

Frecuencia de las mutaciones G542X R1162X y N1303K en familias fibroquísticas cubanas

✉ Teresa Collazo Mesa, Hilda Granda Ibarra, Ana María Bofill Martínez, Blanca Suardiáz Martínez, Yadira Hernández Pérez, Manuel Gómez Martínez, Luis Heredero Baute

Centro Nacional de Genética Médica. Centro colaborador de la OMS para el desarrollo de enfoques genéticos en la promoción de la salud. Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana, Cuba. Ave 31 No. 3102, Playa 16, Ciudad de La Habana, Cuba. Teléfono 33 15 02; E-mail: tcollazo@infomed.sld.cu

RESUMEN

La Fibrosis Quística es la enfermedad autosómica recesiva más común en la población caucásica. En Cuba 1 de cada 3 862 nacidos vivos están afectados y es considerado un problema de salud. El gen responsable de la Fibrosis Quística, gen regulador de la conductancia transmembranal, fue clonado en 1989 y la mutación más común DF508 fue identificada. Desde entonces, más de 700 mutaciones diferentes han sido descritas. La delección ΔF508 estuvo presente en 34% de los cromosomas fibroquísticos cubanos. En el presente se ha calculado la frecuencia de 3 mutaciones en 270 pacientes cubanos. Las mutaciones G542X, R1162X y N1303K estuvieron presentes en el 4, 0,7 y 0% respectivamente y fueron caracterizados el 39% de los cromosomas fibroquísticos cubanos.

Palabras claves: Fibrosis Quística, mutaciones, G542X, R1162X, N1303K

Biotechnología Aplicada 2003;20:220-221

ABSTRACT

Frequency of G542X, R1162X and N1303K mutations in the Cuban Cystic Fibrosis families. Cystic Fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive disease in caucasian populations. In Cuba 1/ 3862 newborn is affected. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene, was cloned in 1989 and the most common mutation, ΔF508 was identified. Since then more than 700 different CFTR mutations have been described. The ΔF508 deletion was present in 34% Cuban CF chromosomes. At present we tested the frequency of three mutations in 270 Cuban patients. The G542X, R1162X and N1303K mutations were present in 4%, 0.7% and 0% respectively, 39% of Cuban cystic fibrosis chromosomes remaining with characterization.

Keywords: Cystic Fibrosis, mutations, G542X, R1162X, N1303K

Introducción

La Fibrosis Quística (FQ) es la causa más frecuente de enfermedad pulmonar crónica progresiva en la infancia y constituye un gran problema de salud. La prevalencia al nacimiento en Cuba es de 1/3 862 recién nacidos vivos [1]. Se caracteriza por problemas respiratorios obstructivos con sobreinfección crónica y recurrente, insuficiencia pancreática, problemas nutricionales, infertilidad en los varones y niveles elevados de Na y Cl en el sudor.

El gen de la FQ fue localizado en el cromosoma 7 en 1985 y se aisló en 1989. Este gen designado como Regulador de la Conductancia Transmembranal de la FQ (CFTR), tiene 27 exones que cubren una región de 230 kb y contiene información para un ARNm de 6,5 kb [2]. Desde el clonaje del gen CFTR más de 700 mutaciones han sido descritas [3]. La frecuencia de la mutación principal DF508 (delección de 3 pares de bases en el exón 10) es más baja en poblaciones del sur de Europa (40-60%) que en el norte de Europa (70-85%) [4], debido a la gran heterogeneidad genética en las poblaciones del Mediterráneo [5]. La frecuencia en la población cubana fue de 34% y quedó sin caracterizar el 66% de los cromosomas fibroquísticos cubanos [6]. Otras mutaciones tienen frecuencias entre el 1 y 2,5% en la población mundial y están presentes prácticamente en todas las poblaciones estudiadas. Otras se encuentran entre el 0,1 a 0,7% de los pacientes, pero su distribución es varia-

ble y la mayoría están restringidas a regiones geográficas determinadas [4]. En este trabajo se realizó la detección de las mutaciones G542X, R1162X y N1303K en 270 pacientes fibroquísticos cubanos y se calculó su frecuencia.

Materiales y métodos

Se estudiaron 270 familias FQ cubanas no relacionadas, las cuales incluyeron a todos los pacientes del registro nacional de FQ en Cuba, que han sido diagnosticados por las características clínicas de la enfermedad y la prueba positiva de electrolitos en sudor.

La extracción de ADN se realizó por el método de precipitación salina [7], a partir de 10 mL de sangre periférica con EDTA 56 mg/mL como anticoagulante.

Las mutaciones fueron detectadas por el método de amplificación refractaria de mutaciones específicas [8]. Las condiciones empleadas fueron las siguientes: 100ng de ADN, 1u de Taq ADN Polimerasa por reacción, 0,85 pmol/μL de cada cebador, dNTP 0.1mM, MgCl₂ 1.0 mM en un volumen de reacción de 25 μL y se usaron en todos los casos controles internos de amplificación. La reacción de amplificación consistió en 5 min a 94 °C; se adiciona la Taq ADN polimerasa y continúan 29 ciclos: 1min a 94 °C, 1min a 60 °C y 1:30 min a 72 °C y una extensión final por 5 min a 72 °C. La reacción se realizó en un termociclador modelo Mastercycler 5330. El producto de la reacción ARMS fue corrido en un gel de

1. Guerra D. Estudio Genético de Fibrosis Quística. Tesis de Doctor en Ciencias Médicas 1984.

2. Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS. Identification of the Cystic Fibrosis gene: cloning and characterization of the complementary DNA. *Science* 1989;245:1066-72.

3. Murray J, Cuckle H, Taylor G, Li Titlewood J, Hewison J. Screening for Cystic Fibrosis. *Health Technol Assess* 1999;3:1-104.

4. EWGGCF Gradient of distribution in Europe of the major CF mutation and of its associated haplotype. European Working Group on CF Genetics. *Hum Genet* 1990; 85:436-45.

5. Miguel Chillón, Tresa Casals, Javier Jimenez, M. Dolores Ramos, Ana Palacio, Nuria Morral, Xavier Estivill, Virginia Nuñez. Analysis of the CFTR gene confirms the high genetic heterogeneity of the Spanish population: 43 mutations account for only 78% of CF chromosomes. *Hum Genet* 1994;93:447-51.

6. Collazo T, Mgarino C, Chavez R, Suardiaz B, Gispert S, Gómez M, et al. Frequency of Delta-F 508 Mutation and XV2C/KM19 Haplotypes in Cuban Cystic Fibrosis Families. *Hum Hered* 1995; 45:55-7.

Tabla 1

Cebadores Utilizados	Mutación
G N- ACTCAGTGTGATTCCACCTTCTAC	G542X
G M- CACTCAGTGTGATTCCACCTTCTCA	G542X
11C- TAAAAATTCAGCAATGTTGTTTTGACC	G542X
RN- CTGTTGGCATGTCAATGAACCTAAAGACTT	R1162X
R M- CTGTTGGCATGTCAATGAACCTAAAGACTTA	R1162X
RC- CAATTATTCCTGTTAGTTCATTGAAAAGC	R1162X
NK N- GATCACTCCACTGTTTCATAGGGATCCAAC	N1303K
NK M- GATCACTCCACTGTTTCATAGGGATCCAAC	N1303K
NK C- CTC AATTCTTATTCTAAAGACATTGG	N1303K
AAT1- TGTCACAGTGAGCCTTGCTCGAGGCCTGGG	G542X y N1303K
AAT2- GAGACTTGGTATTTTGTTCATCAATTAAG	G542X y N1303K
AAT3- CCCACCTCCCTCTCTCCAGGCCAAATGGG	R1162X
AAT4- GGGCCTCAGTCCCAACATGGCTAAGAGGTG	R1162X

agarosa al 2% que contenía bromuro de etidio y fue visualizado por luz ultravioleta (Tabla 1).

Resultados y Discusión

La mutación G542X de terminación de cadena en el 1er dominio transmembranal en el exón 11 [9], se encontró presente en 2 pacientes en estado homocigótico, 7 heterocigóticos compuestos para DF508/G542X y 11 heterocigóticos para esta mutación y otra mutación no detectada. En los casos heterocigóticos compuestos con DF508 y los homocigóticos el cuadro clínico por lo general fue bastante severo.

En el exón 19 la mutación R1162X en el dominio 2 de unión a nucleótidos debido a la sustitución de C por T en el nucleótido 3616 en el gen FQ [10] fue encontrada en 4 pacientes, 2 de estos resultaron heterocigóticos compuestos R1162X/DF508 y los otros 2 portaban una mutación desconocida. Las manifestaciones clíni-

cas de estos pacientes fueron variables, en los 2 casos heterocigóticos compuestos R1162X/DF508 el cuadro clínico resultó más severo que en el resto de los casos.

La mutación N1303K, que está clasificada como una mutación de pérdida de sentido en el exón 21 [11], no estuvo presente en ninguno de los paciente de este estudio. El análisis de la frecuencia de esta mutación en diferentes poblaciones [12] sugirió que su origen fue en una población del área del Mediterráneo. Esta mutación es significativamente más frecuente en las poblaciones del sur de Europa que en el norte. En la población española está principalmente distribuida en la región del Mediterráneo con una frecuencia de 4,5%; mientras en el resto de España es de 1,9% [4].

La incidencia de G542X, R1162X y N1303K en América Latina varía en los diferentes países debido al origen diferente de sus poblaciones. La frecuencia de estas mutaciones en Cuba (Tabla 2) es más baja que en la población española; G542X- 4%, R1162X- 0,7% y N1303K- 0%. Esto puede ser explicado por la contribución africana al genoma de la población cubana [13].

Después del estudio de estas 4 mutaciones aún quedan sin caracterizar el 61% de los cromosomas FQ cubanos, por lo que resulta de gran interés realizar en la muestra seleccionada la detección de mutaciones frecuentes en las poblaciones africanas y la introducción del estudio de marcadores moleculares intragénicos para incrementar en las familias las posibilidades de diagnóstico prenatal y de portadores.

Tabla 2. Frecuencia de las mutaciones G542X, R1162X y N1303K en 540 cromosomas FQ cubanos

Mutación	Cromosomas	Frecuencia (%)
G542X	22	4
R1162X	4	0,7
N1303K	0	0

7. Miller SA. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215-8.

8. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers SC, Kalsheker N, Smith JC, et al. Analysis of any point mutation in DNA: the amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 1989; 17:2503-16.

9. B Kerem, J Zielenski, D Markiewicz, D Bozon, E Gazit, J Yahaf, D Kennedy, et al. Identification of mutations in region corresponding to the 2 putative nucleotide (ATP)- binding folds of the cystic fibrosis gene. *Proc Nat Acad Sci USA* 1990;87: 8447-51.

10. Gasparine P, Nunes V, Savoia A, Dognini M, Morral N, Gaona A, et al. The search for South European Cystic Fibrosis Mutations: identification of two new mutations, four variants, and intronic sequences. *Genomics* 1991;10:193-200.

11. Osborne L, Knight R, Santis G, Hodson M. A mutation in the second nucleotide binding fold of the Cystic Fibrosis Gene. *Am Hum Genet.* 1991;48:406-612.

12. Osborne L, Santis G, Schwarz M, Klinger K, Dork T, Instosh M, et al. Incidence and expression of the N1303K mutation of the cystic fibrosis (CFTR) gene. *Hum Genet* 1992;89:653-58.

13. Altland K, Heredero L. Diagnóstico prenatal de la anemia por hemátios falciformes. *Rev Cubana Ped* 1974;46: 237-44.

Recibido en abril de 2002. Aprobado en noviembre de 2003.