

## V. Estudio molecular de la fibrosis quística en México

Lorena Orozco<sup>1</sup>, Margarita Chávez<sup>1</sup>, José Luis Lezana<sup>2</sup>, Alessandra Carnevale<sup>1</sup>, Hortensia Valdez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Pediatría <sup>2</sup>Asociación Mexicana de Fibrosis Quística

(Recibido, diciembre 15, 1992; aceptado, febrero 2, 1993)

### Resumen

Este artículo informa sobre la frecuencia de la mutación delta-F508 en una muestra de 26 pacientes mexicanos con fibrosis quística (FQ). La mutación se detectó por mutagénesis dirigida mediada por PCR. La mutación delta-F508 se encontró en el 34.5% de los cromosomas analizados; esta frecuencia es más baja que la publicada en Argentina y España. La frecuencia tan alta con la que mueren los niños mexicanos con FQ, el origen étnico de la población mexicana y el número limitado de casos estudiados pueden influir en la frecuencia tan baja de la mutación estudiada en este trabajo.

**Palabras clave:** Fibrosis quística-Mutación delta-F508-Población mexicana

### Summary

This paper reports the frequency of the delta-F508 mutation in a sample of 26 Mexican patients with cystic fibrosis (CF). The mutation was detected by PCR-mediated site-directed mutagenesis. Delta-F508 was found in 34.5% of CF chromosomes, a frequency lower than that reported in Argentina and Spain. The high rate of CF patients who die without diagnosis, the ethnic origin of the Mexican population, and the limited number of cases studied could account for the low frequency of delta-F508 mutation found in this preliminary report.

**Key words:** Cystic fibrosis-Delta-F508 mutation-Mexican population

### Introducción

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad autosómica recesiva más frecuente en la población caucásica, con una incidencia de 1 en 2,500 nacidos vivos<sup>1</sup>. El gen responsable de la enfermedad se localiza en el brazo largo del cromosoma 7 en la región q31, recientemente aislado y caracterizado<sup>2</sup>, encontrándose que cerca de 150 mutaciones afectan este gen. La mutación más frecuente es la delta-F508, una deleción de 3 pares de bases (pb) que elimina el codón para la fenilalanina en la posición 508 de la proteína reguladora de la conductancia transmembranal<sup>3</sup>. Algunos estudios han mostrado que en las diferentes poblaciones existe una amplia variación en la frecuencia de las mutaciones<sup>4</sup>. Esta mutación se encuentra en el 70% de los cromosomas de los pacientes caucásicos del norte de Europa y América<sup>4,5</sup>. El primer estudio realizado en Latinoamérica fue en Argentina, donde la mutación

delta-F508 se encontró en el 63% de los cromosomas<sup>4</sup>.

En México, la población es heterogénea, principalmente mestiza (hispano-indígena), y no se conoce la incidencia de la FQ. Se requiere conocer la frecuencia de la mutación delta-F508 y de las otras mutaciones en una población determinada para otorgar un asesoramiento genético adecuado. En este trabajo estudiamos la frecuencia de la mutación delta-F508 en una muestra de pacientes con diagnóstico de FQ, que se atienden en la Asociación Mexicana de Fibrosis Quística y en el Instituto Nacional de Pediatría.

### Métodos

Se incluyeron en el estudio 26 personas con diagnóstico clínico de FQ y cloruros elevados en el

sudor. El DNA se obtuvo a partir de leucocitos de sangre periférica de acuerdo con los protocolos habituales y la mutación se detectó por la técnica de mutagénesis dirigida mediada por PCR (PSM)<sup>6,7</sup>.

La secuencia de los oligonucleótidos empleados fue:

F 5'GCACCATTAAAGAAAATATGAT3'

R 5'CATTACACAGTAGCTTACCCA3'

El extremo 3' del oligonucleótido F se sobrelapa con el locus de la delección F508 e incluye un cambio en una sola base que altera la secuencia de los productos amplificados<sup>8</sup>. La PSM con estos oligonucleótidos da productos que llevan un nuevo sitio de restricción para la enzima MboI en los alelos normales pero no en los alelos con la mutación delta-F508.

Para la amplificación se utilizó un equipo de ciclos térmicos (Perkin-Elmer), siguiendo el protocolo descrito por Friedman y col.<sup>7</sup>. Para la preparación de la mezcla de reacción se agregó 1 µl de DNA, 300 ng de los oligonucleótidos F y R y 2.5 U de la enzima Taq polimerasa (Gibco) a una solución que contenía por litro 200 nm de cada deoxinucleótido trifosfato, 1.5 mmol de MgCl<sub>2</sub>, 67 mmol de Tris (pH 8.8), 10 mmol de 2-mercaptoetanol, 16.6 mmol de sulfato de amonio y 6.5 µmol de EDTA<sup>7</sup>. La amplificación se inició con 10 min de incubación a 94°C y, posteriormente, se realizaron 35 ciclos consistentes en 2 min de incubación a 50°C para el alineamiento, 2 min a 72°C para la extensión y 2 min a 94°C para la desnaturalización; para completar la amplificación, se incubó por 10 min a 72°C.

Después de la PCR, 25 µl de la mezcla de reacción se incubaron durante toda la noche con la enzima MboI (New England, Biolabs). La electroforesis se llevó a cabo a 100 V por 2 horas en un gel de poliacrilamida al 10%.

**Resultados**

Se estudiaron 26 pacientes con FQ no relacionados y tres controles normales. El producto amplificado fue un fragmento de 219 pb que al digerirse con la enzima MboI da como resultado una banda de 202 pb cuando el alelo es normal y permanece intacta en presencia de la mutación delta-F508.

En este estudio, todos los individuos normales (controles) y los pacientes con mutaciones diferentes a delta-F508 mostraron la banda de 202 pb. Sin embargo, los pacientes homocigotos para la mutación

mostraron el fragmento de 219 pb, mientras que los pacientes heterocigotos compuestos, que llevan un alelo con la mutación delta-F508 y un alelo con otra mutación diferente, presentaron ambos fragmentos, además de un heteroduplex que sólo se observa en presencia de la delección. Este último patrón también se encuentra en individuos portadores sanos para la mutación delta-F-508 (Fig. 1).

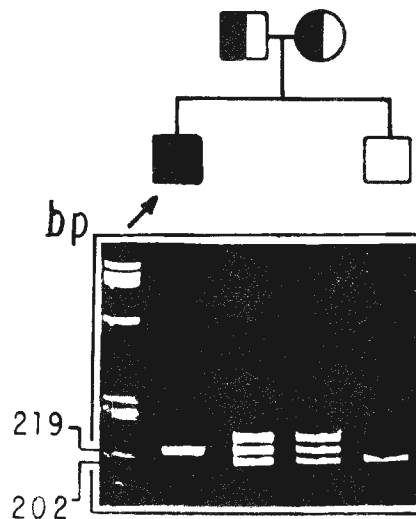


Fig. 1. Detección de la mutación delta-F508 por PSM. En la parte superior se muestra el pedigree de una familia con FQ Carril 1: marcador de pesos moleculares, φX174 digerido con HaeIII; carril 2: caso índice homocigoto delta-F508/delta-F508; carril 3 y 4: portadores sanos, heterocigotos delta-F508/normal; carril 5: homocigoto normal.

En el Cuadro 1 se muestra la distribución de los pacientes de acuerdo con la presencia o no de la mutación delta-F508 y la frecuencia de la mutación delta-F508 en 52 cromosomas analizados, la cual fue de 34.5%.

CUADRO 1. Frecuencia de la mutación delta-F508 en 26 pacientes mexicanos con fibrosis quística.

Genotipo	Casos FQ		Cromosomas	
	No.	%	% F508	% X
508/508	3	11.5	11.5	0
508/X	12	46.0	23.0	23.0
X/X	11	42.5	0	42.5
Total	26*	100	34.5	65.5

X = Mutación desconocida.

\* = Uno de los casos fué diagnosticado post-mortem.

Entre los casos homocigotos para la mutación delta-F508, uno fue diagnosticado post-mortem. Este

murió a los 6 meses de edad por insuficiencia respiratoria progresiva de 3 meses de evolución y niveles de cloruros en sudor normales (12 mEq/l). El diagnóstico final fue de neumopatía crónica de etiología viral; sin embargo, en el estudio histopatológico se encontraron datos sugestivos de FQ que fue confirmado por el estudio molecular.

### Discusión

Los resultados obtenidos en este informe preliminar muestran que la frecuencia de la mutación delta-F508 en la población estudiada (34.5%) es más baja que la descrita para otros países, incluyendo a dos hispanos, Argentina y España<sup>4</sup> (Cuadro 2). La baja frecuencia encontrada en nuestra población puede ser debida a: 1) el número limitado de casos estudiados; 2) el origen étnico de la población mexicana, el cual es principalmente hispano-indígena, donde los genes indígenas ocupan aproximadamente el 50% y los hispanos el 40%<sup>9,10</sup>; además, los ancestros indígenas en México son también diferentes a los de otros países latinoamericanos; y 3) que en este estudio se analizaron pacientes vivos y es conocido que, en los países en desarrollo, un gran número de niños afectados mueren sin el beneficio de un diagnóstico oportuno y cabe la posibilidad de que los pacientes homocigotos para la mutación delta-F508, con enfermedad pulmonar severa e insuficiencia pancreática, mueran sin diagnóstico. En el Instituto Nacional de Pediatría se encontró solamente un paciente con FQ en una muestra de 2,945 admisiones durante 1976, 1978 y 1980<sup>12</sup>, mientras que 32 casos fueron diagnosticados en 3,260 autopsias consecutivas<sup>13</sup>. Los informes de las autopsias revelaron que la edad alcanzada fue menor de 4 años y sólo 9 se habían diagnosticado en vida. Esta situación probablemente ha mejorado por el interés que se ha puesto en esta enfermedad desde la década pasada; sin embargo, uno de los casos del presente estudio fue diagnosticado postmortem. Gracias a este hallazgo se logró detectar, mediante el estudio molecular, a su hermano recién nacido como portador de la enfermedad.

### Referencias

1. Boat TF, Welsh MJ, Beaudet AL. Cystic fibrosis In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The metabolic basis of inherited disease 6th ed. New York: McGraw-Hill, 1989;2649-80.
2. Riordan J, Rommens J, Kerem BS, Alons N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm M, Iannuzzi M, Collins F, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science 1989;245:1066-73.

Se considera que es necesario aumentar el número de pacientes, estudiar los casos diagnosticados postmortem, investigar el origen étnico de los pacientes y analizar otro tipo de mutaciones diferentes a la delta-F508 para caracterizar a la población atendida en la Asociación Mexicana de Fibrosis Quística y en el Instituto Nacional de Pediatría.

CUADRO 2. Distribución de la mutación delta-F508 en diferentes países.

País	Cromosomas FQ	
	No. Estudiado	(%) Delta-F508
U.S.A.	2372	71
Canada	466	71
Argentina	92	63
Inglaterra	1548	76
España	608	54
Italia	1128	47
México*	52	34.5

\* En este artículo

También es importante hacer énfasis en las ventajas que representa el estudio molecular sobre los métodos tradicionales de diagnóstico, no sólo en su aplicación en la fibrosis quística sino en otras muchas enfermedades. Este tipo de análisis permite: 1) el diagnóstico oportuno; 2) la detección de portadores para otorgar un asesoramiento genético adecuado; 3) el diagnóstico prenatal y postmortem sin el requerimiento de un pariente vivo, y 4) realizar una correlación clínico-molecular con el fin de establecer un pronóstico.

**Agradecimiento.** Este trabajo se realizó gracias al financiamiento de la Asociación Mexicana de Fibrosis Quística y de la American Foudation of Cystic Fibrosis. Se agradece también a Visa Monterrey que, a través de la Secretaría de Salud, otorgó una beca al autor principal.

3. Kerem BS, Rommens J, Buchanan J, Markiewicz D, Cox T, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic analysis. Science 1989;245:1074-80.
4. Cystic fibrosis genetic analysis consortium. Worldwide survey of the delta-F508 mutation. Report from the cystic fibrosis genetic analysis consortium. Am J Hum Genet 1990;47:354-9.

5. Gasparini P, Nunes V, Savoia A, Dognini M, Morral N, Gaona A, Bonizzato A, Chillon M, Sanguolo F, Novelli G, Dallapiccola B, Pignatti PF, Estivill X. The search for South European cystic fibrosis mutations: Identification of two new mutations, four variants, and intronic sequences. *Genomics* 1991;10:193-200.
6. Friedman K, Highsmith WE, Prior TW, Perry TR, Silverman LM. Cystic fibrosis deletion mutation detected by PCR-mediated site-directed mutagenesis. *Clin Chem* 1990;36:695-6.
7. Friedman KJ, Highsmith WE, Silverman LM. Detecting multiple cystic fibrosis mutations by polymerase chain reaction-mediated site-directed mutagenesis. *Clin Chem*, 1991;37:1-6.
8. Haliassos A, Chomei JC, Tesson L, y col. Modification of enzymatically amplified DNA for the detection of point mutations. *Nucleic Acid Res* 1989;17:3606-9.
9. Lisker R, Perez-Briceño R, Granados J, Babinsky V, De Rubens J, Armendares S, Buentello L. Gene frequencies and admixture estimates in a Mexico City population. *Amer J Phys Anthropol* 1986;71:203-7.
10. Lisker R, Ramirez E, Perez-Briceño R, Granados J, Babinsky V. Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican urban centers. *Hum Biol* 1990;62:791-801.
11. Brock DJH, Shrimpton AE, Jones C, McIntosh I. Cystic fibrosis: The new genetics. *J R Soc Med suppl*.18 1991;84:2-6.
12. Carnevale A, Hernandez M, Reyes R, Paz F, Sosa C. The frequency and economic burden of genetic disease in a pediatric hospital in Mexico City. *Am J Med Genet* 1985;20:665-75.
13. Lopez-Corella E, Ridaura-Sanz C, Lopez-Cervantes G. Cystic fibrosis in Mexican children. A report of 32 cases in 3260 consecutive pediatric autopsies. *Patología* 1980;18:167-81.