

Perfil de las mutaciones del gen *CFTR* en una cohorte de pacientes cubanos con fibrosis quística

Anny Armas Cayarga¹, Juan E. Figueredo Lago¹, Yaimé J. González González¹, Teresa Collazo Mesa², Elvia N. Santos González², Claudia Barbón Sánchez², Gerardo Díez Rodríguez² y Antonio Melchor Rodríguez²

¹ Departamento de Biología Molecular, Centro de Inmunoensayo (CIE), calle 134 y 25 Ave., Cubanacán, Playa, La Habana, Código Postal 11600.

² Departamento de Genética, Centro Nacional de Genética Médica, Campus ICBP Victoria de Girón. Calle 146 No. 3102, Playa, La Habana 16, Código Postal: 11600, Cuba.

Autor de correspondencia: Anny Armas Cayarga, correo electrónico: anny.armas@cie.cu

RESUMEN

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva causada por la presencia de mutaciones en ambas copias del gen de la proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR). En este estudio, determinamos las mutaciones del gen *CFTR* en una cohorte de 129 pacientes cubanos con fibrosis quística usando el ensayo comercial CF StripAssay 4-410, (ViennaLab Diagnostics, Austria). Se detectó al menos una mutación del gen *CFTR* en 111 de los pacientes (86,0%), incluidas cuatro mutaciones descritas por primera vez en la población cubana (1717-1G>A, 3849+10kbC>T, N1303K e Y1092X). Además, se identificó el polimorfismo IVS8 5T en el 2,3% de los alelos *CFTR*. El presente trabajo contribuye de manera significativa al conocimiento del perfil de mutaciones del gen *CFTR* en la población cubana, lo que permite un diagnóstico y tratamiento fiables de la FQ que pueden mejorar tanto la supervivencia como su calidad de vida.

Palabras clave: *Fibrosis quística, CFTR, polimorfismos.*

INTRODUCCIÓN

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva causada por la presencia de mutaciones en ambas copias del gen de la proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (*CFTR*) (Dequeker et al., 2008).

Hasta la fecha, se han identificado más de 2000 mutaciones en el gen *CFTR* (www.genet.sickkids.on.ca/cftr). Sin embargo, la mutación F508del ha sido reportada en todo el mundo en el 66-70% de los pacientes con FQ (Nutan et al., 2012; Sosnay et al., 2013).

Según la Sociedad Europea de Fibrosis Quística, el diagnóstico de FQ actualmente se basa en: (1) un resultado positivo mediante la prueba de sudor con determinación de cloruro (valores superiores a 59 mmol/L) y/o (2) dos mutaciones en trans que causan FQ y (3) la presencia de algunas manifestaciones clínicas, que incluyen bronquiectasias difusas, cultivos de esputo positivos para un patógeno asociado a la FQ, insuficiencia pancreática exocrina, síndrome de pérdida de sal y azoospermia obstructiva (Smyth et al., 2014).

La prueba del sudor constituye el estándar de oro para el diagnóstico confirmatorio de FQ, mientras que el análisis genético se utiliza en la detección prenatal y preconcepcional de portadores con el fin de identificar el riesgo de tener un hijo con FQ (Schrijver et al., 2005; Castellani et al., 2008). Además, puede ser útil en el diagnóstico de aquellos pacientes portadores de una o más mutaciones que confieren suficiencia pancreática exocrina, donde las concentraciones de cloruro en el sudor pueden estar dentro del rango de referencia de personas sanas. En muchos de estos pacientes, el análisis genético puede respaldar el diagnóstico de FQ (De Boeck et al., 2006). Teniendo en cuenta su utilidad y que la Fibrosis Quística constituye una enfermedad genética hereditaria, el análisis genético debería incluirse en el diagnóstico de rutina.

La población cubana es descendiente mayoritariamente de españoles caucásicos y negroafricanos. Por estudios realizados utilizando marcadores moleculares autosómicos, se reporta que el genoma cubano está formado por el 72% de los genes de origen europeo, el 20% de los genes de origen africano y el 8%

de los nativos americanos (López et al., 2015). A pesar de la composición racial mixta de los cubanos, se ha reportado una incidencia significativa de FQ: 1 por 9862 recién nacidos (González et al., 2014).

El objetivo del presente trabajo es describir el perfil de mutaciones del gen *CFTR* en una cohorte de 129 pacientes cubanos con fibrosis quística.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras de pacientes

Se recogieron muestras de sangre de 129 pacientes procedentes de diferentes provincias de Cuba, con diagnóstico de FQ, que tenían entre 1 y 41 años de edad (Media de edad: 12,8 años). La distribución por edades fue la siguiente: De 1-10 años [66 pacientes (51,2%)]; de 11-20 años [30 pacientes (23,3%)]; de 21-30 años [22 pacientes (17,0%)] y de 31-41 años [11 pacientes (8,5%)]. De los 129 pacientes con FQ, 70 (54,3%) eran hombres y 59 (45,7%) eran mujeres. La Comisión Nacional Cubana de FQ recomienda la evaluación de estos pacientes considerando los síntomas relacionados con la FQ (infecciones pulmonares persistentes, bronquiectasias, cultivos positivos de esputo para un patógeno asociado a la FQ, especialmente *P. aeruginosa*, bloqueo intestinal particularmente en recién nacidos íleo meconial, y la insuficiencia pancreática), y los resultados de la prueba de sudor (valores superiores a 59 mmol/L). Todos los pacientes incluidos en este estudio cumplieron con los criterios de diagnóstico descritos por la Comisión Nacional Cubana de FQ, mostrando niveles elevados de cloruro en sudor (> 59 mmol/L) en dos determinaciones. El Comité de Ética, que pertenece al Centro Nacional de Genética Médica de La Habana, Cuba, obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los pacientes o sus padres.

Análisis de mutaciones del gen *CFTR*

Extracción de ADN

El ADN genómico humano (ADNg) se aisló a partir de sangre periférica que contenía ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), empleando el método de "salting out" (Miller, 1988). Después del procedimiento de extracción, todas las muestras de ADNg se almacenaron a -20 °C. Como parte de un convenio de

colaboración, el Centro Nacional de Genética Médica proporcionó muestras de ADNg al Centro de Inmunoensayo, donde se realizaron los análisis genéticos. Antes de un análisis posterior, la concentración y pureza del ADNg se determinaron fotométricamente (DO a 260 nm y la relación DO 260 nm/DO 280 nm, respectivamente). La concentración de ADNg estaba en el rango de 5-40 µg/ml por muestra, como se recomienda para realizar la prueba CF StripAssay 4-410 (ViennaLab Diagnostics, Viena, Austria), mientras que se obtuvo una relación DO260nm/DO280nm en el rango de 1,8-1,9 en todos los casos, indicando una adecuada pureza del ADN purificado, con relación a los contaminantes proteicos (Datos no mostrados).

Identificación de mutaciones en el gen *CFTR*

Para la identificación de mutaciones en el gen *CFTR*, se seleccionó el kit comercial CF StripAssay 4-410 teniendo en cuenta que detecta 34 mutaciones del gen *CFTR*, con una alta frecuencia a nivel mundial. Por otra parte, también se tuvo en cuenta el requerimiento tecnológico para su ejecución, así como la simplicidad del procedimiento del ensayo. El CF StripAssay 4-410 es un ensayo para la detección de 34 mutaciones en el gen *CFTR* basado en PCR e hibridación inversa. El procedimiento incluye tres pasos: (1) aislamiento del ADN, (2) amplificación por PCR utilizando cebadores marcados con biotina, (3) hibridación de los productos de amplificación en tiras que contienen sondas de oligonucleótidos alelo-específicas fijadas en líneas paralelas. Las secuencias marcadas con biotina unidas a la tira se detectan utilizando estreptavidina-fosfatasa-alcalina, que reacciona con un sustrato de color.

La amplificación y detección de las secuencias específicas del gen *CFTR* se realizaron de acuerdo con los procedimientos descritos en el manual de la prueba CF StripAssay 4-410. Este ensayo detecta 34 mutaciones en el gen *CFTR*: c.54-5940_273+10250del, c.1519_1521delATC, c.1521_1523delCTT, c.1585-1G>A, c.1624G>T, c.1652G>A, c.1657C>T, c.1679G>C, c.2012delT, c.2051_2052delAAinsG, c.2052delA, c.2052_2053insA, c.2657+5G>A, c.3484C>T, c.3528delC, c.3773dupT, c.3846G>A, c.3909C>G, c.254G>A, c.262_263delTT, c.350G>A, c.366T>A, c.489+1G>T, c.579+1G>T, c.948delT, c.1000C>T, c.1040G>A, c.1040G>C, c.1364C>A,

c.1766+1G>A, c.2988+1G>A, c.3140-26A>G, c.3276C>A, c.3718-2477C>T, y el polimorfismo c.1210-12T[5]. La lectura e interpretación de los resultados se realizó según instrucciones de la prueba comercial.

Análisis de los resultados

Las frecuencias genotípicas y alélicas fueron calculadas por conteo directo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las frecuencias relativas de las mutaciones del gen *CFTR* detectadas en la cohorte analizada se resumen en la tabla 1. Se detectó al menos una mutación del gen *CFTR* en 111 pacientes (86,0%). Se identificó una sola mutación en 51/129 pacientes (39,5%) y se detectaron dos alelos causantes de FQ en 60/129 individuos (46,5%), mientras que 18/129 individuos

(14,0%) no presentaron ninguna mutación del gen *CFTR* (datos no mostrados). Como era de esperar, la mutación F508del fue la más frecuente en la población estudiada, detectándose en aproximadamente la mitad de todos los alelos *CFTR* mutantes (tabla 1). En América Latina, la frecuencia de F508del varía del 59% (Argentina) al 23% (Costa Rica) (Pérez et al., 2007).

De 258 alelos *CFTR*, no se identificaron mutaciones del gen *CFTR* en 88 alelos (34,1%). Para todos estos alelos desconocidos, se recomienda la confirmación mediante secuenciación directa del ADN.

En América Latina hasta hace apenas unos años, pocos países habían informado estudios genéticos relacionados con la FQ. En América Latina se han reportado tasas muy altas de detección de alelos mutantes en el gen *CFTR*, empleando metodologías más profundas para el análisis de las mutaciones en el gen

Tabla 1. Frecuencias relativas de las mutaciones del gen *CFTR* en la cohorte de pacientes cubanos con FQ (n=129).

Mutación/polimorfismo (Nomenclatura HGVS)	Frecuencia	
	Número de cromosomas	%
F508del (c.1521_1523delCTT)	91	35,3
G542X (c.1624G>T)	18	7,0
R334W (c.1000C>T)	19	7,4
I507del (c.1519_1521delATC)	15	5,8
R1162X (c.3484C>T)	7	2,7
G85E (c.254G>A)	5	1,9
R553X (c.1657C>T)	4	1,6
3120+1G>A (c.2988+1G>A)	3	1,2
1717-1G>A (c.1585-1G>A)	2	0,8
3849+10kbC>T (c.3718-2477C>T)	2	0,8
2183AA>G (c.2051_2052delAAinsG)	1	0,4
N1303K (c.3909C>G)	1	0,4
Y1092X (c.3276C>A)	1	0,4
3272-26 A>G (c.3140-26A>G)	1	0,4
IVS8 5T (c.1210-12T[5])	6	2,3
Total de alelos <i>CFTR</i> con mutaciones	170	65,9
Total de alelos <i>CFTR</i> sin mutaciones	88	34,1

Las mutaciones reportadas por primera vez en la población cubana aparecen en negrita. HGVS, del inglés *Human Genome Variation Society*. Sistema de nomenclatura más reciente para describir variantes de secuencia del gen de la proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (Berwouts et al., 2011).

CFTR y estudios en poblaciones de origen caucásico (Pepermans et al., 2016; Faucz et al., 2007). Tal es el caso de un estudio reciente realizado en Argentina (Pepermans et al., 2016), en el que la sensibilidad total fue del 91% (151/166 alelos). En este estudio, los autores utilizaron el análisis del fenotipo combinado con un panel europeo de tamizaje de 71 mutaciones seguido de la secuenciación por el método de Sanger y un amplio estudio de reordenamiento para caracterizar la identificación y distribución de mutaciones *CFTR* en la provincia de Santa Fe (Pepermans et al., 2016). En otra investigación realizada en Brasil, Faucz y colaboradores analizaron muestras de ADN de 56 pacientes brasileños de origen caucásico con FQ, utilizando las técnicas de polimorfismo de conformación de cadena simple y electroforesis en gel de gradiente desnaturizante, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción y secuenciación directa de ADN, identificando mutaciones del gen *CFTR* en alrededor de un 90% de los alelos FQ (Faucz et al., 2007).

Existen reportes de tasas similares o más bajas de detección de alelos mutantes del gen *CFTR*, comparadas con la obtenida en nuestro estudio, donde los autores analizaron un bajo número de mutaciones del gen *CFTR*, en poblaciones con características raciales mixtas. Tal es el caso de la detección de solo el 26% de alelos *CFTR* con mutaciones en un estudio realizado en el Norte de Brasil en el que los autores evaluaron 4 mutaciones (Araujo et al., 2005), un 54,5% de sensibilidad para la detección de 11 mutaciones en otro estudio realizado en el Sur de Brasil (Streit et al., 2003) y un 68% de sensibilidad para la detección de 8 mutaciones del gen *CFTR* en 111 recién nacidos diagnosticados por el Programa de Tamizaje Neonatal de Fibrosis Quística de Minas Gerais, Brasil, utilizando PCR alelo-específica (Perone et al., 2010).

El porcentaje de alelos del gen *CFTR* sin mutaciones que obtuvimos en nuestro estudio puede deberse a que el CF StripAssay detecta mutaciones que tienen una alta frecuencia a nivel mundial pero no incluye otras variantes frecuentes en países de América Latina que podrían estar presentes en la población cubana (1811+1,6KbA>G; S549N; S549R y R1066C) (Pérez et al., 2007) u otras que no se hayan identificado pre-

viamente en esta área geográfica.

En Cuba se han realizado muy pocos estudios genéticos para la caracterización molecular de pacientes cubanos con FQ. Collazo y colaboradores realizaron estudios previos sobre la caracterización molecular del gen *CFTR* en la población cubana con FQ para la identificación de algunas mutaciones específicas de este gen. En un estudio publicado en el 2008 (Collazo et al., 2008), los autores detectaron nueve mutaciones del gen *CFTR* (G542X, 3272-26A>G, F508del, R553X, Y109C, I507del, 2183AA>G, L206W y P99L) en 23 muestras seleccionadas al azar, de pacientes incluidos en el registro nacional cubano de FQ. En otro estudio publicado en el 2009 (Collazo et al., 2009), se analizaron siete mutaciones del gen *CFTR* (F508del, G542X, R1162X, N1303K, R334W, R553X y 3120+1G>A) en 153 pacientes con FQ. En nuestro estudio obtuvimos frecuencias alélicas similares a las obtenidas por Collazo y colaboradores en el año 2009, para las mutaciones del gen *CFTR* identificadas en ambos estudios (tabla 2).

Con el uso del estuche comercial CF StripAssay 4-410, que incluye un mayor número de mutaciones en comparación con las previamente estudiadas (Collazo et al. 2008, 2009), identificamos cuatro mutaciones del gen *CFTR* (1717-1G>A, 3849+10kbC>T, N1303K e Y1092X) (tabla 1) nunca antes descritas en la población cubana. De acuerdo con Pérez et al. (2007), la mutación N1303K tiene una alta prevalencia en países de América Latina, con una frecuencia superior al 1%. Se reportó además la presencia de la mutación 1717-1G>A (0,32%) en Argentina, Brasil y Uruguay, mientras que la mutación 3849+10kbC>T se encontró en Argentina y México, con una frecuencia cromosómica de 0,41%. La mutación Y1092X es menos común en América Latina, con una frecuencia de 0,11%. En contraste, la mutación W1282X no se detectó en el presente estudio y nunca se ha reportado en Cuba, a pesar de tener una alta frecuencia (1,13%) en América Latina (Pérez et al., 2007; Collazo et al., 2008, 2009).

En este estudio, detectamos el polimorfismo IVS8 5T en el 2,3% de los alelos FQ estudiados (tabla 1). Esta variante, con una frecuencia de aproximadamente 5% en la población mundial (Van Hoorenbeeck et al.,

Tabla 2. Análisis comparativo de mutaciones del gen *CFTR* con un estudio similar realizado en Cuba.

Mutación/Frecuencia (%)	Estudio actual (Armas y col, 2018) n=129	Estudio (Collazo y col, 2009) n=153
c.1521_1523delCTT	35,3	37,9
c.1624G>T	7,0	6,8
c.1000C>T	7,4	5,2
c.1519_1521delATC	5,8	-
c.3484C>T	2,7	2,0
c.254G>A	1,9	-
c.1657C>T	1,6	2,2
c.2988+1G>A	1,2	1,3
c.1585-1G>A	0,8	-
c.3718-2477C>T	0,8	-
c.2051_2052delAAinsG	0,4	-
c.3909C>G	0,4	0
c.3276C>A	0,4	-
c.3140-26A>G	0,4	-

2007; Girardet et al., 2016) nunca antes se había reportado en Cuba (Collazo et al., 2008, 2009). Puede asociarse a la infertilidad masculina en algunos pacientes portadores de una mutación FQ en trans.

En resumen, el presente trabajo contribuye de manera significativa al conocimiento del perfil de mutaciones del gen *CFTR* en la población cubana, identificándose cuatro mutaciones y el polimorfismo IVS8 5T, nunca antes reportados en estudios genéticos realizados en Cuba. Estos resultados permiten ofrecer un asesoramiento genético y cálculo de riesgo en pacientes portadores de FQ en la población cubana. A su vez, el conocimiento del perfil de mutaciones del gen *CFTR* permite un diagnóstico y tratamiento fiables de la FQ, mejorando la supervivencia y la calidad de vida de estos pacientes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al Dr. Julio Raúl Fernández Masso, PhD y al Dr. Boris Ernesto Acevedo Castro, PhD, del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, por su apoyo en la edición y corrección del manuscrito así como por sus sugerencias para esta publicación. A su vez, agradecemos al Dr. Fidel Rodríguez Cala, presidente de la Comi-

sión Nacional Cubana de FQ, por su gran apoyo en la colección de los datos de los pacientes que participaron en este estudio.

CONFLICTO DE INTERESES

Todos los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

Araújo FG, et al. Prevalence of deltaF508, G551D, G542X, and R553X mutations among cystic fibrosis patients in the North of Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2005 Jan;38(1):11-5. doi: 10.1590/S0100-879X2005000100003.

Berwouts S, et al. Mutation Nomenclature in Practice: Findings and Recommendations from the Cystic Fibrosis External Quality Assessment Scheme. *Human Mutation* 2011; 00 (0): 1–7. doi: 10.1002/humu.21569.

Castellani C, et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros.* 2008 May;7(3):179-96. doi: 10.1016/j.jcf.2008.03.009.

Collazo T, et al. Detection of mutations in Cuban cys-

- tic fibrosis patients. *Biotechnol Appl.* 2008;25:345-9.
- Collazo T, et al. Common mutations in Cuban cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros.* 2009 Jan;8(1):47-9. doi.org/10.1016/j.jcf.2008.09.004.
- Cystic Fibrosis Mutation Database (CFMDB). URL: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr> [22-01-2018].
- De Boeck K, et al. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax* 2006 Jul;61(7): 627-35. doi: 10.1136/thx.2005.043539
- Dequeker E, et al. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders—updated European recommendations. *Eur. J. Hum. Genet.* 2009 Jan;17(1):51-65. doi: 10.1038/ejhg.2008.136.
- Faucz FR, et al. Cystic fibrosis in a southern Brazilian population: characteristics of 90% of the alleles. *Clin Genet* 2007; 72: 218-23. doi: 10.1111/j.1399-0004.2007.00854.x.
- Girardet A, et al. The improvement of the best practice guidelines for preimplantation genetic diagnosis of cystic fibrosis: toward an international consensus. *European Journal of Human Genetics* 2016; 24: 469-78. doi:10.1038/ejhg.2015.99.
- González JA, et al. Reseña histórica de la fibrosis quística y su estudio y tratamiento en Cuba. *Rev cubana Pediatr.* 2014 Dic;86(4):535-40.
- López I, et al. Distribution of the most frequent cystic fibrosis mutations in Cuba. *Rev Cubana Genet Comunit.* 2015; 9(2):9-16.
- Miller SA, et al. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988 Feb; 16(3):1215-18.
- Nutan M, et al. Association of CFTR gene mutation with bronchial asthma. *Indian J Med Res.* 2012 Apr; 135(4):469-78.
- Pepermans X, et al. Identification and frequencies of cystic fibrosis mutations in central Argentina. *Clin Biochem.* 2016 Jan;49(1-2):154-60. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2015.10.007.
- Pérez MM, et al. CFTR gene analysis in Latin American CF patients: Heterogeneous origin and distribution of mutations across the continent. *J Cyst Fibros.* 2007 May;6(3):194-208. doi: 10.1016/j.jcf.2006.07.004
- Perone C, et al. Frequency of 8 CFTR gene mutations in cystic fibrosis patients in Minas Gerais, Brazil, diagnosed by neonatal screening. *Braz J Med Biol Res.* 2010 Feb;43(2):134-8.
- Schrijver I, et al. Genotyping Microarray for the Detection of More Than 200 CFTR Mutations in Ethnically Diverse Populations. *J Mol Diagn.* 2005 Aug;7(3):375-87. doi: 10.1016/S1525-1578(10)60567-3.
- Smyth AR, et al. European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Best Practice guidelines. *J Cyst Fibros.* 2014 May;13 Suppl 1: S23-42. doi: 10.1016/j.jcf.2014.03.010.
- Sosnay PR, et al. Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nat Genet.* 2013 Oct;45(10):1160-7. doi: 10.1038/ng.2745.
- Streit C, et al. CFTR gene: molecular analysis in patients from South Brazil. *Mol Genet Metab.* 2003 Apr;78(4):259-64.
- Van Hoorenbeeck K, et al. N1303K and IVS8-5T, clinical presentation within a family with atypical cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2007 May;6(3):220-2. doi: 10.1016/j.jcf.2006.10.002.

Artículo recibido: 24 enero 2018

Artículo aceptado: 29 agosto 2018

Artículo publicado online: 5 septiembre 2018

Profile of *CFTR* gene mutations in a cohort of Cuban patients with cystic fibrosis

ABSTRACT

Cystic fibrosis (CF) is an inherited autosomal recessive disease caused by the presence of mutations in both copies of the gene for the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) protein. In this study, we determined the CFTR gene mutations in a cohort of 129 Cuban patients with cystic fibrosis using the commercial CF StripAssay 4-410 panel, (ViennaLab Diagnostics, Austria). At least one CFTR gene mutation was detected in 111 patients (86.0%) including four mutations described for the first time in Cuban population (1717-1G>A, 3849+10kbC>T, N1303K and Y1092X). In addition, the polymorphism IVS8 5T was identified in the 2.3% of the CFTR alleles. The present work makes a significant contribution to knowledge of the CFTR gene mutations profile in Cuban population, allowing reliable CF diagnosis and treatment that can improve both survival and quality of life.

Keywords: *Cystic fibrosis, CFTR, polymorphism.*