

Convención Internacional de Salud, Cuba Salud 2018

Logros, retos y perspectivas del diagnóstico molecular de las enfermedades de origen genético. Uso de la Bioinformática.

Clark Feoktistova, Yulia¹
Ruenes Domech, Caridad²
García Bacallao, Elsa³
Collazo Mesa, Teresa⁴
Feoktistova, Liudmila⁵
Roblejo Balbuena, Hilda⁶
Clark Feoktistova, Iliana⁷
Morales Peralta, Estela⁸
Espinosa López, Georgina⁹
Maragoto Rizo, Carlos¹⁰

- 1-Universidad de Guantánamo. Departamento Biología Molecular. Cuba. Correo: feoktistova@cug.co.cu
2-Instituto Nacional de Gastroenterología. Dirección. Cuba. Correo: rueness@infomed.sld.cu
3- Instituto Nacional de Gastroenterología. Departamento Docencia. Cuba. Correo: egarcias@infomed.sld.cu
4- Centro Nacional de Genética Médica. Departamento Biología Molecular. Cuba. Correo: tcollaso@infomed.sld.cu
5- Universidad de Guantánamo. Departamento Lenguas Extranjeras. Cuba. Correo: liudmilafv@cug.co.cu
6-Centro Nacional de Genética Médica. Departamento Docencia. Cuba. Correo: hilda@infomed.sld.cu
7- Centro Universitario El Salvador. Departamento Estadística. Correo: iliana.clark@gtmo.inf.cu
8- Hospital Universitario 10 de Octubre. Cuba. Correo: fornari@infomed.sld.cu
9-Universidad de la Habana. Departamento Bioquímica. Cuba. Correo: georginas@fbio.uh.cu
10- Centro Internacional Restauración Neurológica. Departamento Trastorno del movimiento. Cuba Correo: maragot@infomed.sld.cu

Resumen: El diagnóstico molecular de las enfermedades genéticas en la actualidad es una herramienta vital para el diagnóstico, prevención y tratamiento de las mismas. Las enfermedades genéticas constituyen un problema de salud a nivel mundial y en muchos casos el diagnóstico clínico y molecular es complejo. Existen programas predictores para la caracterización funcional de las mutaciones, los cuales, son necesarios para la comprensión de diversas enfermedades. Objetivo: Visualizar el impacto del uso de las herramientas bioinformáticas en el diagnóstico molecular. Materiales y Métodos: Se realizó un estudio retrospectivo y se analizaron nueve mutaciones que han sido identificadas en pacientes cubanos que presentaron enfermedades como: Enfermedad de Wilson, Fibrosis Quística y Hemocromatosis tipo 1. Las mutaciones fueron detectadas por digestión enzimática y secuenciación. Se utilizaron los siguientes predictores bioinformáticos: SIFT y PolyPhen-2. Resultados: Se analizaron las siguientes mutaciones: p.N41S, p.M645R, p.L708P, p.H1069Q, R334W, Y109C, N1303K, H63D y C282Y. Se identificaron portadores, asintomáticos, heterocigóticos compuestos y homocigóticos en las familias analizadas. Con el uso de los predictores bioinformáticos el análisis funcional fue: dos con daño posible, dos Benigna, cinco con daño muy probable y siete de las mutaciones son deletéreas y dos no deletérea. Conclusiones: Se caracteriza mediante herramientas bioinformáticas el impacto funcional de las mutaciones identificadas en pacientes cubanos con enfermedades genéticas, esenciales para el entendimiento de la causa molecular de las mismas y son útiles para el Asesoramiento Genético de las familias afectadas.

Palabras claves: enfermedades genéticas, diagnóstico molecular, bioinformática.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades genéticas constituyen un problema de salud a nivel mundial. Es fundamental el diagnóstico clínico y molecular en familias que las presentan. En Cuba en el centro Nacional de Genética Médica se diagnostican disímiles enfermedades de origen genético, entre las cuales se encuentran: Fibrosis Quística, enfermedad de Wilson y la Hemocromatosis tipo 1, estas presentan un patrón de herencia autosómico recesivo y la causa de las mismas son las mutaciones en los genes *cftr*, *atp7b* y *hfe* respectivamente.

En Cuba existe la fortaleza de tener una comisión Nacional de Fibrosis Quística, una red nacional de Genética Médica, red nacional de Gastroenterología que permiten estudiar gran cantidad de pacientes con enfermedades genéticas.

El diagnóstico precoz es fundamental, debido a la elevada morbimortalidad asociada a estas enfermedades. Los pacientes presentan gran variabilidad de los síntomas y es esencial un alto índice de sospecha clínica. La información de las pruebas de laboratorio es imprescindible para el diagnóstico. En todos los casos es necesaria la correcta interpretación combinada de la información obtenida en las pruebas complementarias con la clínica. La identificación de las mutaciones en los genes responsables de la Fibrosis Quística, la enfermedad de Wilson y la Hemocromatosis tipo 1, es importante antes de instaurar un tratamiento médico para toda la vida¹.

El diagnóstico molecular es complejo y se han descrito más de 600 mutaciones en pacientes con la enfermedad de Wilson, más de 2 000 en pacientes fibroquísticos y más de 200 en pacientes con hemocromatosis tipo 1. Muchas mutaciones son raras, pues se identifican en diversos casos en el 1- 2 % de las poblaciones estudiadas². El estudio molecular posibilita la identificación de portadores e individuos asintomáticos en las familias, la realización del diagnóstico precoz y la detección del espectro de mutaciones en las diversas regiones³.

Con el avance de la tecnología cada vez más se desarrollan herramientas bioinformáticas como el Polyphen-2 y SIFT que permiten predecir las causas funcionales de las mutaciones identificadas en pacientes con enfermedades genéticas⁴⁻⁵. El programa Polyphen-2 de sus siglas en inglés *Polymorphisms Phenotyping* calcula las diferencias entre los valores obtenidos para las variantes normales y las mutantes. Se analiza la estructura de los aminoácidos, la hidrofobicidad, las interacciones electrostáticas, entre otras. La predicción se clasifica en perjudicial con daño probable, perjudicial con daño posible y benigno en dependencia a la puntuación obtenida⁵.

En los pacientes con diagnóstico clínico dudoso es imprescindible el diagnóstico molecular. El estudio molecular le permite al especialista predecir la gravedad en muchos casos de la enfermedad y así instaurar el tratamiento necesario. Con la integración del diagnóstico clínico, molecular y las herramientas bioinformáticas es posible mejorar la calidad de vida de los pacientes con enfermedades genéticas.

II. MÉTODO

Se realizó un estudio retrospectivo en un total de 45 pacientes, de ellos, 15 con Fibrosis Quística, 20 con la enfermedad de Wilson y diez con Hemocromatosis tipo I. El diagnóstico molecular se realizó en el Centro Nacional de Genética Médica, en los laboratorios de Biología Molecular. El diagnóstico clínico de los pacientes con la enfermedad de Wilson y Hemocromatosis tipo I se efectuó en el Instituto Nacional de Gastroenterología y en el Centro de Restauración Neurológica. Los pacientes con Fibrosis Quística fueron diagnosticados por la comisión Nacional de Fibrosis Quística. La evaluación se realizó por un equipo multidisciplinario. Las personas estudiadas dieron su consentimiento por escrito de participar en la investigación, mediante el documento elaborado para tal fin, de acuerdo con los principios éticos de la declaración de Helsinki y Edimburgo de Octubre del 2000 para las investigaciones médicas en seres humanos.

Se extrajo el ADN por el método de precipitación salina⁶. Las mutaciones analizadas se determinaron mediante digestión enzimática y secuenciación.

Se utilizaron programas bioinformáticos para la predicción del posible efecto de las mutaciones identificadas en las proteínas ATP7B, CFTR y HFE como: Polyphen-2 y SIFT. Los estudios bioinformáticos se realizaron en la Universidad de Guantánamo y la Universidad de la Habana.

El programa Polyphen-2 arrojó una puntuación que se encontró en el intervalo de 0 a 1.

La predicción resultó ser:

- Perjudicial con daño muy probable: afecta la función y estructura de la proteína con alta confianza, puntuación mayor que 1.
- Perjudicial con daño posible: posible afectación de la estructura y función de la proteína, puntuación entre 0,5 y 1.
- Benigna: es probable que carezca de efecto fenotípico, la puntuación es menor que 0,5.

El acceso al programa Polyphen-2 es mediante la utilización de la dirección en internet: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2> y al programa SIFT es sift.jcvi.org.

El análisis descriptivo fue mediante estadígrafos de tendencia central y de dispersión. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa SSPS, por sus siglas en inglés, *Statistical Package for the Social Science*, versión 15.0. Para el análisis de las variables continuas con una distribución normal se presentaron los resultados como media y desviación estándar y fueron comparadas entre los grupos por ANOVA. Se utilizó el modelo de Scheffé's. Las pruebas fueron realizadas con un grado de significación de 5 %.

III. RESULTADOS

Se detectaron las siguientes mutaciones: p.N41S, p.M645R, p.L708P, p.H1069Q, R334W, Y109C, N1303K, H63D y C282Y. Las mutaciones se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Presencia de mutaciones y polimorfismos en el gen *atp7b* en pacientes cubanos.

Enfermedad	Proteína	Mutación	Polyphen-2	Puntuación	SIFT	Referencias
Enfermedad de Wilson	ATP7B	p.N41S	Daño posible	1	Deletérea	7
		p.M645R	Benigna	0	No deletérea	7
		p.L708P	Daño posible	0,74	Deletérea	8
		p.H1069Q	Daño muy probable	1	Deletérea	8
Fibrosis Quística	CFTR	Y109C	Daño muy probable	1	Deletérea	9
		R334W	Daño muy probable	1	Deletérea	10
		N1303K	Daño muy probable	1	Deletérea	10
Hemocromatosis tipo I	HFE	H63D	Benigna	0,14	No deletérea	11
		C282Y	Daño muy probable	0,99	Deletérea	

Se predijo en las nueve mutaciones analizadas el impacto en la proteína correspondiente, lo que le permite al especialista tener idea de las posibles consecuencias y gravedad fenotípica en el paciente con la enfermedad de origen genético.

Las mutaciones con daño muy probable y que son deletéreas, en muchos casos, la edad de inicio es en la niñez. Por ejemplo, en los pacientes con la enfermedad de Wilson que presentaron la mutación p.H1069Q en homocigosis la edad de inicio de la enfermedad fue $9,6 \pm 6,3$ años.

Es difícil realizar la correlación genotipo-fenotipo en enfermedades de origen genético que presenten gran heterogeneidad de mutaciones. Por ejemplo, con respecto a los pacientes con la enfermedad de Wilson, hay autores que plantean correlación entre la presencia de la mutación p.H1069Q, las manifestaciones neurológicas y el debut de los síntomas tardíamente¹²⁻¹³. Sin embargo, otros investigadores, no evidenciaron las relaciones antes mencionadas¹⁴⁻¹⁶. En este estudio no se encontró correlación genotipo-fenotipo pues la muestra es muy pequeña.

En las enfermedades genéticas estudiadas existe gran heterogeneidad de mutaciones, por lo que lo investigadores deben analizar la implicación de la causa molecular en el fenotipo, en aras de aplicar medidas de prevención. Los estudios familiares son vitales en el Asesoramiento Genético y en las estrategias de prevención (Dastsooz y col, 2014). En esta investigación en el 55,6 % de las familias analizadas se concluyó el diagnóstico molecular.

IV. CONCLUSIONES

El diagnóstico molecular en las tres enfermedades estudiadas posibilitó el diagnóstico certero en pacientes que presentaban un diagnóstico dudoso, por lo que se tomaron medidas de prevención y atención periódica de los mismos.

Se determina mediante herramientas bioinformáticas el impacto funcional de las mutaciones identificadas en pacientes cubanos con enfermedades genéticas, esenciales para el entendimiento de la causa molecular de las mismas y son útiles para el Asesoramiento Genético de las familias afectadas.

RECONOCIMIENTOS

El colectivo de autores agradece a los pacientes. A Lídice Reyes por la extracción de ADN. Al Ministerio de Salud Pública.

REFERENCIAS

1. Ferenci P. Phenotype–genotype correlations in patients with Wilson’s disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2014; 1-5.
2. Kenney SM and Cox DW. Sequence variation database for the Wilson disease copper transporter, ATP7B. *Hum Mutat* 2007; 28 (12): 1171-7.
3. Wu F, Wan J, Pu Ch, Qiao L and Jiang Ch. Wilson’s disease: A comprehensive review of the molecular mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; 16: 6419-6431.
4. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc.* 2009;4(7):1073-81.
5. Adzhubei I, Jordan D and Sunyaev S. Predicting Functional Effect of Human Missense Mutations Using PolyPhen-2. *Current Protocols in Human Genetics* 2013: 76-117.
6. Miller SA. Salting out procedure for extracting DNA. *Nucleic Acids Reserch.* 1988; 16 (3): 1215.
7. Clark Yulia, Collazo Teresa, Ruenes Caridad, García Elsa F, Robaina Zoe, Fragoso Trini. Análisis molecular del exón 2 del gen ATP7B en pacientes cubanos con la enfermedad de Wilson. *Revista Habanera Ciencias Médicas.* 2011; 10 (3): 281-286.
8. Clark Yulia, Collazo Teresa, Ruenes Caridad, García Elsa, Robaina Zoe, Fragoso Trini, et al. Detección de cambios conformacionales y mutaciones en el exón 8 del gen ATP7B en pacientes cubanos con la enfermedad de Wilson. *Revista Biotecnología Aplicada.* 2011; 28: 87-90.
9. Collazo Teresa, Piloto Yaixa, Clark Yulia, Bofill Ana, Gómez Manuel, Hernández Yadira. Detection of mutations in Cuba Cystic Fibrosis patients. *Biotecnología Aplicada* 2008; 25: 345-349.
10. Collazo Teresa, López Ixchel, Clark Yulia, Yaixa Piloto MS, Laura González, Manuel Gómez, Marileivis García, Lidice Reyes, Fidel Rodríguez MD. Antenatal testing for Cystic Fibrosis in Cuba 1988-2011. *Medicc Review.* 2014; 16 (3-4): 18-21.
11. Cervera Ismael, García Marileivis, Collazo Teresa. Introducción del diagnóstico molecular de la hemocromatosis tipo 1 en Cuba. *Revista Finlay* 2013; 3 (2): 96-102.

12. Stapelbroek J, Bollen C, van Amstel J, van Erpecum K, van Hattum J, van den Berg L, et al. The H1069Q mutation in ATP7B is associated with late and neurologic presentation in Wilson disease: results of meta-analysis. *J Hepatol.* 2004; 41: 758-63.
13. Panagiotakaki E, Tzetis M, Manolaki N, Loudianos G, Papatheodorou A, Manesis E, et al. Genotype–phenotype correlations for a wide spectrum of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B). *Am J Med Genet* 2004; 131:168–173.
14. Bruha R, Marecek Z, Pospisilova I. Long-term follow-up of Wilson disease: natural history, treatment, mutations analysis and phenotypic correlation. *Liver Int* 2011; 31: 83-91.
15. Iacob R, Iacob S, Nastase A, Vagu C, Ene AM, et al. The His1069Gln Mutation in the ATP7B Gene in Romanian Patients with Wilson's disease Referred to a Tertiary Gastroenterology Center. *J Gastrointest Liver Dis* 2012; 21(2): 181-185.
16. Ljubić H, Kalauz M, Telarović S, Ferenci P, Ostojić R, Noli MC, et al. ATP7B gene mutations in Croatians patients with Wilson Disease. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* 2016; 20 (3): 112-117.
17. Dastsooz H, Dehghani SM and Fardaei M. The same haplotype for two unrelated Wilson disease patients with new ATP7B mutation. *Arch Iran Med.* 2014; 17 (11): 755- 758.