

Artículo

FIBROSIS QUÍSTICA EN PACIENTES DE LA REGIÓN CENTRO-OCCIDENTAL VENEZOLANA: IDENTIFICACIÓN DE FOCOS GEOGRÁFICOS.

CYSTIC FIBROSIS IN PATIENTS OF THE WEST-CENTRAL REGION IN VENEZUELA: IDENTIFICATION OF GEOGRAPHIC FOCUS.

Manuel Rolo¹
María F. Baeta²
José A. Martínez³
Leidys Osorio¹
Nancy Moreno³

RESUMEN

La Fibrosis Quística (FQ) es una enfermedad genética, causada por mutaciones en el gen de la proteína reguladora de la conductancia transmembrana (CFTR). Actualmente se han identificado más de 1900 mutaciones, la más común es pF508del predominante en Europa. En Venezuela se han reportado pocas mutaciones: pF508del, pG542X, pR553X, 3120+1G'A. El objetivo del trabajo fue determinar la frecuencia de seis mutaciones del gen CFTR en pacientes de la región Centro-Occidental de Venezuela e identificar focos geográficos de la enfermedad. Se incluyeron sesenta pacientes no consanguíneos, con características clínicas consistentes con diagnóstico de FQ y sesenta familiares sanos. Se revisaron las historias clínicas para investigar las variables: sexo, edad al momento del diagnóstico, concentración de cloruros en sudor, lugar de nacimiento del paciente y los abuelos. Una vez obtenido el consentimiento informado, se tomó una muestra de 2 mL de sangre para extraer ADN y se indagaron las mutaciones: pF508del, pG542X, pR553X, pG551D, pN1303K y pG85E. Las mutaciones encontradas y sus frecuencias fueron: pF508del (39,16%), pG542X (4,17%) y pR553X (2,50%); el 54,17% son mutaciones diferentes a las seis investigadas y se les denominó OTRA. Se identificaron siete genotipos, pero sólo 25% son completos (pF508del/pF508del, pF508del/pG542X y pF508del/pR553X). Se identificaron quince focos geográficos de FQ ubicados en las regiones siguientes: a) Centro-Occidental (05), b) Centro-Norte Costera (03), c) Central (01), d) Sur-Oeste (03), e) Sur-Este (01) y f) Oriental (02). Estos resultados contribuyen a mejorar la calidad de vida de los pacientes y sus familias y son importantes para el Programa Nacional de FQ.

PALABRAS CLAVE: Fibrosis Quística, Genotipo, Focos Geográficos.

ABSTRACT

The Cystic Fibrosis (CF) is a genetic disease caused by mutations in the CF transmembrane conductance regulator gene (CFTR). At present, more than 1900 mutations have been identified. The most common CFTR mutation is pF508del, it is predominant in Europe. Few mutations have been reported in Venezuela: pF508del, pG542X, pR553X, 3120+1G'A. The objective of this work was to determine the frequency of six CFTR mutations in patients from the Western Central Region of Venezuela and to identify CF geographical focuses. Sixty unrelated patients with clinical features consistent with CF diagnosis and sixty healthy relatives were included. The clinical records were reviewed to investigate: sex, age at diagnosis, sweat chloride values and birthplace of patients and grandparents. Two mL of whole blood samples were drawn from patients, after informed consent and DNA was extracted; the pF508del, pG542X, pR553X, pG551D, pN1303K and pG85E mutations were investigated. The mutations found and their frequency were: pF508del (39.16%), pG542X (4.17%) and pR553X (2.50%). There were 54.17% different mutations from the six investigated and they were called OTHER. Seven genotypes were identified, but only 25% are complete (pF508del/pF508del, pF508del/pG542X and pF508del/pR553X). Fifteen CF geographical focuses were identified, which are located in the following regions: a) Western Central (05), b) North Central Coast (03), c) Central (01), d) South-West (03), e) South-East (01), f) Oriental (02). The results of this research contribute to improve the quality of life in patients and their families, and they are important for the National CF Program.

KEY WORDS: Cystic Fibrosis, Genotype, Geographical Focus.

¹Unidad Proyecto Aragua Universidad de Carabobo Sede Aragua. ²Laboratorio de Biología Molecular CIADANA Universidad de Carabobo Sede Aragua. ³Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED) "Dr. Francisco J. Triana Alonso" Universidad de Carabobo Sede Aragua. Venezuela. Correspondencia: nanmorja@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

La Fibrosis Quística (FQ: OMIN 219700) es una enfermedad hereditaria con patrón de herencia autosómico recesivo, caracterizada por: íleo meconial, enfermedad pulmonar progresiva, insuficiencia pancreática exocrina, concentración elevada de cloruros en sudor y retraso en el crecimiento; esto último se produce por una combinación del gasto calórico aumentado por las infecciones respiratorias crónicas y la malnutrición debido a la insuficiencia pancreática exocrina. La progresión de la enfermedad pulmonar es el principal determinante de la morbimortalidad. La mayoría de los pacientes mueren por insuficiencia respiratoria. La supervivencia media en Estados Unidos es de 37,4 años.¹ Una de las explicaciones de la expresividad variable en los pacientes con FQ es la heterogeneidad alélica, dada porque un paciente puede tener dos mutaciones diferentes del gen. Algunos pacientes sufren las formas clásicas de presentación de la enfermedad con insuficiencia pancreática, enfermedad pulmonar grave y progresiva, ausencia congénita de los conductos deferentes, mientras que pacientes portadores de otros alelos, pueden manifestar afectación pulmonar con función pancreática normal y otros sólo presentan alteraciones del tracto reproductor masculino.²

Esta patología es causada por mutaciones en el gen que codifica la proteína reguladora de la conductancia transmembrana (CFTR, por sus siglas en inglés), en la actualidad están descritas un número aproximado de 1900 mutaciones,³ la más frecuente es una deleción en el codón que codifica fenilalanina en posición 508 en el exón 10 y se denomina pF508del, predominante en Europa.³ En Latinoamérica, la mutación pF508del se muestra con frecuencias muy variables, por ejemplo 60,9% y 58,6% en Argentina (4,5), 45% en Chile⁶ y con valores menores en Uruguay (40,4%),⁷ 41,8% en Colombia,⁸ Ecuador (37,1%)⁹ y Costa Rica (23,0%);¹⁰ en Venezuela se han publicado valores diferentes según la región, así en la ciudad de Caracas se obtuvo 50% de frecuencia¹¹ mientras que en la zona Central en Valencia 41,9%¹² y en la ciudad de Maracaibo ubicada en el Occidente del país se reportaron frecuencias de 29,6%¹³ y 26,79%.¹⁴ Dentro de las otras mutaciones más comunes en el mundo se encuentran: pG542X, pG551D, pN1303K, pR1162X, pR553X y pG85E,³ todas ellas se han detectado en varios países de Latinoamérica, pero con variaciones importantes de un país a otro.^{6-9,13-18} En Venezuela se han reportado pocas mutaciones: pF508del, pG542X, pR553X, 3120+1G-'A,^{12-14,19-20} y se ha señalado la existencia de focos geográficos de FQ en función de criterios clínicos, siendo los

estados Sucre y Nueva Esparta los focos más importantes, seguido de ciudades como: Valencia y sus alrededores (Estado Carabobo), Boconó (Estado Trujillo), Guachara, El Yagual y Atamaica (Estado Apure), Duaca, Cabudare y Barquisimeto (Estado Lara), La Grita (Estado Táchira), Tumeremo (Estado Bolívar), Urumaco y el Pedregal (Estado Falcón) y Villa de Cura (Estado Aragua).²¹ Por otra parte, Torres y col¹² al indagar la presencia de la mutación pF508 en los pacientes atendidos en un centro de salud de Valencia, reportaron la existencia de focos geográficos en varias poblaciones cercanas de la región Centro Occidental: Valencia y Tacarigua (Estado Carabobo), Tinaco (Estado Cojedes), Tucacas (Estado Falcón) y Aroa (Estado Yaracuy).

Desde el punto de vista de la epidemiología genética, la detección de las mutaciones causantes de esta enfermedad en la región centrooccidental del país y la identificación de focos geográficos de distribución de genes FQ, es una información importante para la salud pública, el control de la enfermedad y el mejoramiento de la calidad de vida de los pacientes. Dentro de este orden de ideas, esta investigación estuvo orientada al logro de los objetivos siguientes: 1) Efectuar la pesquisa de las mutaciones pF508del, pG542X, pR553X, pN1303K, pG85E y pG551D, en sesenta pacientes con diagnóstico presuntivo de FQ y sesenta familiares de estos pacientes, 2) Identificar los focos geográficos de distribución de mutaciones causantes de FQ.

SUJETOS Y MÉTODOS

Esta investigación es un estudio descriptivo retrospectivo; la población estuvo representada por todos los pacientes referidos de centros públicos y privados, con impresión diagnóstica de FQ, quienes fueron atendidos en la Consulta de Asesoramiento Genético de la Unidad Proyecto Aragua (UPA) de la Universidad de Carabobo Núcleo Aragua. En la muestra se incluyeron 60 casos índice sin relación de consanguinidad (35 pertenecen al sexo masculino y 25 al sexo femenino). Los criterios de inclusión fueron los siguientes: a) tener el diagnóstico clínico sugestivo de FQ, b) poseer dos pruebas de concentración de cloruros en sudor con valores \geq a 37 mEq/L, este último criterio se tomó con base a estudios previos en pacientes con FQ atendidos en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas,¹⁹ donde se determinó que aproximadamente 40% de pacientes venezolanos con FQ, tiene la concentración de cloruros con valores \geq 37 mEq/L; c) haber dado el consentimiento informado y en el caso de menores de edad tener el consentimiento de padres y/o representantes y d) haber acudido a la toma de muestra sanguínea para análisis de ADN. También se

incluyó una muestra de 60 familiares de 22 casos índice, con el fin de identificar a los portadores sanos; es decir, aquellas personas que tienen una sola mutación, no sufren la enfermedad, pero al constituir una pareja con otro portador, existe una probabilidad de 25% de tener descendientes enfermos, 50% de portadores sanos y 25% de sanos.

Evaluación clínica

A todos los pacientes se les realizó la historia clínica completa, la cual incluyó los datos generales, el árbol genealógico, antecedentes familiares, procedencia geográfica y lugar de nacimiento de padres, abuelos y bisabuelos, con el fin de precisar aspectos de endogamia y consanguinidad ya que ambos incrementan la posibilidad que los individuos sean homocigotos para un alelo heredado de un antecesor común.

Posteriormente se efectuó el examen físico completo y la revisión de los otros estudios realizados al paciente, con énfasis en los sistemas respiratorios y digestivo. Se determinó la concentración de cloruros, siguiendo una modificación del método de Gibson y Cooke²² así como la medición cualitativa y cuantitativa de Esteatorrea a partir de las muestras de heces de los pacientes con las pruebas de Sudán III y Esteatocrito.²³

Revisión de historias clínicas

Se efectuó la revisión de las historias clínicas para obtener información sobre las variables: sexo, concentración de cloruros en sudor, edad al momento del diagnóstico, lugar de nacimiento del paciente y de los abuelos por ambas ramas parentales.

Diagnóstico Molecular

A todos los pacientes y a sus familiares les fue tomada una muestra de 1 mL de sangre, para aislar ADN a través del método de extracción salina de acuerdo a los lineamientos de Miller y col.,²⁴ la pureza y concentración se determinaron mediante espectrofotometría y la integridad se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. La amplificación de las secuencias de interés se realizó a través del método de Friedman y col.²⁵ con algunas modificaciones, empleando los oligonucleótidos cebadores siguientes: F-gcaccattaaagaatatgat y R-cattcacagtagettaccca para la mutación pF508del, F-gcagagaagacaatatagttcct y R-gaccagattctgagtaaccaat para pG542X, F-caactgtggttaaagcaatagtgt y R-gcacagattctgagtaaccataat para pG551D y pR553X, F-

aatgttcacaagggactcca y R-cactccactgttcatagggattccag para pN1303K. Para la mutación pG85E se utilizaron los oligonucleótidos: Sggagatttatgttctatgg, Mggagatttatgttctatga y Rgtaaattgccaccgtgtccagg, los cuales fueron tomados de Perone y col.¹⁷ Para el ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la mezcla de incubación contenía: Tampón PCR 1X; dNTPs 180 μ M; MgCl₂ 3 mM; oligonucleótidos cebadores 0,3 μ M; enzima Taq ADN polimerasa 1,5 U (Promega N° M8295); y 40 ng de ADN, en un volumen final de 50 μ L. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer modelo 2400, durante 30 ciclos y en cada uno se realizó una desnaturalización por 1 minuto a 94° C, hibridación de los cebadores 1 minuto a 55 °C, extensión 1 minuto a 72 °C y una extensión final a 72 °C por 1 minuto. Para la detección de las mutaciones pF508del y pG551D los productos PCR fueron digeridos con la enzima Mbo I a 37 °C, para las mutaciones pG542X y pN1303K se empleó la enzima Bst 0I a 60°C y para la mutación pR553X la enzima Hinc II a 37 °C. La incubación con las enzimas de restricción se llevó a cabo durante toda la noche. Los productos de digestión se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%, y las bandas de ADN se detectaron por tinción con sales de plata,²⁶ se analizaron los patrones electroforéticos obtenidos y se establecieron los genotipos de cada paciente. La mutación pG85E se analizó de acuerdo a lo descrito por Perone.¹⁷

Cuando se expresa el genotipo de los pacientes, el término OTRA es utilizado para hacer referencia a una mutación diferente a las seis que se estudian en este trabajo. Una vez conocidos los genotipos de los pacientes, se determinó la frecuencia de las mutaciones. En el caso de los portadores sanos, se realizó el conteo de las mutaciones conocidas y para las mutaciones no identificadas (OTRA), sólo se tomaron en cuenta a los padres de los casos índice, quienes presentaron la mutación OTRA.

Asesoramiento genético

En todos los casos atendidos se brindó asesoramiento genético en la Consulta de Genética de la Unidad Proyecto Aragua. Al confirmar la positividad de FQ se explicó al paciente y sus familiares, la historia natural de la enfermedad, la variabilidad clínica, la mutación presente, las complicaciones, se describe la condición de los padres, el riesgo de recurrencia en la pareja y como pudiera ser la descendencia en el paciente de acuerdo a las características de la posible pareja y se plantean las consecuencias de los tipos de emparejamiento posibles. El paciente y sus familiares

son referidos de acuerdo a su procedencia a la unidad de fibrosis quística, ubicada en el centro hospitalario más cercano a su domicilio, donde se le cumplirá el tratamiento médico para la eliminación de las secreciones pulmonares, control de las infecciones pulmonares, sustitución de las enzimas pancreáticas, y nutrición adecuada y se hace seguimiento de los casos, por parte del equipo multidisciplinario de salud que allí labora.

Determinación de los focos geográficos

Para la identificación de los focos geográficos de distribución de genes FQ, se parte de la base que esta enfermedad tiene un patrón de herencia autosómico recesivo, por lo tanto la variable epidemiológica referente al lugar de origen de los abuelos, es muy importante para establecer dichos focos geográficos. Para asignar la procedencia de un genotipo FQ a un área determinada, se procedió tomando en cuenta cualquiera de las alternativas siguientes en relación al origen de los abuelos: a) Todos los abuelos son nacidos en el mismo sitio, b) Dos abuelos de diferente rama parental proceden del mismo sitio, c) Los cuatro abuelos son nacidos en lugares diferentes, pero ubicados a distancias muy cercanas. Para la identificación de los mencionados focos, se consideró además, el criterio utilizado por Gerder y Arias,²⁷ quienes establecen que un foco geográfico es un área circunscrita por un círculo de 55 Km de diámetro, donde existen dos o más casos de la enfermedad, aunque también se tomó en cuenta aquellos lugares donde sólo había un caso, pero los cuatro abuelos fueron nacidos en el mismo sitio.

Una vez identificada la ubicación regional de los focos geográficos, se determinaron cuáles son los genotipos presentes en cada uno de ellos, luego se calculó la frecuencia de los alelos mutados y mediante la prueba de Ji-cuadrado y el test exacto de Fisher²⁸ se analizó la existencia de diferencias significativas en la distribución de las mutaciones, en las regiones donde se encuentra el mayor número de casos, concretamente la región Centro-Occidental y la Centro-Norte-Costera, y en las poblaciones de esta región que son centros de focos geográficos.

RESULTADOS

A partir de la revisión de las historias clínicas se encontró que 90 % de los pacientes son nacidos en poblaciones de la región Centro-Occidental, principalmente de los estados Carabobo y Aragua. De las seis mutaciones indagadas sólo se detectaron tres: pF508del, pG542X y pR553X, se definieron siete

genotipos, de los cuales 25% son completos (pF508del/pF508del, pF508del/pG542X y pF508del/pR553X), 41,67% son incompletos (pF508del/OTRA, pG542X/OTRA, pR553X/OTRA) y 33,33% son OTRA/OTRA (Tabla 1). La mutación más frecuente fue pF508del (39,16%) y las desconocidas identificadas como OTRA, están presentes en el mayor porcentaje (54,17%). Las mutaciones pG542X y pR553X presentaron frecuencias de 4,17% y 2,50% respectivamente (Tabla 2). En relación a los portadores sanos se encontró que de sesenta familiares, cincuenta y tres de ellos (88,3%) son portadores de una mutación, de las cuales la pF508del fue la más frecuente (64,15%); en la Tabla 3 se muestra la frecuencia de las mutaciones en el grupo de portadores sanos. En la Tabla 4 se presentan los valores promedio de cloruros (mEq/L) y la edad al momento del diagnóstico en función del genotipo. Se observa una relación inversa entre estos dos valores, la cual resalta más en el caso del genotipo pG542X/OTRA (2,92 años y 129,01 mEq/L) mientras que en el genotipo OTRA/OTRA el diagnóstico se hace más tardíamente (8,93 años) y el valor de la concentración de cloruros es el menor (79,8 mEq/L).

En relación a la procedencia geográfica de los abuelos por ambas ramas parentales, se logró conocer el lugar de nacimiento de los abuelos en cincuenta y cuatro pacientes, de los cuales sólo treinta y cuatro fueron informativos para establecer focos geográficos de distribución de genes FQ; dos de ellos pertenecen a poblaciones colombianas. Once casos índice tienen a todos los abuelos nacidos en un mismo lugar; tales casos proceden de las poblaciones siguientes: Canoabo (Estado Carabobo), Aroa (Estado Yaracuy), Quíbor y Humocaró Bajo (Estado Lara), Guasualito (Estado Apure). La Victoria, Las Peonías en La Colonia Tovar y Barbacoas (Estado Aragua), Maturín (Estado Monagas) y Caracas (Distrito capital). En dieciocho casos índice, se encontró que tres de los abuelos procedían de la misma localidad y sólo hubo tres casos donde los abuelos nacieron en localidades muy cercanas en distancias no mayores de 30 Km. Estos datos permitieron plantear la existencia de los focos geográficos de distribución de genes FQ, cuya ubicación por regiones se indica a continuación:

1) En la región Centro-Occidental se encontraron cinco focos geográficos cuyos centros están ubicados en: 1.1. Valencia, el cual incluye las poblaciones de Naguanagua, Guigue, y Tacarigua, 1.2. Canoabo (Estado Carabobo), 1.3. Aroa (Edo. Yaracuy), 1.4. Barquisimeto, donde se incluye a Quíbor (Estado Lara) y Yaritagua (Estado Yaracuy), 1.5. Carache integrado por Cuicas (Estado Trujillo) y Humocaró Bajo (Edo.

Lara).

2) Región Centro-Norte-Costera donde se identificaron tres focos geográficos con centro en: 2.1. San Mateo y alrededor de esta población se encuentran: Turmero, Maracay, Santa Cruz, El Consejo, La Victoria, Las Peonías, Colonia Tovar y Villa de Cura (Edo. Aragua), 2.2. Barbacoas (Estado Aragua) y 2.3. Caracas (Distrito Capital).

3) Región Central, con el foco de Calabozo (Estado Guárico).

4) Región Sur- Oeste, (Estado Apure) se presentan tres focos: 4.1. San Juan de Payara, 4.2. Achaguas y 4.3. Guasdalito.

5) Región Sur-Este, donde se encuentra el foco de San Félix (Estado Bolívar).

6) Región Oriental, allí se encuentran los focos geográficos con centro en: 6.1. Maturín Estado Monagas y 6.2. Tunapuy, con las poblaciones de Carúpano, Río Caribe y Yaguaraparo (Edo. Sucre).

En la tabla 5 se muestra la frecuencia de las mutaciones de acuerdo a los focos geográficos; la mutación pF508del se detectó en todas las regiones, con excepción de la Oriental, donde sólo se encontraron las mutaciones pG542X, pR553X y OTRA. La mayor parte de las mutaciones se concentró en las regiones Centro-Occidental y Centro-Norte-Costera, aunque la distribución es diferente, ya que en la primera predomina pF508del y en la segunda, la mutación más frecuente fue la denominada OTRA y además se evidenciaron todas las mutaciones detectadas en el estudio. Las diferencias observadas en ambas regiones en cuanto a las mutaciones pF508del y las no identificadas (OTRA) son estadísticamente significativas sólo cuando se compara el foco de Barquisimeto en la región Centro-Occidental con el foco de Caracas en la región Centro- Norte-Costera ($p=0,0014$).

En la figura 1 se observa la ubicación de los focos geográficos de distribución de genes FQ en el mapa de Venezuela.

DISCUSIÓN

Las diferencias observadas en el espectro de mutaciones causantes de FQ en distintas poblaciones está relacionada con la composición étnica; en algunas regiones de España la búsqueda de dos de las

mutaciones más frecuentes en el gen CFTR (pF508del y pG542X) permitió detectar entre el 69% y 78% de los alelos mutados, en Cataluña y Canarias respectivamente,²⁹ en contraste con los resultados de este trabajo, donde a pesar de haber detectado tres mutaciones: (pF508del, pG542X y R553X) esto sólo representa el 45,83% y el porcentaje mayor (54,17%) corresponde a OTRA/OTRA, término utilizado para indicar que son mutaciones diferentes a las seis investigadas; una situación similar fue reportada por Restrepo y col.,¹³ en una muestra de pacientes de Maracaibo, donde sólo aparecieron las mutaciones pF508del y pG542X, aunque utilizaron un estuche comercial, con capacidad para detectar 16 de las mutaciones más frecuentes en el mundo. Por otra parte, en muestras provenientes de varias regiones de Venezuela, analizadas en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, se detectó la mutación 3120+1G'A (19), pero 66,6% de las mutaciones está todavía por identificarse. En un trabajo realizado en una muestra de pacientes FQ de Ecuador, los autores utilizaron un estuche comercial para detección de 29 de las mutaciones más frecuentes y detectaron sólo seis de ellas, lo cual representó el 53,22% (9), valor cercano al obtenido en este trabajo; este tipo de resultado sugiere la presencia de mutaciones autóctonas y se pone de manifiesto la necesidad de identificarlas mediante secuenciación de ADN. En otros países latinoamericanos como México¹⁵ y Argentina⁵ se han identificado mutaciones propias de esas poblaciones.

La mutación más frecuente en este estudio fue pF508del, detectada en 39,16% de los alelos (Tabla 2), es un resultado muy similar al publicado por Torres y col.¹² en Valencia, ciudad ubicada en la región Centro-Occidental (41,6%), este valor es intermedio en relación a los reportados anteriormente para otras ciudades venezolanas, por ejemplo: 50% en Caracas¹¹ y en Maracaibo, ubicado hacia el occidente del país se encontraron frecuencias de 29,6%¹³ y 26,79%;¹⁴ este resultado encuentra explicación en las diferencias regionales debidas al proceso de mestizaje, situaciones muy comunes en países latinoamericanos, por ejemplo México¹⁵ y Ecuador.⁹ La mutación pG542X, tuvo una frecuencia de 4,17%, valor muy similar al reportado por Restrepo en la ciudad de Maracaibo;¹³ esta mutación ocupa el segundo lugar de frecuencia en España.³ La mutación pR553X, la segunda más frecuente en Alemania,³ fue detectada en un 2,54%; su presencia en esta muestra, puede explicarse por su distribución a partir de la Colonia Tovar, una Colonia de alemanes establecida desde 1843 en la región Centro Norte del país³⁰ aunque inicialmente constituyó un grupo muy endogámico, por

Tabla1
Frecuencia de los genotipos en los casos índice con FQ

Genotipos	Casos Índice (n)	Frecuencia Genotípica (%)
A) Completos		
pF508del/pF508del	13	21,66
pF508del/pG542X	1	1,67
pF508del/pR553X	1	1,67
		Subtotal 25,00
B) Incompletos		
pF508del/OTRA	19	31,67
pG542X/OTRA	4	6,67
pR553X/OTRA	2	3,33
		Subtotal 41,67
C) Desconocidos		
OTRA/OTRA	20	33,33
		Subtotal 33,33
Total	60	100

Tabla2
Frecuencia de los alelos mutados en los casos índice con FQ

Mutación	Número de Cromosomas	Frecuencia (%)
pF508del	47	39,16
pG542X	5	4,17
pR553X	3	2,50
OTRA	65	54,17
Total	120	100

su aislamiento geográfico y cultural, durante las últimas décadas se ha cruzado con población mestiza.

En este trabajo se identificaron siete genotipos, de los cuales sólo 25% corresponde a genotipos completos (Tabla 1). Al analizar los genotipos más frecuentes (pF508del/pF508del, pF508del/OTRA y OTRA/OTRA) (Tabla 4) en función de la concentración de cloruros y la edad del diagnóstico se pone de manifiesto la existencia de una relación inversamente proporcional entre ambas variables, siendo la edad menor en el genotipo pF508del/pF508del (3,26 años) y se va incrementando a medida que la mutación desconocida identificada como OTRA, entra a formar parte del genotipo, así se observa una edad de diagnóstico de 6,20 y 8,93 años para los genotipos pF508del/OTRA y OTRA/OTRA, respectivamente. El promedio menor de concentración de cloruros lo presenta el genotipo OTRA/OTRA (79,80 mEq/L), en relación a este aspecto se ha observado que pacientes venezolanos con mutaciones no identificadas, tienen concentraciones de cloruros ≥ 37 mEq/L,¹⁹ una explicación a esta situación puede ser el tipo de mutación presente en cada paciente, por ejemplo, pF508del pertenece a la clase I, es decir mutaciones donde la proteína se sintetiza, pero la delección ocurrida en la posición 508 trae como consecuencia problemas en el plegamiento y la proteína no alcanza el nivel de estructura terciaria, en consecuencia es reconocida por el sistema de la ubiquitina y digerida en el proteosoma, por lo tanto no se incorpora a la membrana.³¹ Las mutaciones identificadas como OTRA pudiesen ser de tipo IV, V, o VI, donde las proteínas sintetizadas, aunque son defectuosas se pueden integrar a la membrana y funcionar parcialmente.³²

El conocimiento del genotipo del paciente es importante para el paciente, sus familiares y el equipo de salud, se facilita el asesoramiento genético, ya que en el grupo familiar de un paciente con genotipo completo, se puede identificar inequívocamente a los portadores sanos. En la Tabla 3 se muestra la frecuencia de las mutaciones en el grupo de portadores sanos analizados, llama la atención que de sesenta familiares analizados, cincuenta y tres porten una mutación de FQ. A todo el grupo familiar le fue brindado asesoramiento genético y tomando como base las mutaciones presentes en los padres se analizó el riesgo de recurrencia en la pareja. Se discutieron las posibilidades de la descendencia de acuerdo a los cuatro tipos de emparejamiento siguientes: a) Portador sano con Homocigoto normal, existe la probabilidad que el 50% de la descendencia sea sana y 50% de portadores

sanos, b) Portador sano con Portadora sana, el riesgo de enfermedad es de 25%, c) Portador sano con Afectada, tendrán un riesgo de tener 50% Afectados y 50% no Afectados de FQ y d) Afectados con Afectadas todos los descendientes serán afectados, en el caso que la pareja pueda tener hijos, ya que la gran mayoría de los hombres con FQ son infértiles. La finalidad primordial del asesoramiento genético es ofrecer apoyo al paciente y su familia para hacerle frente a los efectos psicológicos generados por el padecimiento de una enfermedad sub letal.

El conocimiento del genotipo también es muy importante para el tratamiento de la enfermedad, más aún si se toma en cuenta que durante los últimos años, además de los esquemas tradicionales, hay desafíos en el diseño de nuevas opciones terapéuticas para FQ, las cuales están dirigidas en la mayor parte, a pacientes que presentan la mutación pF508del, como es el caso de las chaperonas farmacológicas.³³

Al analizar la frecuencia de mutaciones en los focos geográficos identificados en varias regiones del territorio venezolano (Tabla 5), se observa que la mutación pF508del predomina hacia el occidente venezolano; mientras que en el oriente no está presente, pero aparecen pG542X, pR553X y OTRA; por el contrario en la región Centro-Norte-Costera, se encuentran todas las mutaciones detectadas, aunque predominan las desconocidas, identificadas como OTRA (Tabla 5). Existen diferencias significativas ($p= 0,0014$) en la distribución de mutaciones entre el foco de Barquisimeto en la región Centro-Occidental y el foco de Caracas en la región Centro-Norte-Costera, este resultado puede explicarse porque en la ciudad de Caracas y su área metropolitana reside una población con mayor diversidad étnica, en relación a Barquisimeto.

Al comparar los focos de distribución geográfica de genes FQ identificados en este trabajo, con otros reportados por Rolo²¹ y Torres,¹² se ponen de manifiesto los hechos siguientes:

- 1) Existe coincidencia en cuanto a los focos de Valencia, Tacarigua (estado Carabobo), Aroa (estado Yaracuy) y Villa de Cura (estado Aragua).
- 2) Algunos de los focos identificados previamente se ubican dentro del área geográfica de focos descritos en este trabajo, como son los casos de: Cabudare en el foco de Barquisimeto (estado Lara), El Hatillo y Los Teques (estado Miranda) en él de Caracas, El Sombrero (estado Guárico) en él de Barbacoas, Atamaica en el de San Juan de Payara (estado Apure).

Tabla 3
Frecuencia de las mutaciones en los portadores sanos

Mutación	Portadores Sanos (n)	Frecuencia (%)
pF508del	34	64,15
pG542X	04	7,54
pR553X	01	1,89
OTRA	14	26,42
Total	53	100

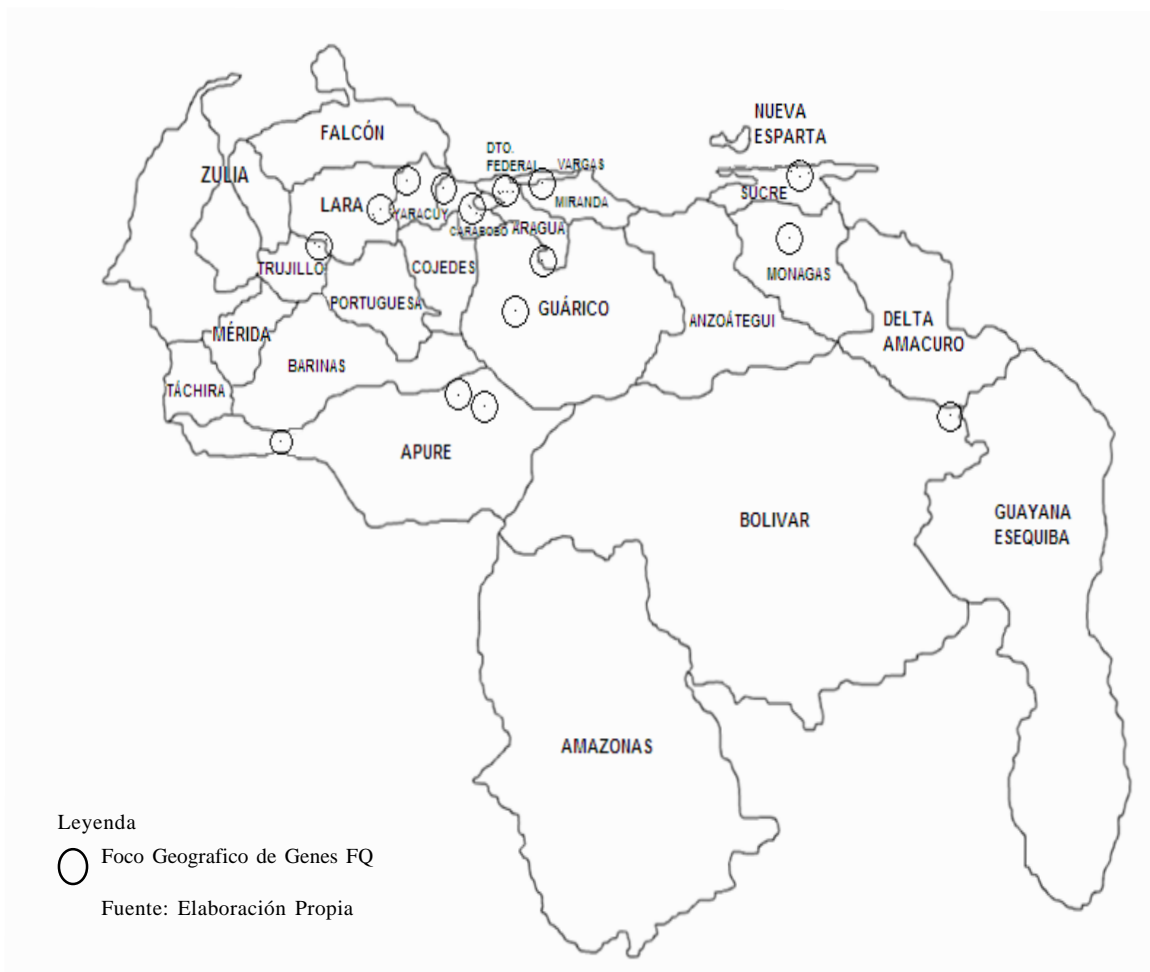
Tabla 4
Valores promedio de cloruros y edad del diagnóstico de acuerdo al genotipo

Genotipo	Edad del Diagnóstico (años)	Cloruros (mEq/L)
pF508del/F508del	3,26	108,29
pF508del/pG542X	1,08	115,90
pF508del/pR553X	1,25	101,60
pF508del/OTRA	6,20	95,23
pG542X/OTRA	2,92	129,01
pR553X/OTRA	4,12	119,70
OTRA/OTRA	8,93	79,80

Tabla 4
Frecuencia de las mutaciones en los focos geográficos de FQ

Región/Centro de los Focos geográficos	Cromosomas (n)	<u>Mutaciones</u>			
		pF508del (n)	pG542X (n)	pR553X (n)	OTRA (n)
1. Centro-Occidental					
1.1.Valencia	10	3			7
1.2.Canoabo	4	3			1
1.3.Aroa	2	2			
1.4.Barquisimeto	8	7			1
1.5. Carache	2	2			
Sub-Total	26	17			09
2. Centro-Norte-Costera					
2.1. San Mateo	10	6	1		3
2.2.Barbacoas	2	1			1
2.3.Caracas	10		1	1	8
Sub-Total	22	7	2	1	12
3. Central					
3.1Calabozo	2	1			1
Sub-Total	2	1			1
4. Sur-Oeste					
4.1.San Juan de Payara	2	1			1
4.2.Achaguas	2	1			1
4.3.Guasdualito	2	1			1
Sub-Total	6	3			3
5. Sur-Este					
5.1.San Félix	2	2			
Sub-Total	2	2			
6. Oriental					
6.1. Maturín	2			1	1
6.2. Tunapuy	4		1		3
Sub-Total	6		1	1	4
Total	64	30	3	2	29

Figura 1
Ubicación de los focos geográficos de distribución de genes FQ, Venezuela 2011



3) Hay varias poblaciones, que si bien no forman parte de los focos identificados en este trabajo, se encuentran ubicadas a distancias entre 60 y 70 Km, por ejemplo: Boconó cercano a Carache en el estado Trujillo, Duaca aproximadamente a 60 Km de Barquisimeto (estado Lara), Yagual y Guáchara en forma contigua al foco de Achaguas en el estado Apure.

La identificación de focos de distribución de genes FQ en regiones diversas de la geografía venezolana, aporta información muy importante para el Programa Nacional de FQ, del Ministerio del Poder Popular para la Salud, ya que constituye una orientación a las autoridades nacionales y regionales, sobre algunas localidades donde existe la posibilidad de incrementar los casos de FQ, y aunque debe prestarse atención a todas las poblaciones, es recomendable hacer mayor énfasis en las regiones que presentan estos focos y donde aún no se dispone de Unidades de Atención para FQ.

El diagnóstico integral de los pacientes con impresión clínica de FQ, tal como se evidencia en este estudio, permite comprender mejor la situación clínica, el pronóstico del paciente, realizar una aproximación de la correlación del genotipo-fenotipo, definir el tratamiento oportuno y un seguimiento más preciso, con el fin de aminorar las recaídas que conllevan siempre a la hospitalización, el ausentismo escolar del paciente y laboral de los padres, en detrimento de la calidad de vida de los pacientes y sus familias; así como también puede contribuir a establecer políticas de salud más dirigidas al conocimiento y el manejo de esta enfermedad, en el personal de salud en los diferentes niveles de atención; todo enmarcado en la realidad del proceso

salud-enfermedad de quienes sufren esta patología genética.

AGRADECIMIENTO

Manifestamos nuestro agradecimiento a los pacientes y los grupos familiares participantes en el estudio. Agradecemos la colaboración eficiente, constante y oportuna del personal de la Unidad Proyecto Aragua, que participó en el desarrollo de las actividades siguientes: la toma de muestras y datos de los pacientes, determinación de electrolitos y preparación de la base de datos: Sra. Miriam Hernández, TSU Yaniret Bravo, Sr. Richard Clarck, Lcda. Sol Sánchez, Lcdo. Boris Araujo, Prof. Daniel Vivas e Ing. Indira Brito. Agradecemos a MSc. Narviz Pulido y la Lcda. Teresa Oropeza por la colaboración valiosa durante el trabajo desarrollado para la detección de mutaciones. Nuestro agradecimiento al Dr. Carlos Espino del Instituto BIOMED, por algunas sugerencias importantes y a la Dra. Leyla Zambrano de la Universidad Central de Venezuela, por facilitarnos algunas referencias bibliográficas.

Este proyecto recibió financiamiento de la empresa INELEC a través de aportes por la Ley Orgánica de Ciencia, Tecnología e Innovación (LOCTI) y se utilizaron equipos financiados por los proyectos Misión Ciencia N° 2008000911-1; BID-Conicit BTS-067 y el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Cystic Fibrosis Foundation. Patient Registry Report. Disponible en: <http://www.cff.org/LivingwithCF/CareCenterNetwork/PatientRegistry>. Acceso 27 de Mayo de 2012.
- 2) Nussbaum RL, McInnes RR, Williard HF. Thompson & Thompson Genética en Medicina. 5.a.ed. Barcelona Elsevier Masson 2007. Pp. 232-35.
- 3) Cystic Fibrosis Mutation Database. Disponible en: <http://www.genet.sickkids.on.ca.app> Acceso 01 de Junio de 2012.
- 4) Luna MC, Granados PA, Olek K, Pivetta OH. Cystic fibrosis in Argentina: the frequency of the Δ F508 mutation. *Hum Genet.* 1996;97:314.
- 5) Visich A, Zielenski J, Castañón C, Diez G, Grenoville M, Segal E, et al. Complete screening of the CFTR gene in Argentina cystic fibrosis patients. *Clin. Genet.* 2002; 61:207-13.
- 6) Repetto G, Poggi H, Harris P, Navarro H, Sánchez I, Guiraldes E, et al. Identificación de mutaciones en el gen CFTR en pacientes chilenos con Fibrosis Quística. *Rev. Med. Chil.* 2001;129:841-47.
- 7) Luzardo G, Aznarez I, Crispino B, Mimbacas A, Martínez L, Poggio R, et al. Cystic fibrosis in Uruguay. *Genet. Mol. Res.* 2002;1:32-8.
- 8) Keyeux G, Rodas C, Bienvenu T, Garavito P, Vidaud D, Sánchez D et al. CFTR mutations in patients from Colombia: Implications for local and regional molecular diagnosis programs. *Hum Mutat.* 2003;22(3):259. Disponible en: onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/humu. Acceso 20 mayo 2012.
- 9) Valle EP, Burgos RI, Valle JR, Béjar DE, Ruiz-Cabezas JC. Analysis of CFTR gene mutations and Cystic Fibrosis incidence in the Ecuadorian population. *Invest Clin.* 2007;48(1):91-8.
- 10) Venegas P, Novak J, Oscar C, Sánchez F, Gutiérrez I, Rivera J et al. Cystic fibrosis mutations in Costa Rica. *Hum. Biol.* 2003;75(2):179-88.
- 11) Alvarado J, Acosta L, Carrasquel B, Lugo Z. Fibrosis quística: Estudio de 41 pacientes. Hospital de Niños J.M. de los Ríos. *Acta Otorrinolaringológica.* 2000;12(1):14-18
- 12) Torres E, Martínez J, Rolo M, Baeta M, Sánchez S, Meza J, et al. Indagación de la mutación Δ F508 en pacientes con Fibrosis Quística, atendidos en el Servicio de Neumonología Pediátrica de la Ciudad Hospitalaria "Dr. Enrique Tejera". *Salus.* 2004;8(3):10-16.
- 13) Restrepo CM, Pineda L., Rojas-Martínez A., Gutiérrez CA, Morales A. CFTR mutations in three Latin American countries. *Am J Med Genet.* 2000;9:277-9.
- 14) Morales-Machin A, Borjas-Fajardo L, Pineda L, González S, Delgado W, Zabala W, Fernández E. Frequency of delta F508 mutation in Venezuelan patients with Cystic Fibrosis. *Invest Clin.* 2004;45(2):121-30.
- 15) Orozco L, Velásquez R, Zielenski J, Tsui L-C, Chávez M, Lezana J, et al. Spectrum of CFTR mutations in Mexican cystic fibrosis patients: Identification of five novel mutations (W1098C, 846delT, P750L, 4160insGGGG and 297-1G'A. *Hum. Genet.* 2000;106:360-65.
- 16) Fauz FR, Souza DA, Olandoski M, Raskin S. CFTR allelic heterogeneity in Brazil: historical and geographical perspectives and implications for screening and counseling for cystic fibrosis in this country. *J. Hum. Genet.* 2010;55(2):71-6.
- 17) Perone C, Medeiros GS, del Castillo DM, de Aguiar MJB, Januário JN. Frequency of 8 CFTR gene mutations in cystic fibrosis patients in Minas Gerais, Brazil, diagnosed by neonatal screening. *Braz J. Med. Biol. Res.* 2010;43(2):134-38.
- 18) Oller de Ramírez AM, Ghio A, Melano de Botelli M, Dodelson de Kremer R. Fibrosis quística: diagnóstico molecular en 93 pacientes argentinos y detección familiar de portadores. Impacto asistencial y proyección a nuevos avances terapéuticos. *Arch. Argent. Pediatr.* 2008;106(4):310-19.
- 19) De la Cruz H. Identificación de mutaciones en el exón 20 y el intrón 1 del gen CFTR de Fibrosis Quística, por medio de heteroduplices. Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela. octubre de 2005.
- 20) Osorio L, Gamboa A, Cortez J, Moreno N, Baeta MF, Martínez JA, et al. Fenotipo-Genotipo de pacientes con Fibrosis Quística. Unidad Proyecto Aragua 1997-2007. *Comunidad y Salud.* 2008;6(2):1-12.
- 21) Rolo M. Experiencia diagnóstica con electrolitos del sudor en homocigotos y heterocigotos de Fibrosis Quística, frecuencia y distribución de la enfermedad. En: *Avances en Genética.* ISBN:980-303-202X. editores: León de Pérez M, Layrisse A y Hammond F. 1994. Pp.109-113.
- 22) Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics.* 1959;23(3):545-9
- 23) Sugai E, Srur G, Vazquez H, Benito F, Mauriño E, Boerr LA et al. Steatocrit: a reliable semiquantitative method for detection of steatorrhea. *J Clin Gastroenterol.* 1994;19(3):206-9.
- 24) Miller SS, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic. Acids. Res.* 1988;16(3):1215.
- 25) Friedman KJ, Highsmith WE, Prior TW, Perry TR, Silverman LM. Cystic fibrosis deletion by PCR-mediated site-directed mutagenesis. *Clin Chem.* 1990;36:695-96.

- 26) Santos FR, Pena SDJ, Epplen JT. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. Hum Genet. 1992;90:655-6.
- 27) Gerder M, Arias S. Los focos geográficos de retinoblastoma en Venezuela. En: Avances en Genética. ISBN:980-07-1035-3. editores: Falcón de Vargas A, Rodríguez Lemoine V, Arenas O. 1992. Pp.434.
- 28) Epi InfoTM (Computer program) Versión 3.4.3 2007. Disponible en: [http:// www. cdc.gov/epiinfo/html/downlands.htm](http://www.cdc.gov/epiinfo/html/downlands.htm).
- 29) Casals T, Nunes V, Palacio A, Giménez J, Gaona A, Ibáñez N et al. Cystic Fibrosis in Spain: high frequency of mutation G542X in the Mediterranean coastal area. Hum. Genet. 1993; 91:66-70.
- 30) Página oficial de la Colonia Tovar. Disponible en: <http://www.coloniatovar.net> Acceso 28 de Mayo de 2012.
- 31) Ellgaard, L., and Helenius A. Quality control in the endoplasmic reticulum. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2003;4:181-91.
- 32) Mishra A, Greaves R, Massie J. The relevance of sweat testing for the diagnosis of Cystic Fibrosis in the genomic era. Clin Biochem Rev. 2005;26:135-53.
- 33) Mendre CH, Mouillac B. Chaperons pharmacologiques Un espoir thérapeutique pour les pathologies conformationnelles. Medecine/Science. 2010;26:627-35.

Recibido: Septiembre, 2012
Aprobado: Octubre, 2012