràfica es fa al voltant de les 20 setmanes de gestació pel que requereix una detecció molecular ràpida. Generalment, es tracta de parelles sense història familiar de la malaltia i el procediment que es segueix és el mateix indicat per la població general. Descartades les mutacions freqüents als progenitors, el risc del fetus disminueix considerablement. Muller i col·l. (1998) estimen en aquests fetus una incidència de FQ del 3%, tres vegades superior al 0,8% descrit per Berlin i col·l. (1999). D'altra banda, un 15% de nadons amb FQ presenten al néixer ili meconial (IM). A la nostra casuística el percentatge de FQ-IM és inferior (10%) i l'estudi genètic no evidència una associació específica amb cap mutació. De fet, el percentatge d'homocigots F508del en aquest grup (28%) és similar al conjunt de pacients; l'anàlisi de mutacions freqüents i microsatèl·lits, permet detectar al menys una mutació en la majoria de nadons FQ (> 98%) que presenten IM. Per tant, l'anàlisi que s'ofereix a les parelles en aquesta situació és adequat, atès la incidència, la sensibilitat de l'estudi i la necessitat d'un resultat ràpid.

L'heterogeneïtat molecular de les poblacions al Sud d'Europa s'havia postulat a partir dels haplotips obtinguts amb marcadors extragènics (Estivill et al. 1987b). Posteriorment, l'anàlisi de la mutació F508del i els haplotips de microsatèl·lits van

recolzar la hipòtesi inicial (Morral et al. 1994a). En aquest context, la cerca de mutacions en les regions codificants i annexes suposava la seqüenciació de aproximadament unes 10 kb per pacient, una tasca que sobrepassava les capacitats d'anàlisi de la majoria dels centres. Per abordar aquesta diversitat molecular es van utilitzar tècniques de cribatge, que a mida que s'han simplificat han augmentat l'eficàcia del diagnòstic genètic, millorant la sensibilitat i escurçant el temps d'anàlisi.

L'espectre mutacional que s'observa a les taules (article Human Genetics 1997 i addenda Taula 4), denota un lleuger descens en les freqüències de les mutacions F508del i G542X. Aquesta desviació no és atribuïble al tamany de la mostra que és prou considerable en ambdós estudis, més aviat respon a un biaix degut a que la seva anàlisi és fàcilment accessible pels diversos laboratoris de diagnòstic. D'aquesta manera, una part dels estudis que arriben al nostre centre corresponen a casos no totalment caracteritzats. En conseqüència ha augmentat el nombre de mutacions amb freqüència superior a l'1%. Actualment, el llindar de l'1% comprèn 12 mutacions que identifiquen el 76% dels gens. Cal destacar en aquest grup la mutació L206W, amb un increment del 0,9%. La mutació L206W està associada a una clínica lleu i és molt probable que el diagnòstic en pacients adults sigui la causa del seu increment. Quatre de les mutacions freqüents a la nostra població, 1811+1,6kbA>G, L206W, Q890X i R1066C no es troben als equips comercials d'anàlisi. Una aproximació indirecta a l'estudi molecular de FQ es pot fer mitjançant l'haplotip, quan es disposa d'una associació específica entre una mutació i un haplotip determinat (Taula 5), o amb les tècniques de cribatge. Alternativament, totes les mostres s'haurien d'analitzar per les mutacions que se sap són més freqüents a una població determinada.

El nivell de detecció del 97% suposa caracteritzar al menys una mutació en els pacients FQ, una diferència important respecte als equips comercials d'anàlisi mutacional amb un nivell de detecció inferior (76%). Els sistemes d'anàlisi comercials actuals estan basats en les mutacions responsables de FQ més freqüents a la població mundial; en conseqüència, la seva sensibilitat és inversament proporcional al grau d'heterogeneïtat de la població i és molt reduïda quan s'utilitzen per l'estudi d'altres fenotips associats a mutacions al gen *CFTR*.

Els resultats de l'anàlisi mutacional estan d'acord amb la gran heterogeneïtat molecular al Sud d'Europa. Concretament, a la població espanyola el 77% de les mutacions (n = 83) tenen una freqüència per sota del 0,5% i representen l'11% dels al·lels FQ. D'aquestes, 46 s'han identificat en un únic pacient, el que indica que tenim un nombre important de mutacions rares. Les dades aportades indiquen inequívocament l'alta heterogeneïtat molecular de la FQ a la població espanyola, en consonància amb els estudis realitzats a altres països mediterranis (Rendine et al. 1997; Claustres et al. 2000; Kanavakis et al. 2003).

L'abordatge molecular per l'estudi de la FQ i dels fenotips relacionats requereix encara un considerable esforç. És previsible que en els propers anys la tecnologia d'analitzadors multicanals i xips permetrà millorar la capacitat diagnòstica. Els analitzadors multicanals ofereixen la possibilitat de seqüenciar els gens directament (Strom et al. 2003) agilitant l'obtenció de resultats. D'altra banda, el disseny de xips (Kolchinsky et al. 2002; Zhong et al. 2003) permet incloure milers de punts i per tant, serà factible no únicament la detecció de mutacions al gen *CFTR* sinó també la identificació d'altres variants genètiques dels pacients vers la malaltia. És a dir, un únic xip permetrà l'anàlisi del gen d'interès i d'altres candidats a modificar la seva expressió, modificant la susceptibilitat a determinades infeccions o la resistència a fàrmacs i altres que puguin sorgir en el futur. Si bé aquesta part tardarà un cert temps a estar a punt, la primera és factible que estigui en pràctica en el decurs dels propers mesos, utilitzant sistemes d'anàlisi multicanal o microxips.

Ocasionalment, els estudis de segregació posen de manifest discordances en el genotipatge que requereixen una anàlisi més detallada per tal d'esbrinar el seu origen. Es poden donar diverses situacions, la mutació s'identifica al pacient però no als pares, o alternativament, el fill no hereta la mutació del progenitor. Confirmada la paternitat i descartada la posició *cis* quan concorren dues mutacions, es planteja la possibilitat d'una recombinació gènica o bé una mutació *de novo*. Ambdós processos s'han descrit a la regió del *locus CFTR*. Els fenòmens de recombinació entre marcadors de la regió candidata van ser claus en la identificació del gen. Els treballs de Berger i col·l. (1987) i Farrall i col·l. (1988) aportaren 7 famílies fonamentals per

definir l'ordre dels marcadors a la regió i la posició del *locus* FQ entre pKM.19 (D7S23) i pJ3.11 (D7S8). Ja identificat el gen, Fernández i col·l. (1990) en una família espanyola, descriuen una recombinació entre *MET* i pKM.19 d'origen patern. L'anàlisi de la mutació F508del, confirmà que efectivament es tractava d'una recombinació, heretant el fill el gen *CFTR* normal patern. A la vista dels casos publicats es dedueix que el fenomen de recombinació en el sí de la regió *CFTR* és rar, però no menyspreable.

La manca de segregació en l'anàlisi de la mutació L1065R afectava únicament a la mutació i no als marcadors extra i intragènics de la regió, el que va suggerir la possibilitat de que es tractés d'una mutació *de novo*. Es va considerar la repetició de l'estudi familiar així com proves complementàries (paternitat i estudis de FISH) que poguessin explicar la discordança de l'anàlisi. Sense cap evidència en contra, es va consolidar la hipòtesi de que la mutació es produís *de novo*. No obstant, no es va poder esbrinar amb exactitud l'estadi en el qual esdevingué la mutació.

Contràriament al que cabria pensar per l'elevat nombre de mutacions descrites, es considera que la taxa de mutació al *locus CFTR* és molt baixa. De fet, únicament s'han descrit altres dos casos on la mutació apareix *de novo* (White et al. 1991; Cremonesi et al. 1996). Les tres mutacions tenen en comú l'origen patern, el que permet especular que la taxa de mutació a *CFTR* és major als gàmetes masculins. És interessant assenyalar que l'exó 17b forma part del bucle que uneix els segments transmembrana 10 i 11 i que concentra un considerable nombre de mutacions, 69 en 228 pb, de les quals set es troben en els codons 1065 i 1066 (3 i 4, respectivament), aquest últim conté una seqüència CpG (potencialment *hot spot* per a mutacions) que explicaria la recurrència de mutacions a la regió. Les mutacions als dominis transmembrana afecten previsiblement la formació del porus i s'associen a fenotips lleus. No obstant al menys 4 de les 7 mutacions esmentades (L1065F, L1065R, R1066C i R1066H) tenen una expressió fenotípica greu o variable. Seibert i col·l. (1996) proposen que els bucles són responsables de la interacció entre els dominis TMs i NBs, tenint una activitat funcional que explicaria el fenotip FQ. En tal cas, el desxiframent del mecanisme de interacció pot ajudar a explicar les diferències fenotípiques.

Com és possible que una regió en la qual s'han descrit més de 1000 variacions de seqüència resulti tant aparentment estable? quins factors intervenen en l'aparició i manteniment de tantes mutacions al gen *CFTR*? La hipòtesi de l'aventatge pels heterocigots (Gabriel et al. 1994; Pier et al. 1998) és la més versemblant, atès que l'acumulació de gens deleteris es produeix sota condicions ambientals específiques que una vegada desaparegudes permeten recuperar l'estabilitat als gens. D'altra banda, l'elevada heterogeneïtat a la població espanyola seria el resultat de la gran mobilitat poblacional que ha sofert la Península Ibèrica en el decurs de la història, amb diversos grups ètnics aportant diferents mutacions. És difícil valorar si hi ha una correlació entre la menor prevalença de la malaltia a la població espanyola i la major heterogeneïtat per a mutacions al *locus CFTR* en comparació amb altres poblacions del Nord i Centre d'Europa (Schwartz et al. 1992; Tummler et al. 1996; Stuhmann et al. 1997).

### ***Correlació genotip-fenotip***

Les conseqüències fenotípiques de mutacions greus del tipus “sense sentit”, “canvi de pauta” o “*splicing*”, que condueixen a la interrupció de la síntesi de proteïna o bé a una proteïna no funcional, són previsible i associades a un quadre de FQ greu. El que succeeix quan es tracta d'una mutació amb “error de sentit” és més complex. El canvi d'aminoàcid pot afectar la conformació de la molècula i dificultar o impedir la seva regulació i/o la dels altres canals dependents de CFTR. En tot cas, es disposa d'una proteïna de la qual extreure informació referent al canvi d'aminoàcid i al domini on es localitza.

Els estudis de correlació genotip-fenotip han tingut diverses dificultats. En primer lloc, l'heterogeneïtat molecular ha estat un entrebanc a l'hora de reunir el suficient nombre de pacients i sovint ha calgut recórrer a estudis multicèntrics per tal de poder aportar un mínim de dades clíniques que donessin fiabilitat als estudis. El segon problema ha estat el grup de referència, format per pacients amb una forma greu de la malaltia. En els primers estudis es va considerar que un grup nombrós d'homocigots F508del, mutació associada a fenotip greu, era suficient. Així es va procedir en l'anàlisi de la mutació R1066C, on el grup control pràcticament va



quaduplicar el grup d'estudi. Amb tot, la diferència de l'edat mitja entre els pacients dels dos grups presentava significació estadística i es va postular com la causa de les diferències clíniques i complicacions observades al grup R1066C. El fet d'haver identificat dos afectats homocigots per la mutació, va contribuir a recolzar la hipòtesi de que es tractava d'una mutació greu.

En altres ocasions les discordances clíniques en pacients del mateix genotip van recolzar l'existència de factors ambientals i genètics modificadors del fenotip. Sorprenentment, al voltant de l'1% dels pacients homocigots per la mutació F508del presenten un fenotip FQ-SP (Kerem et al. 1990a). El nostre treball (Estivill et al. 1995) en pacients portadors de la mutació R334W va mostrar discrepàncies inter i intrafamiliars per a diferents genotips, reafirmant la presència d'altres factors implicats en el desenvolupament de la malaltia. Per tal de reduir al mínim les variables, en estudis posteriors s'han restringit les característiques del grup control (mateix sexe, edat i centre de referència) i, en la mida del possible, s'inclouen dos controls per cada pacient (Amaral et al. 2001). Amb l'objectiu de tenir més referències, altres treballs introdueixen un tercer grup a l'altre extrem de l'espectre, és a dir, un grup control format per pacients FQ-SP (Decaestecker et al. *sotmès*). Aquest estricte aparellament cas-control permet conclusions més acurades. Sens dubte, és un bon ajut per tal de donar solidesa a les conclusions el contar amb individus homocigots per la mutació en estudi. Malauradament, una vegada més, l'heterogeneïtat molecular fa que aquests pacients siguin molt escassos amb excepció de la mutació F508del i alguna altra específicament freqüent (W1282X a la població Ashkenazi).

Tanmateix, els estudis de correlació genotip-fenotip permeten especular sobre quin paper juga cadascun dels dominis de la proteïna. Es considera que les mutacions als dominis transmembrana afecten la regulació i conducció del porus i són responsables d'un fenotip variable. Poc es coneix el paper de les mutacions als bucles intra i extra cel·lulars. Les mutacions L1065R i R1066C, es localitzen al darrer bucle del citosol entre els segments transmembrana 10 i 11 i s'han trobat associades a fenotip FQ-IP. Algunes particularitats d'aquestes regions de la proteïna suggereixen funcions específiques. En primer lloc la diferència de tamany. Els sis bucles

extracel·lulars tenen una mitja de 9 aminoàcids/bucle, mentre que al citosol la mitja és de 61 aminoàcids/bucle. És raonable pensar que els bucles al citosol participen més activament en la conformació molecular i que alterant l'estructura terciària poden modificar l'activitat del canal. Segon, la interacció entre CFTR i altres proteïnes es produeix al citosol. Proteïnes que regulen l'activitat del canal s'uneixen als extrems NH<sub>2</sub>- (syntaxina A1) i COOH- terminal (proteïnes amb dominis PDZ) i s'ha postulat la participació dels bucles en aquests lligams inter-proteïnes. Seguint aquest fil, es pot especular que els bucles més propers als extrems NH<sub>2</sub>- i COOH- juguen un paper clau. Per tal d'analitzar aquesta hipòtesi, hem considerat el nombre de mutacions, el percentatge de mutacions amb "error de sentit" i el percentatge d'aquestes que associen a fenotip FQ-IP. Als bucles extracel·lulars s'han comptabilitzat 45 mutacions, de les quals el 58% són amb "error de sentit" i el 4% estan associades a FQ-IP. Als bucles del citosol, el nombre de mutacions és de 180, un 53% amb "error de sentit", un 24% de les quals presenten fenotip FQ-IP. Per tant, el percentatge de mutacions amb "error de sentit" és similar en ambdues regions, el que marca la diferència és el percentatge de mutacions associades al fenotip FQ-IP (4% vs 24%). Insistent en aquest punt, s'ha analitzat la distribució al citosol i s'ha observat que aquesta no és homogènia, presentant un percentatge més alt als dos bucles propers als extrems NH<sub>2</sub>- i COOH-, 23%, 10%, 13% i 36% respectivament, en direcció 5' > 3'. Aquesta anàlisi no és en absolut concloent però suggereix una major rellevància dels bucles extrems localitzats al citosol.

Un altre factor a tenir en compte és el canvi d'aminoàcid que es produeix en cada mutació. A les mutacions L1065R i R1066C intervé l'arginina, un aminoàcid amb càrrega positiva, que en un cas es guanya (L1065R) i a l'altre es perd (R1066C). La repercussió de la càrrega no sempre és fàcil de definir i en tot cas no sembla definitiva, atès que les mutacions R1066C i R1066H produeixen el mateix canvi de càrrega, estant la darrera associada a diferents fenotips (FQ-IP, FQ-SP i infertilitat).

En conjunt, els estudis de correlació genotip-fenotip es basen en pocs pacients i sovint en un de sol, per tant, les conclusions s'han de prendre amb prudència a l'espera del suport d'altres estudis. La gravetat de la mutació R1066C, ha estat recolzada per l'estudi de la proteïna en línies cel·lulars (Fanen et al. 1997). El treball

va demostrar l'absència de proteïna mutant madura, descartant qualsevol activitat. Els autors proposen la formació de ponts disulfur entre cisteïnes com responsables de la modificació de l'estructura molecular i la inviabilitat de la proteïna.

Les conclusions dels treballs de correlació genotip-fenotip i l'estudi funcional recolzen la gravetat de la mutació R1066C i senyalen les greus conseqüències que poden tenir les mutacions localitzades als bucles del citosol.

### ***Anàlisi mutacional del gen CFTR en agenèsia de conductes deferents, pancreatitis crònica i bronquiectàsies***

L'ABCD és el grup d'entitats clíniques relacionades amb el gen *CFTR* més àmpliament estudiat i en el qual s'han obtingut resultats més unànimes. S'han identificat mutacions *CFTR* en el 85% dels pacients, presentant dues mutacions/variants el 62% dels casos. En conseqüència, s'ha acceptat sense reserves l'expressió genal de *CFTR* i la seva causalitat en el desenvolupament de la infertilitat masculina.

El coneixement de les bases moleculars a l'ACD i l'elevada incidència de la FQ a la població han propiciat la inclusió del gen *CFTR* en els protocols d'infertilitat. Tot i no disposar d'una solució quirúrgica per revertir el fenotip ABCD, les actuals tècniques de reproducció assistida permeten aspirar els espermatozoides per la posterior fecundació i implantació dels embrions. Òbviament, aquesta via d'accés a la paternitat per individus amb espermatoogènesi conservada s'ha d'acompanyar de l'assessorament genètic a les parelles que consulten per aquest motiu.

Paral·lelament, ha augmentat de forma progressiva el coneixement sobre els fenotips relacionats amb el gen *CFTR*. En general, la selecció de pacients i la sensibilitat de l'anàlisi molecular han proporcionat discrepàncies en els resultats, afavorint el desenvolupament de nous estudis per tal de definir la implicació del gen *CFTR* en les diferents expressions clíniques. Per tal d'oferir una visió global, la memòria presenta, a més dels fenotips ACD, dos treballs realitzats en pacients afectats de pancreatitis crònica (PC) i bronquiectàsies (BQ), l'últim encara sotmès per publicació.

Els resultats de l'anàlisi molecular en aquestes patologies evidencien

característiques genotípiques específiques a cadascuna d'elles. Per exemple, el paper rellevant de la variant 5T en el fenotip ACD (ABCD 39%; AUCD 21%), mentre que als altres grups les freqüències trobades (7,3% PC; 6,8% BQ) són similars a la població general (9,4%). La penetrància de la variant 5T depèn de l'eficiència de l'*splicing*, en la qual intervenen les seqüències (TG)<sub>m</sub> i el polimorfisme M470V. Com més petita és la seqüència de timidines (5T) i major la seqüència TG (13TG) pitjor és l'eficiència de l'*splicing*. La contribució del polimorfisme M470V, ve determinada per la hiperfuncionalitat de M470 vers V470. L'haplotip 5T-12TG-V470 és el més freqüent en l'ABCD, mentre que altres combinacions s'associen a població fèrtil (5T-11TG-M470) o a FQ lleu (5T-13TG-V470) (Cuppens et al. 1998). La penetrància variable de l'al·lel 5T en funció de l'haplotip que l'acompanya ha permès explicar la seva presència en fenotips patològics i a la població general.

La segona variant que demana atenció és la 1716G/A, aquest canvi a l'últim nucleòtid de l'exó 10 determina la seva pèrdua (Dork et al. 1997). Com l'al·lel 5T, aquesta variant és freqüent a la població general (12%) i té una elevada prevalença, encara que no significativa, en els pacients amb PC idiopàtica, on representa el 22,5%. Aquest resultat contrasta amb l'observat a la resta de grups (PC etílica 5,4%; BQ 3,4%; ABCD 6% i AUCD 11%) i es proposa com un factor de predisposició per PC idiopàtica.

Les característiques comunes més destriables dels quatre fenotips són l'heterogeneïtat molecular i l'espectre diferent de mutacions respecte a FQ (articles 7 i 8, manuscrit 9 i Taula 7). El número de mutacions varia de 16 (PC, BQ) a 53 (ABCD). Excepte el grup ABCD, on el 62% presenten dues mutacions, a la resta dels fenotips predominen genotips amb una sola mutació/variant (25% BQ; 33% AUCD i 35% PC). Pel que fa a l'espectre mutacional, les diferències venen marcades per un increment de mutacions amb "error de sentit", que suposen més del 50% del total caracteritzades (AUCD 56%, ABCD 70%, PC 75% i BQ 78%) vers el 37% identificat en FQ.

L'estudi del gen a la població general (Lázaro et al. 1999) va evidenciar que determinats canvis d'aminoàcid són relativament freqüents. De fet, algunes mutacions amb "error de sentit" van ser descrites en gens normals, de població general o en

individus portadors. Considerant de forma conjunta mutacions i variants, el percentatge a la població general és similar (32%) al trobat en aquests fenotips, el que no exclou, però qüestiona la seva implicació en l'expressió clínica.

Les mutacions amb “error de sentit” han estat majorment associades a alteracions estructurals (R1066C) (Fanen et al. 1997) o relacionades amb l'activitat reguladora de la proteïna (G551D) (Fulmer et al. 1995), anul·lant o reduint la seva activitat. Aquestes proteïnes són una eina valuosa per comprendre el tipus de disfunció del canal CFTR. La mutació S1235R, s'ha identificat amb relativa freqüència en pacients que presenten una clínica suggestiva de FQ, però que no compleixen els criteris diagnòstics. Diferents treballs en infants amb test de la suor intermig, identifiquen un percentatge elevat de mutacions, destacant la S1235R entre d'altres (Desmarquest et al. 2000; Lebecque et al. 2002). El grup de Monahan i col·l (2000) també identifica la mateixa mutació en el 1,6% d'una sèrie de 3.000 individus amb clínica suggestiva de FQ i asimptomàtics. No obstant, l'estudi funcional de la proteïna no va ser conclouent (Wei et al. 2000). D'una banda, ambdues proteïnes, S1235 i R1235, presenten el fragment glicosilat corresponent a la proteïna madura i de l'altre, l'expressió en oòcits de *Xenopus laevis* registra el pas de clorur en la mutant R1235, amb petites diferències depenent d'altres variacions de seqüència en *cis* (M470, V470) que no semblen modificar l'activitat de la proteïna. Per tant, no hi ha evidència d'alteració estructural ni fisiològica atribuïble a la mutant R1235. Amb tot, els autors no exclouen que la mutació, localitzada en el domini NB2, pugui interferir en la interacció de CFTR amb altres proteïnes, impedit o reduint la seva funcionalitat. A la nostra casuística, la mutació S1235R ha estat identificada en diferents fenotips i en nadons asimptomàtics detectats per hipertripsinèmia (Taula 7).

Per tal d'explicar l'alta freqüència de mutacions amb “error de sentit” alguns autors proposen la intervenció de polimorfismes silents que localitzats en *trans* amb una mutació acabarien donant expressió clínica. La prevalença de l'al·lel M470 en combinació amb mutacions amb “error de sentit” en pacients afectats d'asma (Lázaro et al. 1999) i rinosinusitis (Wang et al. 2000), suggereix una hiperfunció de CFTR a les cèl·lules respiratòries.

Treballs previs van demostrar que l'expressió de CFTR és dependent de teixit

i que el punt d'inici de la transcripció està evolutivament determinat. Tot i això, encara es coneixen poc els mecanismes que regulen l'expressió del gen. Pagani i col·l. (2003) descriuen un nou mecanisme d'actuació per mutacions amb "error de sentit", dues de les quals, D565G i G576A, apareixen freqüentment als fenotips relacionats amb FQ, bé de forma aïllada o com polivariant acompanyades del canvi R668C. El treball investiga el procés d'*splicing* de l'exó 12 en tres mutacions amb "error de sentit", D565G, G576A i Y577F. La quantificació dels transcrits va evidenciar la pèrdua de l'exó en les mutacions D565G (10%) i G576A (12%), una pèrdua que s'accentua fins el 60% i 80% respectivament quan s'afegeix la R668C, resultant un nivell baix de proteïna funcional. Per contra, l'eficiència de l'*splicing* no es veu afectada per la mutació Y577F. Amb l'objectiu d'una anàlisi més acurada de la regulació de l'*splicing*, es va procedir a la construcció de minigens amb cadascuna de les mutacions. Novament, la quantificació de transcrits va evidenciar la pèrdua de l'exó, sent el resultat encara més contundent que l'estudi *in vivo*, arribant al 65% per la mutació D565G i 93% per la mutació G576A. Analitzant els factors que regulen l'*splicing*, els autors identifiquen seqüències exòniques que intervenen en aquest procés, induint nivells variables de proteïna normal. L'efecte d'aquestes seqüències "CERES" (element exònic complex regulador de l'*splicing*) és variable i depèn de la posició i del canvi de nucleòtid. La concentració dels factors de regulació externs serien determinants en el nivell d'expressió a cada teixit i aquests podrien ser modificat per les variacions en les seqüències CERES, conduint a la variabilitat fenotípica. Els autors especulen sobre l'existència de seqüències CERES en altres regions i senyalen l'interès d'estudiar el RNA quan s'identifica un canvi nucleotídic, independentment de si determina o no una substitució de l'aminoàcid.

Esbrinant els mecanismes de regulació, dos nous treballs (Thomas et al. 2003; Williams et al. 2003) senyalen les regions intròniques conservades com elements potencials de la regulació. L'anàlisi comparativa de la seqüència de *CFTR* humana amb altres espècies de mamífers que tenen un patró d'expressió similar, ovella, vaca i porc (Williams et al. 2003) identifica seqüències d'alta homologia, suggerint mecanismes de regulació comuns. Els autors postulen que aquests mecanismes de regulació podrien dependre de la unió amb factors de transcripció o del reconeixement de

proteïnes necessàries per mantenir la conformació idònia per portar a terme la transcripció adequada del gen *CFTR*.

Malgrat els avenços en el coneixement de les diferents entitats clíniques relacionades amb la FQ, continua la recerca per definir el paper de *CFTR* als diferents fenotips i es manté la incertesa per la classificació dels pacients que presenten afectació d'un únic òrgan, prova de la suor normal o al límit i una mutació *CFTR*. L'aportació de proves diagnòstiques més sensibles, com la diferència de potencial nasal, no són encara a l'abast general i no sempre resulten conclouents (Lebecque et al. 2002). Provisionalment, es proposen termes més abstractes, com "pre-FQ", "FQ-subclínica" (Bush et al. 2000) o "FQ i malalties relacionades" (WHO 2002) a l'espera de més informació que faciliti el consens sobre aquestes diferents formes clíniques relacionades amb el gen *CFTR*.