



Revista cubana de
Genética
COMUNITARIA

**Frecuencia de las mutaciones G85E y V754M en pacientes con
diagnóstico clínico de fibrosis quística**

Frequency of G85E and V754M mutations in patients with a clinical
diagnosis of cystic fibrosis

Frecuencia de las mutaciones G85E y V754M en pacientes con diagnóstico clínico de fibrosis quística

Frequency of G85E and V754M mutations in patients with a clinical diagnosis of cystic fibrosis

Javier Alejandro Martínez Seoane¹ <https://orcid.org/0000-0001-6116-7814>

Ixchel López Reyes² <https://orcid.org/0000-0003-3387-2668>

Elvia Nelemi Santos González² <https://orcid.org/0000-0001-7336-1681>

Antonio Alejandro Esperón Álvarez² <https://orcid.org/0000-0002-6806-4874>

Claudia Barbón Sánchez² <https://orcid.org/0000-0001-6146-7614>

Teresa Collazo Mesa² <https://orcid.org/0000-0002-3984-9189>

¹Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar. La Habana, Cuba.

²Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba.

Autor para la correspondencia: javier.martinez@inica.azcuba.cu

RESUMEN

Introducción: La fibrosis quística es una de las enfermedades hereditarias más frecuentes a nivel mundial en poblaciones de origen caucásico. Presenta un patrón de herencia autosómico recesivo con una incidencia en Cuba de 1 en 9862 nacidos vivos. Se han descrito más de 2000 mutaciones que afectan el gen regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística.

Objetivo: Determinar la frecuencia de las mutaciones G85E y V754M en pacientes cubanos diagnosticados con diagnóstico clínico de fibrosis quística.

Métodos: En el presente estudio las mutaciones G85E y V754M se detectaron mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo de longitud de los fragmentos en restricción.

Resultados: De las 130 muestras analizadas, 7 resultaron positivas: 3 heterocigóticos y 1 homocigótico para V754M y 3 heterocigóticos para G85E.

Conclusión: Las frecuencias resultaron para V754M y G85E de 1,9 y 1,2 %, respectivamente. Con estos valores de frecuencia es factible considerar la introducción de la detección de estas mutaciones en el diagnóstico molecular de los pacientes cubanos con fibrosis quística.

Palabras clave: fibrosis quística; regulador de conductancia de transmembrana de fibrosis quística; frecuencia alélica; mutación.

ABSTRACT

Introduction: Cystic fibrosis is one of the most common hereditary diseases worldwide in populations of Caucasian origin. This condition follows an autosomal recessive inheritance pattern, and its incidence in Cuba is 1 per 9 862 live births. More than 2 000 mutations have been described which affect the regulator gene of cystic fibrosis transmembrane conductance.

Objective: Determine the frequency of G85E and V754M mutations in Cuban patients with a clinical diagnosis of cystic fibrosis.

Methods: In the present study G85E and V754M mutations were detected by polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism.

Results: Of the 130 samples analyzed, 7 were positive: 3 heterozygous, 1 homozygous for V754M and 3 heterozygous for G85E.

Conclusion: Frequencies for V754M and G85E were 1.9% and 1.2%, respectively. Based on these frequency values, it would be advisable to consider the inclusion of detection of these mutations in the molecular diagnosis of Cuban patients with cystic fibrosis.

Keywords: cystic fibrosis; cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; allele frequency; mutation.

Recibido: 25/02/2019

Aceptado: 18/06/2019

Introducción

La fibrosis quística (FQ) o mucoviscidosis es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva, de evolución crónica, progresiva y multisistémica⁽¹⁾ que afecta principalmente a la población caucásica⁽²⁾ y aproximadamente a 85 000 personas a nivel mundial.⁽³⁾ La incidencia de esta enfermedad varía en dependencia del origen étnico y geográfico de la población estudiada.⁽⁴⁾ En Cuba su incidencia es de 1/9862 nacidos vivos.⁽⁵⁾ El gen de la FQ fue descubierto en 1989,⁽⁶⁾ nombrado como *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) y codifica una proteína de membrana que tiene como función principal la regulación del volumen de líquido en las superficies epiteliales mediante la secreción de cloro e inhibición de la absorción del sodio mediado por ATP.⁽⁷⁾ Dicho gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 7, región 31.2 (7q31.2).⁽⁶⁾ Se han descrito más de 2000 mutaciones del gen *CFTR*⁽⁸⁾ que originan la disfunción de las glándulas

sudoríparas en las células epiteliales. Estas variaciones en el genoma en combinación con factores modificadores tanto genéticos como ambientales pueden ocasionar diversos trastornos en las vías respiratorias altas y bajas, páncreas, intestino y tracto reproductivo.^(9,10) En Cuba, debido a la mezcla de poblaciones aborígenes, euroasiáticas y africanas es de esperar un alto grado de heterogeneidad.⁽¹¹⁾ Hasta el momento, las mutaciones estudiadas de forma rutinaria en Cuba son F508del (frecuencia de 37,9 %), G542X (6,8 %), R334W (5,2 %), R553X (2,2 %), R1162X (2,0 %) y 3120+1G>A (1,3 %).⁽¹²⁾ Otras mutaciones han sido identificadas en pacientes fibroquísticos cubanos,⁽¹³⁾ pero no forman parte del servicio asistencial y su frecuencia aún no ha sido determinada.

La mutación G85E es frecuente en el mundo, en particular en España;⁽¹⁴⁾ por otra parte, aunque existe poca información de V754M, se detectó su presencia en países de América Latina.⁽¹⁵⁾ Ambas mutaciones se encontraron en muestras de pacientes cubanos analizadas en España.⁽¹³⁾ Es por eso que el objetivo de este trabajo es determinar la frecuencia de las mutaciones G85E y V754M en pacientes cubanos con diagnóstico clínico de fibrosis quística, con vista a la incorporación de su detección al servicio asistencial.

Métodos

Para la realización de este estudio se seleccionaron 130 muestras procedentes de pacientes no emparentados, con diagnóstico clínico de fibrosis quística por la Comisión Nacional de Fibrosis Quística, que procedían del Banco de ADN del Centro Nacional de Genética Médica (CNGM) y cuya genotipación permanecía incompleta hasta el momento. Las muestras fueron extraídas a partir de 10 mL de sangre periférica mediante el método de precipitación salina,⁽¹⁶⁾ cuantificadas y conservadas a -80 °C. Previamente, se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes para participar en el proyecto de investigación institucional “Caracterización molecular de Fibrosis quística en Cuba”, de acuerdo al protocolo aprobado por el Comité de Ética del CNGM.

La detección de las mutaciones G85E y V754M se realizó mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa - Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (por sus siglas en inglés PCR-RFLP). Los cebadores utilizados fueron diseñados y verificados con los programas bioinformáticos en línea *primer-BLAST* y *NetPrimer*, respectivamente (tabla 1). Mediante la herramienta bioinformática *CLC Sequence Viewer* se determinó el tamaño de los fragmentos generados por la digestión enzimática (tabla 2).

Tabla 1 - Secuencia de cebadores utilizados en la amplificación de la PCR para la detección de las mutaciones G85E y V754M (todos en dirección 5'- 3')

Cebadores	G85E	V754M
Directo	GCAACTTATTGGTCCCCTTT	CCTAACTGAGACCTTACACCGT
Inverso	AGGTGGTTTCTTAGTGTTTGGG	TCGTGTGGATGCTGTTGTCT

Las reacciones de amplificación contenían 100 ng de ADN, 0,4 pmol/μl de cada cebador, 0,1 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 1X de solución tampón, 0,04 U/μl de *Taq DNA polymerase*

(Invitrogen) para un volumen final de 25 µL. El programa utilizado para las amplificaciones consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min; 30 ciclos integrados de: desnaturalización a 94 °C por 30 s, hibridación a 55 °C por 30 s y elongación a 72 °C por 1 min; la elongación final fue a 75 °C por 5 min. Para la mutación G85E la enzima de restricción utilizada y las condiciones de la digestión enzimática fueron las reportadas por Collazo y colaboradores.⁽¹³⁾ Mientras que para la mutación V754M la enzima de restricción usada fue *NlaIII*, reportada en la base de datos CFTR1.

Tabla 2 - Tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos por PCR-RFLP para el estudio de las mutaciones G85E y V754M y endonucleasas de restricción empleadas

Mutación	Producto de PCR (pb)	Enzima de restricción	Tamaño de los fragmentos(pb)	
			Alelo normal	Alelo mutado
G85E	282	<i>HinfI</i>	125* + 127* + 30	252 + 30
V754M	394	<i>NlaIII</i>	394	114 +280

Se utilizaron como controles muestras de pacientes cubanos secuenciadas en el Instituto de Investigaciones Oncológicas de Barcelona que fueron heterocigóticas para cada una de las mutaciones.⁽¹³⁾

Resultados

De las 130 muestras analizadas, en tres se detectó la mutación G85E y en 4 se encontró la mutación V754M (tabla 3). La mutación G85E se identificó en estado heterocigótico en las 3 muestras, lo que permitió completar el genotipo de los pacientes que presentaban mutaciones descritas en estudios previos. De los cuales, 2 fueron heterocigóticos compuestos para F508del/G85E y 1 para R1162X/G85E. La mutación V754M se detectó en 4 muestras de pacientes, 3 en estado heterocigótico y 1 homocigótico. Se completó el genotipo de 2 de las muestras heterocigóticas, 1 heterocigótico compuesto F508del/V754M y el otro Q1281X/V754M. Las figuras 1 y 2 muestran la corrida electroforética de las muestras de 3 pacientes en los que se identificó G85E y 2 pacientes en los que se identificó V754M.

Tabla 3 - Genotipo y procedencia de los pacientes en los que se identificó la mutación G85E o V754M.

Heterocigóticos: +/-; homocigóticos: +/+

Paciente	Identificada en estudios previos	Mutación		Provincia
		G85E	V754M	
1	F508del (+/-)	+/-	-/-	La Habana
2	F508del (+/-)	+/-	-/-	Mayabeque
3	R1162X (+/-)	+/-	-/-	Pinar del Río
4	F508del (+/-)	-/-	+/-	Santi Spíritus
5	Q1281X (+/-)	-/-	+/-	La Habana
6	-	-/-	+/-	La Habana
7	-	-/-	+/+	Santiago de Cuba

El cálculo de la frecuencia alélica de las muestras analizadas en este estudio mostró, que de los 260 alelos, 3 alelos presentaban la mutación G85E para una frecuencia de 1,2 % y 5 alelos presentaban la mutación V754M para una frecuencia de 1,9 %.

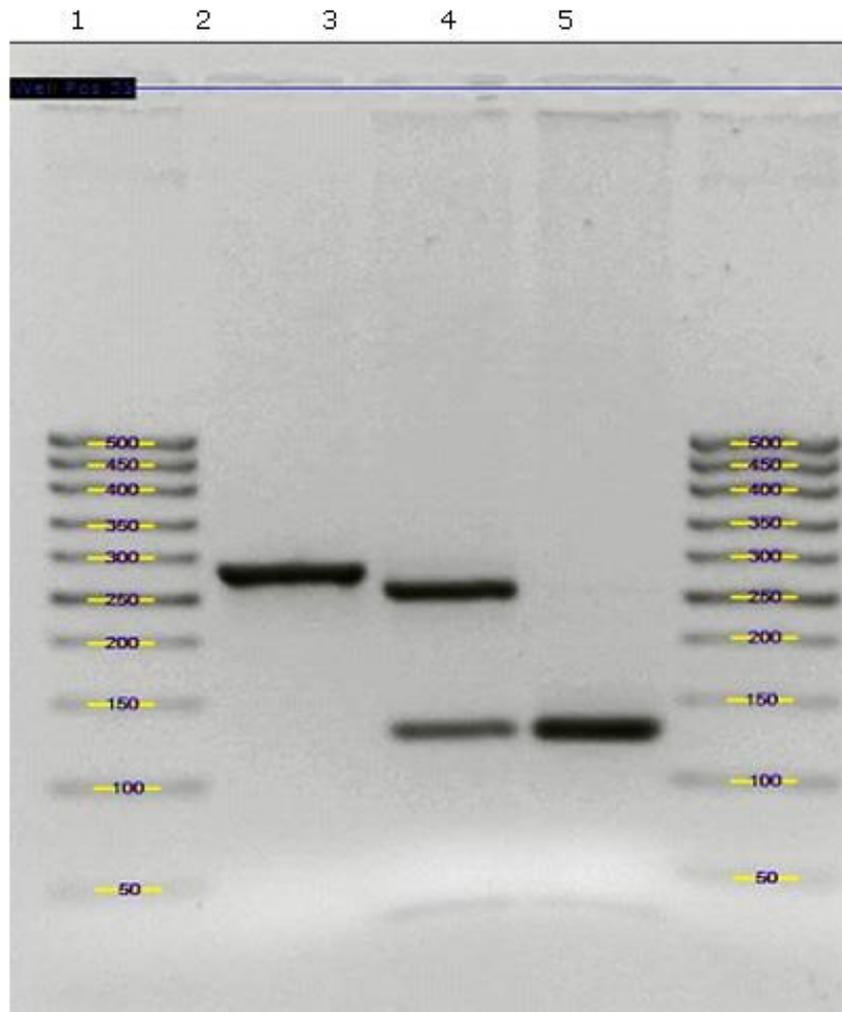


Fig. 1 - Electroforesis en gel de agarosa al 2 % para la detección de la mutación G85E. Carriles 1 y 5: patrón de peso molecular (PPM) de 50 pb, carril 2: producto de PCR íntegro, carril 3: muestra de paciente heterocigótico para la mutación, carril 4 muestra de paciente que no presenta la mutación.

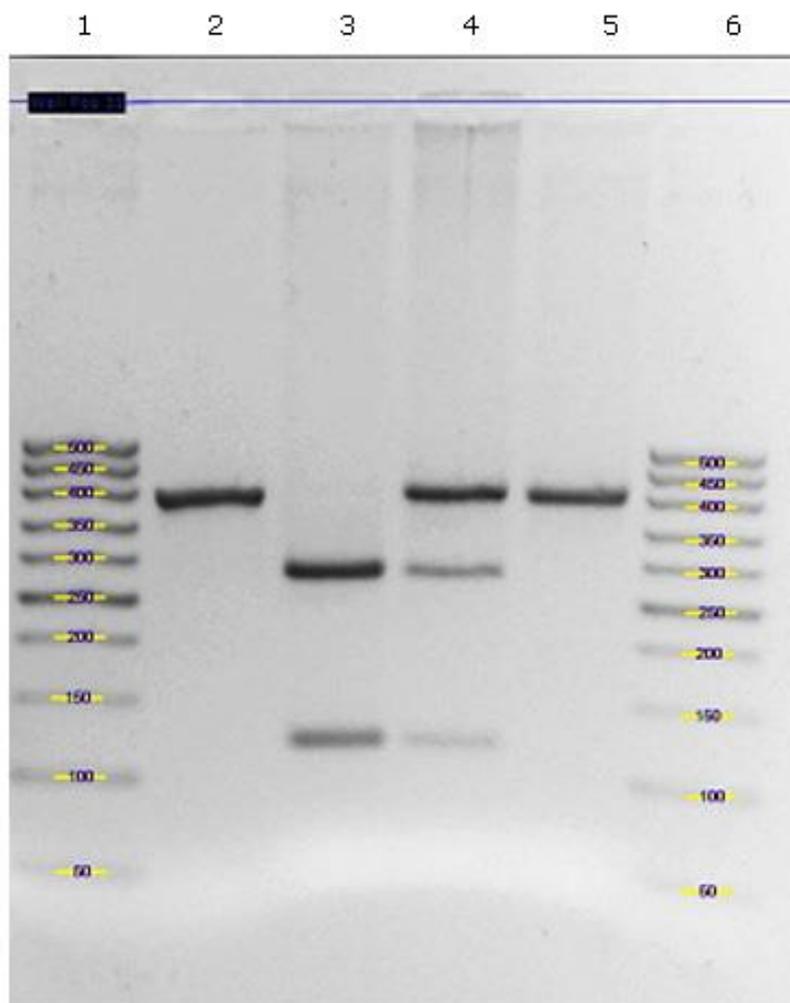


Fig. 2 - Electroforesis en gel de agarosa al 2% para la detección de la mutación V754M. Carriles 1 y 6: patrón de peso molecular (PPM) de 50 pb, carril 2: producto de PCR íntegro, carril 3: muestra de paciente homocigótico para la mutación, carril 4: muestra de paciente heterocigótico para la mutación, carril 5: muestra de paciente que no presenta la mutación.

Discusión

La población cubana es producto de una mezcla de poblaciones de diferentes orígenes étnicos: europeo, africano, amerindio y, en menor porción, asiático.⁽¹⁷⁾ La mayor contribución genética de nuestros ascendientes fue por parte española y africana, debido a la colonización de finales del siglo XV y la migración de esclavos africanos.⁽¹¹⁾ El grado de heterogeneidad genética alélica de enfermedades como la FQ varía según el grupo étnico de origen y/o la región geográfica⁽⁶⁾ y, en Cuba, debido a la mezcla de poblaciones es de esperar un alto grado.⁽⁵⁾ Las mutaciones reportadas en la Isla con mayor frecuencia son, F508del con 37,9 %, seguida de G542X 6,8 %, R334W 5,2 %, R553X 2,2 %, R1162X 2,0 % y 3120+1G>A 1,3 %.

La mutación G85E es un cambio de nucleótido G>A en la posición 386 en el exón 3, que provoca el cambio de ácido glutámico por glicina.⁽¹⁸⁾ A nivel mundial la frecuencia de la mutación G85E es de 0,4 %.⁽¹⁹⁾ En varios países de Europa se reporta una frecuencia de G85E por encima del 0,5 %. En el Medio Oriente hay mutaciones que se encuentran con mayor frecuencia que en Europa ya que la prevalencia varía no solamente por el origen étnico, sino también por el grado de consanguinidad, que es de alrededor del 65 %, ejemplo de esto es Israel con una frecuencia de G85E de 5,6 %.⁽¹⁴⁾ En África y Asia la FQ se considera rara y no existen reportes de esta mutación.⁽¹⁴⁾ En América la frecuencia de esta mutación varía de 8,9 % en Ecuador, país que ha reportado la mayor frecuencia a nivel mundial,⁽²⁰⁾ hasta 0,7 % en Argentina⁽²¹⁾ y Estados Unidos.⁽¹⁴⁾ En el presente estudio la frecuencia alélica de G85E es de 1,2 %. Cifras similares se reportan en España, en un estudio realizado a 780 familias con FQ, el 1 % presentaba la mutación.⁽⁴⁾ Los tres casos encontrados heterocigóticos en esta investigación provenían de provincias occidentales (La Habana, Mayabeque y Pinar del Río). La diferencia de frecuencias de una mutación entre las diferentes regiones de un país ya ha sido reportada.⁽¹⁴⁾

La mutación V754M es producida por un cambio de G>A en la posición 2260 en el exón 13. Existen pocos estudios sobre la mutación V754M, su frecuencia mundial es de 0,02 %.⁽¹⁹⁾ En México esta variante tiene una frecuencia de 0,5 %, ⁽¹⁵⁾ mientras que en Argelia es de 1,4 %.⁽²²⁾ En Cuba, según la presente investigación, su frecuencia es de 1,9 % (2 casos en La Habana, 1 en Santi Spíritus e igual cantidad en Santiago de Cuba). Similar estudio se realizó en Galicia, España, donde de 129 casos de fibroquísticos se reportó el 0,81 %.⁽²³⁾

Concluyendo, se determinó la presencia de las mutaciones G85E y V754M en pacientes cubanos con diagnóstico clínico de fibrosis quística, con una frecuencia de 1,2 y 1,9 %, respectivamente. Con estos valores de frecuencia es factible considerar la introducción de la detección de estas mutaciones en el diagnóstico molecular de los pacientes cubanos con fibrosis quística, lo que puede contribuir a un mejor asesoramiento genético a pacientes y familiares.

Referencias bibliográficas

1. Farrell PM, White TB, Ren CL, Hempstead SE, Accurso F, Derichs N, *et al.* Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J Pediatr.* 2017;181S:S4-S15.e1.
2. Savant AP, McColley SA. Cystic fibrosis year in review 2018, part 1. *Pediatr Pulmonol*; 2019. doi: [10.1002/ppul.24361](https://doi.org/10.1002/ppul.24361).

3. Lopes-Pacheco M. CFTR Modulators: Shedding Light on Precision Medicine for Cystic Fibrosis. *Front Pharmacol.* 2016;7:275.
4. Cutting GR. Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet.* 2015;16(1):45-56.
5. Razón R, Rodríguez F, Rojo M, González J, Abreu G, Pérez T, *et al.* La fibrosis quística en Cuba. *Rev Cubana Pediatría.* 2009;81(Supl):S85-92.
6. Savant AP, McColley SA. Cystic fibrosis year in review 2016. *Pediatr Pulmonol.* 2017;(8):1092-102.
7. Villanueva G, Marceniuk G, Murphy MS, Walshaw M, Cosulich R. Diagnosis and management of cystic fibrosis: summary of NICE guidance. *BMJ.* 2017;26(359):j4574.
- 8- *Cystic Fibrosis Mutation Database (CFTR1)*. Toronto (ON): Hospital for Sick Children (Ca); 2010 [actualizado: 04/2011; acceso: 05/01/2018]. Disponible en: <http://www.genet.sickkids.on.ca/app>
9. Dodge JA. A millennial view of cystic fibrosis. *Dev Period Med.* 2015;19(1):9-13.
10. Nedeljko R. Cystic Fibrosis. *Srp Arh Celok Lek.* 2012;140(3-4):244-9
11. Marcheco-Teruel B, Parra EJ, Fuentes-Smith E, Salas A, Buttenschon HN, Demontis D, Torres-Español M, *et al.* Cuba: exploring the history of admixture and the genetic basis of pigmentation using autosomal and uniparental markers. *PLoS Genet.* 2014;10(7):e1004488.
12. Collazo T, Bofill AM, Clark Y, Hernández Y, Gómez M, Rodríguez F, *et al.* Common mutations in Cuban cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros.* 2009;8(1):47-9.
13. Collazo T. Estudio Molecular de Fibrosis Quística en Cuba. [tesis de doctorado]. La Habana: Universidad de Ciencias Médicas de La Habana; 2006.
14. WHO Human Genetics Programme. The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis: report of a joint meeting of WHO/IECFTN/ICF(M)A/ECFS, Genoa, Italy, 19 June 2002. Geneva: World Health Organization. Acceso: 22/12/2017. Disponible en <http://www.who.int/iris/handle/10665/68702>
15. Bobadilla JL, Macek M Jr, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations-correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat.* 2002;19(6):575-606.
16. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.
17. García U, Catalino R., Morera LM, Hernández P, Estrada M, Bencomo A, *et al.* Origen y composición genética de la población cubana. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 2011;27(3):273-82.

18. Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem B, Grzelczak Z, Riordan JR, *et al.* Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics*. 1991;(1):214-28.
19. *The Clinical and Functional TRanslation of CFTR Database (CFTR2)*. Toronto (ON): Hospital for Sick Children (Ca). 2011 [actualizado: 04/2019; acceso: 05/06/2019]. Disponible en: <http://cftr2.org>
20. Ortiz SC, Aguirre SJ, Flores S, Maldonado C, Mejía J, Salinas L. Spectrum of CFTR gene mutations in Ecuadorian cystic fibrosis patients: the second report of the p.H609R mutation. *Mol Genet Genomic Med*. 2017;(6):751-7.
21. Visich A, Zielenski J, Castaños C, Diez G, Grenoville M, Segal E, *et al.* Complete screening of the CFTR gene in Argentine cystic fibrosis patients. *Clin Genet*. 2002;61(3):207-13.
22. Loumi O, Ferec C, Mercier B, Creff J, Fercot B, Denine R, *et al.* CFTR mutations in the Algerian population. *J Cyst Fibros*. 2008;7(1):54-9.
23. Raña P. Desarrollo de nuevas técnicas para el análisis genético en la fibrosis quística: aplicación al cribado neonatal [tesis de doctorado]. Santiago de Compostela (Ga): Universidad de Santiago de Compostela; 2008.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Javier Alejandro Martínez Seoane: trabajo de campo, revisión bibliográfica, redacción del documento, revisión y corrección del manuscrito.

Ixchel López Reyes: trabajo de campo, revisión y corrección del manuscrito, revisión y aprobación final del manuscrito.

Elvia Nelemi Santos González: trabajo de campo y aprobación final del manuscrito.

Antonio Alejandro Esperón Álvarez: trabajo de campo, revisión y corrección del manuscrito, revisión y aprobación final del manuscrito.

Claudia Barbón Sánchez: trabajo de campo y aprobación final del manuscrito.

Teresa Collazo Mesa: trabajo de campo, revisión y corrección del manuscrito, revisión y aprobación final del manuscrito.