

Artículo Original

Estudio molecular de la fibrosis quística en población ecuatoriana

César Paz-y-Miño,^{1,2} J. Christian Pérez,¹ Ramiro Burgos,¹ Ma. Verónica Dávalos,¹ Paola E. Leone.^{1,2}¹ Laboratorio de Genética Molecular y Citogenética Humana, Departamento de Ciencias Biológicas;² Unidad de Genética, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica, Quito-Ecuador.

Resumen

La Fibrosis Quística (FQ) es un desorden genético muy común en la población Caucásica siendo la mutación $\Delta F508$ la mayormente involucrada en su etiología. En regiones geográficas diferentes a la Europea, específicamente en Latinoamérica, poco se conoce sobre su incidencia y etiología. Se presenta el estudio genético de 10 afectos ecuatorianos de FQ. Se realizó la detección de la mutación $\Delta F508$ mediante PCR y el análisis de otras siete mutaciones frecuentes en la población Europea mediante un test INNO-Lipa. Se encontró que la incidencia de la mutación $\Delta F508$ fue 25% y ninguna de las otras siete fue detectada en nuestra población, lo cual indica que al menos el 60% de las mutaciones en la población estudiada son diferentes a las más comunes en Europa. Datos similares han sido reportados en otros países Amerindios, por tanto se sugiere que la FQ en el Ecuador y en Latinoamérica en general, tiene una etiología diferente a la Europea. Esto puede deberse a que los grupos étnicos son marcadamente diferentes entre estas dos regiones.

Palabras clave: Fibrosis Quística, Mutación $\Delta F508$, Poblaciones amerindias.

Summary

Cystic fibrosis is a very common genetic disorder in the Caucasian population, and the $\Delta F508$ mutation is the mainly involve on its etiology. In different European geographic locations, specifically in Latin America, there's no much knowledge about its incidence and etiology. We show the genetic study of 10 Ecuadorian CF affects. Detection of $\Delta F508$ mutation was made through PCR and for the study of other seven frequent mutations in the European population we used the INNO-Lipa test. It was found that the incidence of the $\Delta F508$ mutation was 25% and none of the other seven were detected in our population, which indicates that at least 60% of the mutations in the studied population are different from the most common in Europe. Similar data have been reported in other Amerindian populations, so it's suggested that the CF in Ecuador and in Latin America, has a different etiology from Europe. It could be because of the ethnic groups are consistently different in both regions.

Key words: Cystic Fibrosis, $\Delta F508$ mutation, Amerindian populations.

Revista de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Central del Ecuador 1999; 24 (1): 23-26

Dirección para correspondencia: César Paz y Miño M.D., Prof. Laboratorio de Genética Molecular y Citogenética Humana, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, PO Box 17-1-2184, E-MAIL: cpazymino@puceuo.puce.edu.ec, FAX: (593-2) 509584 o 509680, TEL: (593-2) 565627 Ext. 1193, Quito-Ecuador.

Introducción

La Fibrosis Quística (FQ) es un desorden genético autosómico recesivo. Las características de la enfermedad incluyen obstrucción pulmonar crónica, colonización bacteriana en las vías aéreas, insuficiencia de enzima pancreática debido al bloqueo de los conductos secretorios, electrolitos elevados en el sudor y fertilidad reducida en los hombres.¹⁻⁴

Es un desorden muy común en la población Caucásica, con una incidencia de alrededor de 1 por cada 2.000 nacidos vivos.^{1, 3} Sin embargo, su incidencia varía en diferentes poblaciones y regiones geográficas. Se ha estimado una incidencia, en base al número de nacidos vivos, de 1/3.500 blancos en Estados Unidos, 1/14.000 negros, 1/25.000 asiáticos, 1/10.500 indios americanos y 1/11.500 hispanos.⁵

El gen de la FQ fue identificado en 1989.⁶⁻⁸ El producto codificado por este gen, llamado regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), es un canal de cloro regulado por c-AMP, el cual se encuentra casi exclusivamente en las membranas de las células epiteliales secretorias en donde media el movimiento transepitelial de sales y líquidos.^{2,9} Una alteración o delección de la proteína CFTR altera las funciones fisiológicas de los epitelios glandulares.¹⁰ La mutación más común causante de la FQ es una delección de tres pares de bases que causa la eliminación de un residuo de fenilalanina en la posición 508 de la proteína. Esta mutación ($\Delta F508$) está presente en el 66,8% de individuos con FQ en Europa.¹¹ En otras regiones con grupos étnicos diferentes al Caucásico su incidencia es menor. Así, en poblaciones Latinoamericanas como la Mexicana la incidencia encontrada varía entre 34 y 46%.¹²⁻¹⁵

Si bien la $\Delta F508$ es la mutación mayormente implicada en la FQ, hasta hoy se han identificado más de 800 mutaciones en el gen CFTR causantes de la FQ.¹⁶ Sin embargo, de éstas tan sólo unas 20 ocurren comúnmente y por lo tanto son usados como marcadores de diagnóstico de "primera línea".⁴ La incidencia de las mutaciones restantes es sumamente baja y la gran mayoría han sido detectadas únicamente en familias aisladas.¹⁷

En nuestra población se desconoce la incidencia de la FQ así como las mutaciones causantes de este desorden. El presente estudio tiene por objeto determinar si las mutaciones presentes en nuestra población son las más frecuentemente involucradas en la FQ en otras poblaciones o si su etiología es diferente.

Materiales y métodos

Se realizó un seguimiento de los afectos de FQ diagnosticados clínicamente entre 1993 y 1998. Durante este periodo se encontraron 10 afectos de FQ no relacionados entre sí. Cada afecto fue estudiado junto con su familia para consejo genético.

De cada individuo se obtuvieron 15cc de sangre periférica en tubos con anticoagulante EDTA. Para la obtención de ADN genómico se realizó la purificación mediante proteinasa K y la precipitación con etanol y NaCl.¹⁸

Para el análisis de la mutación ΔF508 se amplificó el exón 10 del gen CFTR mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los cebadores CF1 5'-GTTGGCATGCTTTGATGACGCTTC-3' y CF2 5'-GTTTTCTGATTATGCCTGGCAC-3'. La mezcla para la amplificación contenía 400 μM de cada dNTP, 0.8 μM de cada cebador, 100ng de ADN, 1.25 U de *Taq* polimerasa Gibco, 2 μl de buffer de reacción Gibco 10X (200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500mM KCl), y 3mM de MgCl₂ para un volumen total de 20ul. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer con el siguiente programa de temperaturas: una desnatu-

ración inicial del ADN a 95°C por 5 minutos, luego 95°C por 20seg, 58°C por 50seg, 72°C por 1min, por 35 ciclos, seguido de una extensión final a 72°C por 5 min. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida (19:1) 9% a 600V por 2 horas. Posteriormente los productos se evidenciaron mediante bromuro de etidio.

En los individuos que no presentaron ningún alelo ΔF508 se analizó posteriormente la presencia de otras siete mutaciones frecuentes en la población Europea (G542X, N1303K, 1717-1, W1282X, G551D, R553X, Δ1507) mediante el test INNO-Lipa.

Resultados

El producto resultante de la amplificación por PCR del exón 10 del gen CFTR para la detección de la mutación ΔF508 es un fragmento de 98 pares de bases si el alelo no tiene la mutación y de 95 pares de bases si el alelo tiene la deleción de 3 nucleótidos (mutación ΔF508). Los resultados en algunos de los grupos familiares estudiados se presenta en la Figura 1.

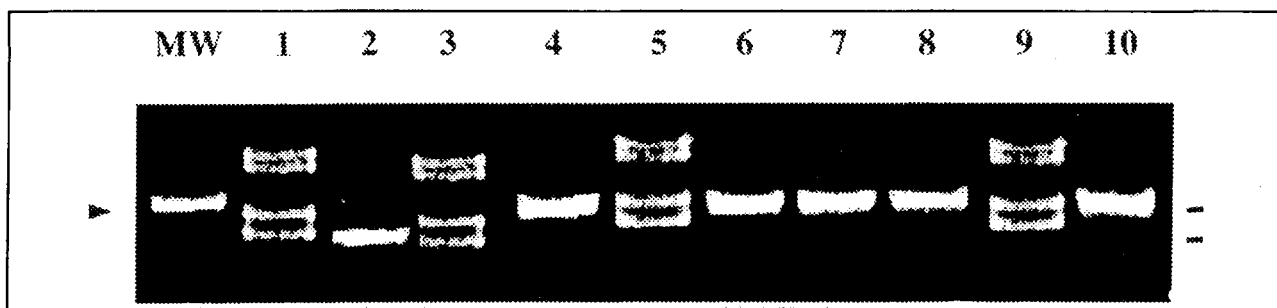


Figura 1. La fotografía muestra algunos casos analizados. Afectos FQ: Línea 2 (ΔF508/ΔF508). Línea 5 y 9 (ΔF508/X). Línea 7 (X/X). Padres de: Individuo 2: líneas 1 y 3 (ΔF508/N). Individuo 5: línea 4 (X/N). Individuo 7: línea 8 (X/N). Individuo 9: línea 10 (X/N). Hermana de individuo 5: línea 6 (N/?). N=normal. ?= no determinado.

De los diez afectos de FQ analizados, se encontró que tan sólo uno (10%) tenía los dos alelos ΔF508 (ΔF508/ΔF508); tres (30%) presentaron un solo alelo ΔF508 (ΔF508/x), y los restantes seis (60%) no presentaron ningún alelo ΔF508 (x/x). "x" representa las mutaciones no - ΔF508 (Tabla 1).

Tabla 1. Genotipos ΔF508

	X/X	ΔF508/X	ΔF508/Δ508
N	6	3	1
%	60	30	10

N=número de individuos.

%=porcentaje

X=mutaciones no-ΔF508

Cinco de los veinte cromosomas analizados presentaron la mutación ΔF508, lo cual representa una incidencia del 25% en la población analizada.

Mediante el test INNO-Lipa no se pudo detectar ninguna de las mutaciones más comunes a la población Europea en los seis afectos que no presentaron ningún alelo ΔF508. La ausencia de estas mutaciones en doce de los

veinte cromosomas analizados indica que al menos el 60% de las mutaciones causantes de la FQ en la población estudiada son diferentes a las más comunes en la población Caucásica.

Discusión

La FQ tiene su mayor incidencia en la población Caucásica, tanto Europea como Norteamericana, con una frecuencia de portadores de 1 por cada 25 individuos aproximadamente,^{1,3} por lo que es uno de los desórdenes genéticos sobre los que más se ha investigado a nivel molecular, principalmente en lo referente a su etiología; dicha investigación se ha centrado principalmente en la población Europea, en donde es más común. Existen pocos reportes en otras poblaciones; específicamente en Latinoamérica poco se conoce acerca de su incidencia y etiología. En el Ecuador sólo se ha reportado un estudio.¹⁹ Si bien no existen datos estadísticos sobre este desorden, los pocos afectos encontrados en este estudio a lo largo de 5 años, al igual que lo reportado anteriormente,¹⁹ sugieren que la incidencia de la FQ en el Ecuador es menor a la incidencia de 1/11500 estimada para los hispanos.⁵

Si bien la mutación más común causante de la FQ es la $\Delta F508$, su incidencia varía entre diferentes regiones geográficas. Así, en el Norte de Europa y en Norteamérica su frecuencia está entre 70 y 90% mientras que al Sur de Europa la frecuencia es de alrededor del 50%.²⁰ En poblaciones no caucásicas es poco lo que se ha reportado sobre la incidencia de la FQ, sin embargo, su incidencia varía entre poblaciones: desde 53,8% en la India,²¹ hasta 0% en Japón.²² En Latinoamérica se han reportado datos únicamente para México, Argentina, Brasil e hispanos residentes en Estados Unidos. Estos pocos reportes demuestran frecuencias relativamente diferentes entre sí: 34,4 a 45% en México,¹²⁻¹⁴ 50,8% en Brasil,²³ 57%-60,9% en Argentina^{24,25} y 46% en hispanos residentes en Estados Unidos.¹⁵ Si bien la incidencia encontrada en Argentina resulta ser similar a la población del Sur de Europa,²⁴ ésta no es comparable con otros países de Latinoamérica debido a sus diferentes relaciones histórico-geográficas. La incidencia encontrada en Brasil tampoco es comparable con la población amerindia, mayoritaria en los restantes países de Latinoamérica, ya que su población tiene también una relación histórico-geográfica distinta. Por tanto, la única población realmente representante de la población indoamericana resultaría ser la mexicana, en donde se observa una frecuencia relativamente baja del alelo $\Delta F508$ en comparación con la población caucásica. La incidencia encontrada en este estudio en el Ecuador (25%) resulta ser, sin embargo, considerablemente más baja que la encontrada en México. Esta baja incidencia se debe probablemente a que el tamaño de la población analizada en este estudio es bastante reducida; esto último, sin embargo, es consecuencia directa de la baja incidencia de este desorden genético en nuestro país. A pesar de ello, la frecuencia encontrada es un indicativo de que la FQ en el Ecuador, y en general en la población indoamericana, si consideramos que la frecuencia encontrada en México también es más baja que la media conocida en Europa, es causada en gran porcentaje por mutaciones distintas a la $\Delta F508$, a diferencia de lo que sucede en la población caucásica. La ausencia de las otras siete mutaciones más comunes en Europa indica que al menos el 60% de las mutaciones presentes en la población ecuatoriana de FQ, no corresponden a las siete que mayormente se encuentran en la población caucásica. En otro estudio en México,¹³ se encontró que el 43,75% de mutaciones presentes en la población no correspondieron a ninguna de las quince más comunes en la población caucásica. Estos datos sugieren que la etiología de la FQ en las poblaciones amerindias de Latinoamérica es diferente a la de la población caucásica. Esto puede deberse a que los grupos étnicos existentes en Latinoamérica y Europa son marcadamente diferentes entre sí. Así, los grupos étnicos más importantes en el Ecuador son mestizos y Amerindios.²⁶ Estos hallazgos indican que un análisis de la $\Delta F508$ en parejas que tienen antecedentes familiares de FQ y que, por tanto, probablemente son portadores de la enfermedad, resultaría de poco valor como diagnóstico en la

población ecuatoriana. Así mismo, tampoco sería de mucho aporte la utilización de tests diseñados para identificar las mutaciones más comunes de Europa en nuestra población.

Desde un punto de vista de asesoramiento genético, la causa más frecuente de tener hijos afectados, es el cruce de dos portadores, en cuyo caso la recurrencia para cada nuevo embarazo es del 25%, independientemente del número de hijos sanos o afectados de FQ. La comprensión de la FQ en sus aspectos genéticos, pese a los grandes adelantos, es aún un desafío en lo que se refiere al diagnóstico prenatal efectivo, a los estudios poblacionales para identificar grupos de riesgo y al desarrollo de un tratamiento.²⁷

Este trabajo constituye el primer acercamiento hacia las causas genéticas de la FQ en el Ecuador. Es importante, sin embargo, realizar el análisis de un mayor número de afectados y más importante aún, se hace necesario el estudiar todo el gen CFTR para determinar la ocurrencia e incidencia de mutaciones que serán poco frecuentes o aún no descritas hasta hoy.

Bibliografía

1. Cox TM, Sinclair J: *Biología Molecular en Medicina*, Madrid, Panamericana, 1998; 120-124
2. Zielenski J, Tsui L: Cystic Fibrosis: Genotypic and Phenotypic variations. *Annu Rev Genetics*, 1995; 29: 777-807.
3. Thompson MW, McInnes R, Willard HF: *Genética en Medicina*, Barcelona, Masson, 1996; 273-277.
4. Walker MR, Rapley R: *Route Maps in Gene Technology*, Cambridge, Blackwell Science, 1997; 224-227
5. FitzSimmons SC: The incidence of cystic fibrosis in the United States in 1990: Rates and characteristics of newly diagnosed patients. Presentation at the Fifth Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Dallas, Texas, 1991.
6. Kerem B, Rommens J, Buchanan J, *et al*: Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Genetic Analysis. *Science*, 1989; 245: 1073-1079.
7. Rommens J, Iannuzzi M, Kerem B, *et al*: Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Chromosome Walking and Jumping. *Science*, 1989; 245: 1059-1065.
8. Riordan J, Rommens J, Kerem B, *et al*: Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA. *Science*, 1989; 245: 1066-1073.
9. Sheppard DN, Welsh MJ: Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev*, 1999; 79(1): 23-45.
10. Pilewski JM, Frizzell RA: Role of CFTR in airway disease. *Physiol Rev*, 1999; 79(1): 215-255.
11. Estivill X, Bancells C, Ramos C: Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. The Biomed CF Mutation Analysis Consortium. *Hum Mutat*, 1997; 10(2): 135-154.
12. Orozco L, Salcedo M, Lezana JL, *et al*: Frequency of $\Delta F508$ in a Mexican sample of cystic fibrosis patients. *J Med Genet*, 1993; 30(6): 501-502.
13. Flores S, Gallegos M, Morán M, Sánchez J: Detection of $\Delta F508$ mutation in cystic fibrosis patients from northwestern Mexico. *Ann Genet*, 1997; 40(3): 189-191.
14. Villalobos-Torres C, Rojas-Martínez A, Villareal-Castellanos E, *et al*: Analysis of 16 cystic fibrosis mutations in Mexican patients. *Am J Med Genet*, 1997; 69(4): 380-382.
15. Grebe T, Seltzer W, DeMarchi J, *et al*: Genetic analysis of hispanic individuals with cystic fibrosis. *Am J Hum Genet*, 1994; 54: 443-446.
16. Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/cgi-bin/MutationTable>
17. Strachan T, Read A: *Human Molecular Genetics*, USA, Wiley-Liss, 1996; 437.

18. Leone PE, Del Pozo M, Paz y Miño C: Técnica de Extracción de ADN Genómico. En: Paz y Miño C, Leone PE, ed. *Genética y Biología Molecular en la Investigación Básica y Aplicada*, Quito, Fundación Simón Bolívar, 1998; 32-36
19. Paz y Miño C, Zurita C, Zurita J: Fibrosis Quística: Aspectos Genéticos, Inmunológicos y Microbiológicos. *Microbiologika*, 1992;8: 2-7.
20. Morral N, Bertranpetit J, Estivill X, *et al*: The origin of the major cystic fibrosis mutation ($\Delta F508$) in European populations. *Nature Genetics*, 1994; 7: 169-175.
21. Kabra M, Ghosh M, Kabra SK, Khanna A, Verma IC: $\Delta F508$ molecular mutation in Indian children with cystic fibrosis. *Indian J Med Res*, 1996; 104: 355-358.
22. Wang W, Okayama H, Shirato K: Genotypes of cystic fibrosis (CF) reported in the world and polymorphisms of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene in Japanese. *Nippon Rinsho*, 1996; 54(2): 525-532.
23. Maróstica PJ, Raskin S, Abreu-e-Silva FA: Analysis of the $\Delta F508$ mutation in a Brazilian cystic fibrosis population: comparison of pulmonary status of homozygotes with other patients. *Braz J Med Biol Res*, 1998; 31(4): 529-532.
24. Chertkoff L, Visich A, Bienvenu T, *et al*: Spectrum of CFTR mutations in Argentine cystic fibrosis patients. *Clin Genet*, 1997; 51(1): 43-47.
25. Luna MC, Granados PA, Olek K, Pivetta OH: Cystic fibrosis in Argentina: the frequency of the $\Delta F508$ mutation. *Hum Genet*, 1996; 97: 314.
26. Paz-y-Miño C: Ecuador. En: Penchaszadeh V (headed) *Medical Genetic Services in Latin America*. World Health Organization, 1998.
27. Leone PE: Fibrosis Quística. En: Fernández-Piqueras J, Talavera A. *Avances en Genética Molecular Humana*, Madrid, Ediciones de la Universidad Autónoma de Madrid, 1995; 57-64