



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
SECCIÓN DE POSGRADO

**EPIDEMIOLOGÍA DE LA MUTACIÓN $\Delta F508$ DEL GEN
CFTR EN NIÑOS CON FIBROSIS QUÍSTICA EN LIMA,
PERÚ**

PRESENTADA POR
ROBERTO CARLOS SOMOCURCIO SOMOCURCIO

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN PEDIATRÍA

LIMA – PERÚ

2015



**Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada
CC BY-NC-ND**

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede cambiar de ninguna manera ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



USMP
UNIVERSIDAD DE
SAN MARTÍN DE PORRES

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

SECCIÓN DE POSGRADO

**EPIDEMIOLOGÍA DE LA MUTACIÓN Δ F508 DEL GEN
CFTR EN NIÑOS CON FIBROSIS QUÍSTICA EN LIMA,
PERÚ**

**TESIS
PARA OPTAR AL TÍTULO DE MÉDICO ESPECIALISTA EN
PEDIATRÍA**

PRESENTADO POR:

ROBERTO CARLOS SOMOCURCIO SOMOCURCIO

LIMA, PERÚ

2015



**EPIDEMIOLOGÍA DE LA MUTACIÓN Δ F508 DEL GEN *CFTR* EN
NIÑOS CON FIBROSIS QUÍSTICA EN LIMA, PERÚ**

ASESOR Y MIEMBROS DEL JURADO

ASESOR:

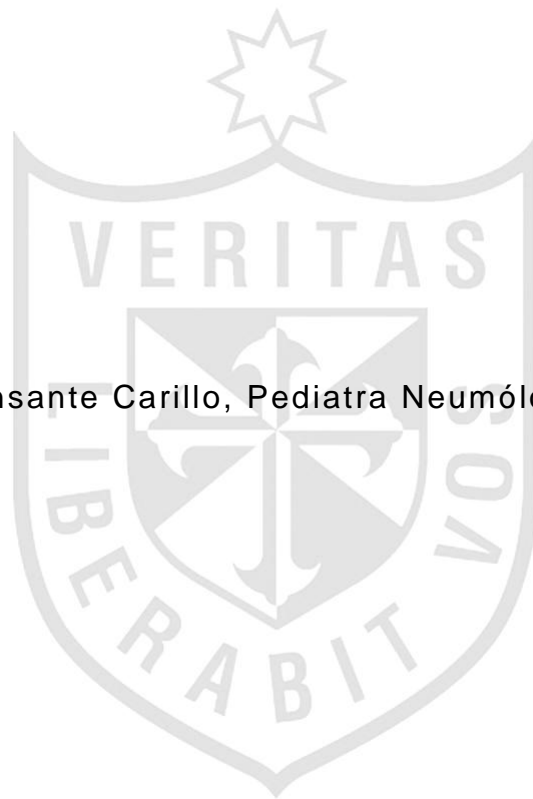
Dra. Lucrecia Monsante Carillo, Pediatra Neumóloga.

JURADO:

Dr. Javier García Siabala. (Presidente)

Dr. Benny Kogan Cogan. (Miembro)

Dr. Víctor Luque Miranda. (Miembro)





DEDICATORIA

A los niños que padecen fibrosis quística, porque en un futuro no tan lejano la ciencia les de la opción de curarse.

A mi madre, mi esposa y mis hijos, motivación constante de superación.

AGRADECIMIENTO

A la Dra. Lucrecia Monsante por su paciencia y empuje en la
realización de éste trabajo.



ÍNDICE

	Pág.
Resumen	
Abstract	
Introducción	01
I. Marco teórico	03
II. Metodología	13
III. Resultados	15
IV. Discusión, conclusiones y recomendaciones	19
V. Bibliografía	26
Anexos	31



RESUMEN

Objetivo: determinar la epidemiología de la mutación $\Delta F508$ del gen CFTR, en niños con fibrosis quística atendidos en el Hospital Edgardo Rebagliati Martins, durante el 2012.

Material y métodos: el estudio fue de tipo observacional, descriptivo, prospectivo y transversal. La muestra estuvo constituida por 23 niños pertenecientes al programa de Fibrosis Quística del Hospital Edgardo Rebagliati Martins, atendidos en el período que correspondió al estudio. Se usó una ficha de datos, validada por los médicos asistentes del programa de fibrosis quística. Para el análisis de datos se utilizó el programa Excel 12 para Mac.

Resultados: la mayoría de los pacientes estudiados se encontraban entre los 6 y 10 años (47.8%). El 73.9% de los pacientes fueron del sexo masculino, mientras que 26.1% fueron mujeres. Un 78.3% provenían de Lima, y 21.7% de provincias. La edad media global de la población estudiada fue de 6.6 ± 3.5 años. Todos los pacientes tuvieron test de cloro en sudor positivo, al igual que patología respiratoria; mientras que 43.5% de los pacientes presentó insuficiencia pancreática. La presencia de mutación heterocigota positiva se manifestó en 26.1% de los pacientes; de los restantes, 13% tuvo mutación homocigota positiva, y no se encontró ésta mutación en el 60.9%.

Conclusiones: la frecuencia de la mutación $\Delta F508$ del gen CFTR en niños con fibrosis quística fue del 39.1% (26.1% heterocigotos, 13%

homocigotos). La mayoría de los pacientes fueron del sexo masculino, entre 6 a 10 años y provenientes de Lima. Se usó con éxito por primera vez rt-PCR, para diagnosticar ésta mutación en nuestro país. Existen diferencias de la frecuencia de la mutación con algunos países de Latinoamérica.



ABSTRACT

Objective: to determine the epidemiology of the $\Delta F508$ mutation of the CFTR gene in children with cystic fibrosis treated at the Hospital Edgardo Rebagliati Martins, in 2012.

Methods: the study was observational, descriptive, prospective and transversal. The sample consisted of 23 children in the Cystic Fibrosis program of the Edgardo Rebagliati Martins Hospital, who were seen in the period covered by the study. A data sheet, validated by medical assistants program cystic fibrosis was used. For data analysis Excel 12 for Mac, was used.

Results: most of the patients were between 6 to 10 years (47.8%). 73.9% of patients were male, while 26.1% were female. 78.3% were born in Lima, and 21.7% in provinces. The overall mean age of the study population was 6.6 +/- 3.5 years old. All patients had positive chloride sweat test, like respiratory disease; while 43.5% of patients had pancreatic insufficiency. The presence of heterozygous mutation showed positive in 26.1% of patients; of the remainder, 13% had positive homozygous mutation, and this mutation was not found in 60.9% of the population studied.

Conclusions: the frequency of the $\Delta F508$ mutation of the CFTR gene in children with CF was 39.1% (26.1% heterozygous, 13% homozygous). Most patients were male, between 6 to 10 years and from Lima. It was successfully used for the first time rt-PCR to diagnose this mutation in our country. There are differences in the frequency of the mutation with some latin american countries.

INTRODUCCIÓN

La fibrosis quística (FQ) es una de las enfermedades autosómicas recesivas más comunes. Se presenta en uno de cada 2.000 - 2.500 nacidos vivos y tiene una frecuencia de portadores de uno cada 20 -25 nacidos vivos. Se caracteriza clínicamente por la obstrucción de los conductos secretorios en el pulmón, páncreas y tracto genital, principalmente; debido a que el tejido epitelial de los órganos afectados se resiente por su incapacidad de transportar eficientemente el cloruro a través de la membrana celular. El gen relacionado con la enfermedad reside en el cromosoma 7 q31-32 y codifica para una proteína llamada proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la FQ (CFTR). Mutaciones en el gen CFTR resultan en la ausencia de la proteína funcionalmente activa. La más común de todas, es la denominada $\Delta F508$, presente en un 58% de los casos y se origina por una delección de 3 pares de bases (CTT) en el exón 10, que resulta en la pérdida de un aminoácido (fenilalanina) en la posición 508 de la proteína.

Dado el alto porcentaje de mutaciones que cubre la $\Delta F508$, es de gran importancia detectar esta alteración como apoyo al diagnóstico clínico y también como única vía de detección de portadores.

Ésta detección permite la planificación familiar y el consejo genético cada vez más desarrollado y pertinente.

Usamos la técnica molecular denominada reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (rt-PCR), ésta técnica es nueva, rápida y la más avanzada en detección de mutaciones y será la primera vez en nuestro país, que servirá para tales fines.

En la población pediátrica del Perú el estado actual de ésta mutación, se encuentra parcial o subóptimamente estudiada, razón por la cual consideramos de importancia la realización del presente trabajo de investigación, que encontró la frecuencia de la mutación $\Delta F508$ en los pacientes pertenecientes al programa de Fibrosis Quística del Hospital Edgardo Rebagliati Martins EsSalud, con edades entre 0 y 15 años, atendidos durante el 2012 y describimos algunas características clínico epidemiológicas, de ésta población.

I. MARCO TEÓRICO

Hace más de tres décadas se publicó en la revista Science el hallazgo del gen CFTR, responsable de la fibrosis quística (FQ); localizado en el brazo largo del cromosoma 7 ^[1], con 180,000 pares de bases y 1480 aminoácidos, esta proteína puede sufrir mutaciones por cinco mecanismos, truncamiento temprano o clase I, designado con la letra "X" (p.ej. G542X), bloqueo en el procesamiento o clase II (p.ej. ΔF508), bloqueo en la regulación o clase III (p.ej. G551D), conductancia alterada o clase IV (p.ej. A455E), que explica las formas más leves de la enfermedad y síntesis reducida o clase V. Recientemente se ha descrito una nueva forma de mutación clase VI, que involucra fallas en la estabilidad de la proteína; aunque permanece aún en controversia. Hasta la fecha, al menos 1600 diferentes mutaciones en el gen han sido identificadas ^[2].

El error puntual en la FQ es la falla en un canal de Cloro, mediado por AMP cíclico, llamado regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR)^[1], el cual a su vez, es regulado por una proteína kinasa A, la cual es fosforilable, que la hace vulnerable también a ser modificada y alterada por eventos epigenéticos.

Las funciones del regulador CFRT ^[3,4], no sólo alcanzan al cloro, sino también al sodio y al calcio, ya que puede formar parte de complejos moleculares en la membrana celular ^[1,3].

Estudios en animales de laboratorio hacen concluir que la proteína CFTR, está involucrada en la respuesta inflamatoria, procesamiento madurativo y señalización celular ^[1-4]; lo que ocasiona el funcionamiento anormal del transporte de iones cloruro en la superficie apical de las células epiteliales de las glándulas exocrinas de los tejidos, haciendo que las secreciones sean anormalmente viscosas. Hace poco tiempo sabemos que CFTR puede regular la permeabilidad del cloro por otros medios, es decir funciona más que como un simple canal de cloro. ^[1,3]

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad multisistémica crónica que se caracteriza por infecciones bronquiales recurrentes, asociada a enfermedad pulmonar obstructiva progresiva e insuficiencia pancreática con malabsorción intestinal, con patrón genético autosómico recesivo ^[5].

La mitad de los individuos afectados son homocigotos para la mutación $\Delta F508$ y tienen ancestros en regiones del norte de Europa^[6].

Como sabemos, el genotipo no siempre predice el fenotipo, lo que sugiere cambios epigenéticos; ya sean por influencia de componentes ambientales o modificación post-transcripcional de la proteína CFTR.

Existen más de mil otras mutaciones diferentes a la $\Delta F508$, muchas de ellas son propias de raza y otras nuevas, producto a los eventos migratorios o las conquistas de nuevos continentes, donde se arrastraron genes europeos, para interrelacionarse con

los de las regiones conquistadas; como así lo demuestran estudios en Chile, Costa Rica, Ecuador y Argentina ^[7-10]. Las conclusiones de la mayoría de éstos trabajos son que la mutación $\Delta F508$ es menos frecuente en nuestro continente, comparando con países de mayor prevalencia; además, se encontró que la raza amerindia tiene mayor prevalencia de otras mutaciones, algunas incluso consideradas propias, como las mutaciones *G85E*, *W128X*, *N1303K* y *G542X*, ésta última originaria de España^[11], y que al parecer fue implantada con el mestizaje colonial.

En el Perú, con estudios en pocos individuos y utilizando PCR convencional se estimó la presencia de la mutación $\Delta F508$ con cifras cercanas al 40%^[12,13]. Sin embargo la nueva biotecnología permite confirmar éstos hallazgos con procesos más certeros y eficaces.

En éste escenario, el PCR en tiempo real (rt-PCR), al eliminar cualquier proceso post-PCR monitorizando la progresión de la amplificación en el momento en que ocurre, es la técnica ideal para éste tipo de estudios genéticos. A diferencia de la PCR convencional, que mide la acumulación de ADN al final de un número predeterminado de ciclos, con rt-PCR éste proceso se hace durante todo el tiempo de amplificación, usando fluorescencia, de tal forma que el aumento es proporcional a la cantidad de ADN formada. En resumen, ésta técnica es actualmente, el método más sensible y específico para encontrar

las mutaciones de genes.^[4,14] Epidemiológicamente, en los Estados Unidos de Norteamérica, se estima que 1 de 29 blancos es portador de alguna mutación; mientras que indoamericanos 1 de 90, gruesa diferencia. La enfermedad tiene una incidencia relativa de 1 en 3,300 blancos-caucásicos, 1 en 9,500 hispanos y 1 en 15,300 afroamericanos; siendo bastante rara en asiáticos y africanos nativos (<1 por cada 15,000 nacimientos). Globalmente la incidencia es muy variable, de 1 por cada 377 nacidos vivos en algunas partes de Inglaterra, a 1 por 90,000 nacidos vivos en Asia y Hawai.^[14]

La supervivencia media de edad varía de un país a otro y es más alta en los Estados Unidos y Canadá, 28 y 32 años respectivamente. El promedio de supervivencia en América Latina es de 6 años, siendo la principal causa de muerte la insuficiencia respiratoria en general y cor-pulmonale. Las opciones de tratamiento están cambiando estas cifras, y una persona con fibrosis quística nacida en los Estados Unidos, se espera que sobreviva durante más de 40 años.

No hay predilección por sexo, aunque por razones que no están claras, el sexo masculino puede estar asociado con una tasa más lenta de disminución de la función pulmonar^[5,6].

La edad media al diagnóstico es 6-8 meses; en los países primer mundistas, al nacer se diagnostica en 70% de los pacientes; el resto pasa subdiagnosticado. Por ésta razón los programas de diagnóstico precoz están cada vez más en boga. En los países de

América Latina, recientemente se está incluyendo el tripsinógeno inmunoreactivo en los esquemas de tamizaje neonatal; mientras que otros aún lo vienen normando, como es nuestro caso.

Clínicamente, los pacientes desarrollan enfermedad pulmonar crónica e insuficiencia pancreática exocrina; pero también pueden desarrollar poliposis nasal, pansinusitis, prolapso rectal, diarrea crónica, pancreatitis, colelitiasis, cirrosis y disfunción hepática [3,5]. Dolor abdominal recurrente y/o efecto de masa en cuadrante inferior derecho, edema, ictericia neonatal prolongada, deficiencias de vitaminas (A, D, E, K), íleo meconial, ausencia congénita bilateral de los conductos deferentes e infertilidad masculina y femenina [5,15].

El mecanismo exacto por el cual se produce la inoperancia del CFRT y como ésta causa la enfermedad, no es conocido aún en su totalidad. Los iones cloruro no pueden ser excretados, lo que genera que el sodio sea absorbido en exceso, y el agua, por mecanismo acoplado, lo siga pasivamente, luego se reseca la superficie de la mucosa y altera la viscosidad del moco normal, denominada la hipótesis del bajo volumen [16].

La inflamación pulmonar es otra de las principales causas de la disminución de la función respiratoria en pacientes con fibrosis quística y puede preceder a la aparición de la infección crónica. Niveles elevados de interleukina-8, interleukina-6, factor de necrosis tumoral alfa y leucotrieno B4 [17]; junto con la reducción de los niveles de antiinflamatorios endógenos, pintan el perfecto

escenario pro-inflamatorio. Se han encontrado citokinas y proteasas en las vías respiratorias de los pacientes con fibrosis quística^[18]. Incluso receptores Toll-like (Los receptores tipo Toll o Toll-like receptor TLRs, constituyen una familia de proteínas que forman parte del sistema inmunitario innato), que reconocen una variedad de mediadores inflamatorios incluyendo la elastasa de neutrófilos, lipopolisacárido bacteriano, y otros productos microbianos; contribuyen en los efectos inflamatorios, en parte por activar el factor de transcripción nuclear NF- κ B, que regula una vía molecular que induce la producción de proteínas y citoquinas inflamatorias.^[19,20] Existen anomalías adicionales aunadas a la mayor expresión de mediadores de inflamación en éstos pacientes; éstas son la disfunción mucociliar y el aumento de la colonización por *Pseudomona aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Staphilococcus aureus* y *Haemophilus influenzae* y que mediante biofilms y producción de derivados de manosa y alfa₁-antitripsina influyen en la progresión de la enfermedad pulmonar [21,22].

El diagnóstico se basa en Criterios Internacionales: ^[23]

- Uno o más rasgos fenotípicos característicos (Enfermedad crónica sinopulmonar con colonización o infección persistente de las vías aéreas, alteraciones gastrointestinales y nutricionales, incluyendo íleo meconial, insuficiencia pancreática, cirrosis biliar focal y fracaso del desarrollo, síndrome de pérdida de sal y azoospermia

obstructiva) Historia de fibrosis quística en hermano o primo hermano, o

- despistaje neonatal positivo, con evidencia de disfunción del CFTR demostrada por:
- concentración de cloro en sudor elevada en dos o más ocasiones. (es decir concentración de Cloro >60 mEq/L).
- Identificación de 2 mutaciones causantes de la enfermedad.
- Diferencia de potencial nasal anormal.

El manejo es multidisciplinario y es en equipo y se basa en una terapia preactiva que permita una adecuada función pulmonar, previniendo las infecciones pulmonares y brindando la posibilidad de alcanzar el desarrollo normal, o lo más cercano a ello, con óptimo apoyo nutricional^[23].

Es muy importante conocer en cada país las mutaciones prevalentes con la finalidad de orientar al médico qué tipo de mutaciones solicita analizar o crear un pool de tamizaje nacional, mantenernos en una posición expectante y preparados ante la posible llegada de la terapia génica, donde ya se han dado pasos importantes creando by pass genéticos o la remoción del gen defectuoso y la inserción del correcto, ofrecer las ventajas de un programa de FQ a los niños que permanecen en el umbral diagnóstico y pronosticar el curso de la enfermedad.^[24]

El fenotipo incluye complicaciones frecuentes como el íleo meconial, presente en cerca del 10-20% de los recién nacidos con FQ; el síndrome de obstrucción intestinal distal, pancreatitis,

enfermedad hepática asociada, diabetes y poliposis nasal, entre otras. En 2-5% de los casos se presenta obstrucción hepatobiliar, ello conduce a cirrosis hepática^[25,26]. Como la sintomatología respiratoria representa la causa principal de morbilidad y mortalidad en pacientes con FQ, el mayor abordaje terapéutico apunta a sus manifestaciones^[26].

Si no se trata, la tasa mediana de supervivencia es de 3 a 5 años. No hay un tratamiento completamente efectivo para la FQ, sin embargo la posibilidad de un diagnóstico más temprano y la posibilidad de tratamiento sintomático ha hecho posible aumentar la supervivencia media a entre 25 y 30 años. El tratamiento sintomático va desde la terapia antibiótica a la nebulización con broncodilatadores o mucolíticos y administración de proteasas que inhiben los síntomas pulmonares hasta la administración de enzimas pancreáticas sustitutivas y vitaminas para la insuficiencia pancreática. La alfa dornasa inhalada destruye los enlaces de DNA de las secreciones, reduciendo las infecciones y mejorando el volumen espiratorio forzado al segundo (VEF1), siendo una droga bien tolerada y con mínimos efectos adversos.^[27]

Los corticoesteroides inhalados han demostrado mejorar la función ventilatoria y los índices espirométricos, sin embargo su uso es limitado debido a sus efectos adversos probables como aumentar el riesgo de infecciones, y la persistencia de *Pseudomona aeruginosa* y algunos gérmenes oportunistas^[28].

El uso de ibuprofeno, modificadores de leucotrienos y beta agonistas inhalados también ha demostrado cierto efecto benéfico, y un muy importante impacto en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos [29].

En las exacerbaciones e infecciones por *P. aeruginosa*, *B. cepacea*, *H. influenzae* y *S. aureus*, el uso de antibióticos parenterales siguen siendo de elección. Para disminuir la persistencia de alguna de éstas se usan la tobramicina inhalada, macrólidos y fluoroquinolonas vía oral [23,28].

Las enzimas pancreáticas son de uso rutinario, la asesoría nutricional, la fisioterapia respiratoria, el apoyo de servicio social y psicología; junto a un equipo multidisciplinario de especialistas médicos son de vital importancia y muy necesario en el manejo de éstos pacientes. [25]

La terapia génica, se presenta como la opción mas moderna; pero se ha encontrado con muchos obstáculos. En la actualidad se están estudiando otras estrategias prometedoras que tienen como objetivo la compensación del defecto en la producción y/o función de la proteína CFRT en función del tipo de mutación [30].

La nueva era de la medicina nos coloca en un terreno propicio para encontrar nuevos blancos terapéuticos gracias al descubrimiento de nuevas vías celulares, el progreso y las investigaciones en FQ, continúan ayudándonos a entender la función del CFTR y sus diversas funciones [31].

Ramsey y colaboradores encontraron recientemente que usando

el uso de potenciadores de CFTR (en éste caso Ivacaftor), mejoró la función pulmonar en pacientes mayores de 12 años con la mutación G551D^[30].

Las modificaciones de RNA también demuestran en los últimos años interesantes perspectivas en el remodelamiento genético en fibrosis quística.

Los avances clínicos dirigidos a la corrección del CFTR nos proyectan un futuro promisorio y optimista para los pacientes que padecen ésta enfermedad y para sus familias.^[32]



II. METODOLOGÍA

El diseño del estudio fue descriptivo y prospectivo, en 23 niños con diagnóstico de fibrosis quística pertenecientes al programa de Fibrosis Quística del Hospital Edgardo Rebagliati Martins EsSalud, atendidos durante el 2012.

Para tal fin se elaboró una ficha de recolección de datos ajustada a los objetivos de la investigación y validada por profesionales del mencionado centro que laboran en dicho programa.

Obtenido el permiso del Comité de Ética institucional y firmado el consentimiento informado por ambos padres y/o asentimiento informado por los niños mayores de 7 años; se inició la recolección de datos (ver anexo), se extrajo una muestra sanguínea de los individuos de la población y se realizó el análisis genético por la técnica de PCR en tiempo real, utilizando un termociclador de la marca LightCycler® DNA Master HybProbe.

Se tomaron en cuenta los siguientes criterios de inclusión: pacientes pertenecientes al programa de Fibrosis Quística del Hospital Edgardo Rebagliati Martins EsSalud, diagnosticados, de fibrosis quística con edades entre 0 y 15 años, y evaluados previamente por un especialista neumólogo pediatra, para definir si cumplen los criterios clínicos.

Los datos obtenidos se ordenaron y procesaron utilizando el programa el programa Excel 12 para Mac. Para las tablas y gráficos se usaron los programas Word 12 y Excel 12 para Mac.

En los aspectos éticos el equipo de investigación dio prioridad al mantenimiento de la privacidad, confidencialidad y anonimato de las historias de los pacientes en estudio, las muestras sanguíneas fueron rotuladas con un número para cada paciente, quedando ésta lista en manos del investigador principal únicamente, todo ello basado en la declaración de Helsinki.

La firma del consentimiento informado, el manejo de las muestras genéticas y sus resultados se hicieron de acuerdo a la Declaración Internacional sobre los Datos Genéticos Humanos de la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) de 2003.

Gráfico 1.
Sintomatología en el momento del diagnóstico.

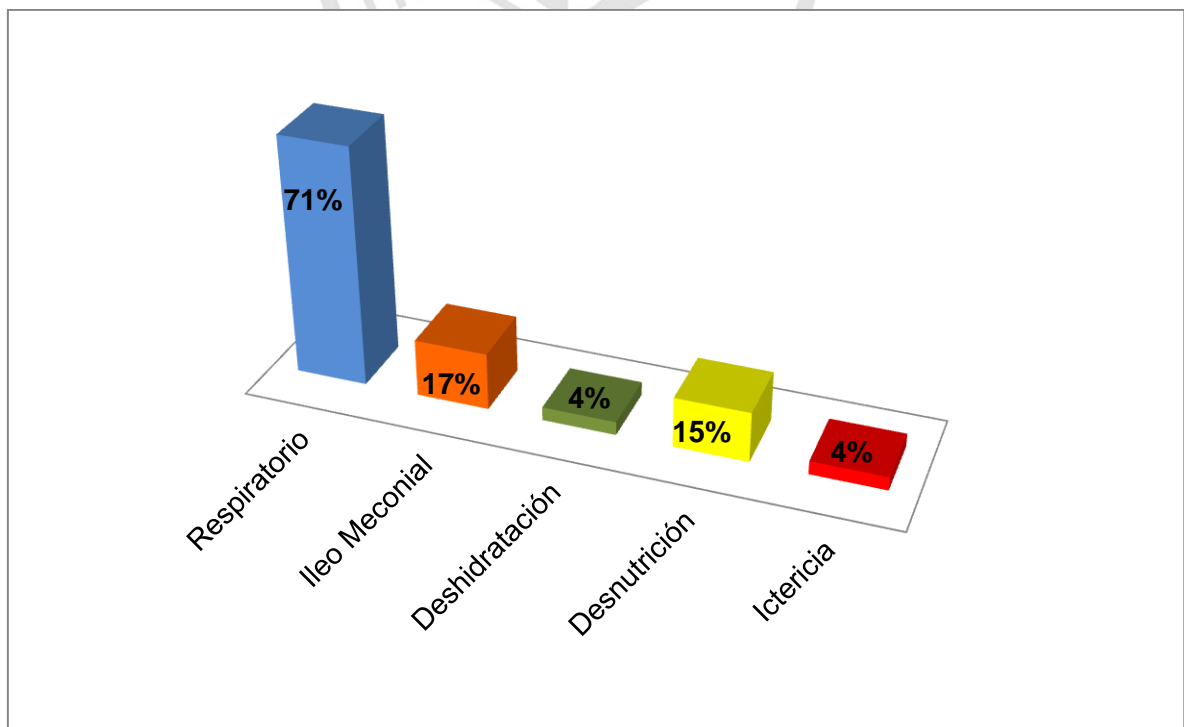


Tabla 2 Características clínico – laboratoriales			
		Nº	%
Prueba genética *	$\Delta f508$ +/-	1	4,34
Test de cloro en sudor	Positivo	23	100
Patología respiratoria	SI	23	100
I. Pancreática	Si	10	43,5
Ambas patologías	Si	10	43,5
Total		23	100

* Paciente que ya tenía prueba genética hecha en España

Tabla 3 Frecuencia de la mutación $\Delta F508$ del gen CFTR de la fibrosis quística			
		Nº	%
Mutación	Heterocigoto positivo	6	26,1%
	Negativo	14	60,9%
	Homocigoto negativo	3	13,0%
Válidos		23	100,0%

V. DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

Es ampliamente conocido que la diversidad racial y por ende genética de América Latina, marca patrones en la expresión de enfermedades, su frecuencia y características clínicas. La fibrosis quística, como hemos explicado en el presente estudio, no elude tal realidad, sobretodo porque es una enfermedad con miles de posibles mutaciones, racialmente determinadas. Por ésta condición, es importante conocer en Perú la presencia de las mutaciones más comunes del gen CFTR, incluyendo la más frecuente, que es la $\Delta F508$.

Nuestros hallazgos en 23 niños con fibrosis quística, incluidos en el programa más grande a nivel nacional para ésta enfermedad, arrojaron muchos datos semejantes a los internacionales ^[33,34]; encontramos una predisposición por los varones (66%), ésta frecuencia representa un hallazgo estadístico y no tienen repercusión clínica; porque hasta ahora no se han encontrado predisposición por el sexo o características específicas asociadas; excepto por la azospermia, obviamente.

Los hallazgos clínicos son semejantes en todos los estudios y a diferencia de lo reportado por Morales – Machin et al ^[35], quienes reportaron antecedentes familiares en la presencia de las mutaciones, nosotros no encontramos historia de la enfermedad en los familiares de los pacientes estudiados, y a aunque no se hizo el análisis genético a la familia, atribuimos que los diferentes patrones de mestizaje dominados por el origen multiétnico de

nuestras regiones, además de alteraciones moleculares intrínsecas o eventos epigenéticos, le dan singularidad a cada población que se analice.

Estos investigadores añaden que la mutación $\Delta F508$ proviene de abuelos en su mayoría (79,41%) nacidos en países mediterráneos y en las no $\Delta F508$, los abuelos son nacidos preferentemente en los países de investigación; apoyando la teoría de las mutaciones autóctonas. Encontramos que la totalidad de pacientes que tienen insuficiencia pancreática, son homocigotos positivos para la mutación, como se describe en la literatura este hallazgo depende mucho de lo avanzado de la enfermedad y no es patognomónico del defecto genético.

La desnutrición presente en un 15% en el momento del diagnóstico demuestra lo tardío que éste se vuelve en nuestro país, además no encontramos ningún paciente que haya tenido prueba de tamizaje neonatal y el grueso de los diagnosticados debutan con sintomatología respiratoria, muchos de ellos en estadios ya avanzados y habiendo sido diagnosticados anteriormente de asma no controlados o de difícil manejo, hasta incluso de tuberculosis.

Nuestra frecuencia de positividad para $\Delta F508$ hallada fue 39,1% (26,1% de los pacientes con mutación heterocigota positiva, y 13% con mutación homocigota positiva) y la frecuencia alélica, calculada según la fórmula de equilibrio de Hardy-Weinberg, fue de 26,62% ($p=0.0014$), datos bastante parecidos a los

encontrados en los reportes peruanos de Silva ^[12] y Zavaleta ^[13] donde las frecuencias alélicas estimadas fueron de 18,2% y 25% para las mutaciones respectivamente y 8,3% para la G542X (ambos estudios usaron PCR convencional).

Ésta diferencia en las frecuencias es estadísticamente significativa ($p < 0,001$), sólo para los hallazgos de Silva; lo que atribuimos a nuestro mayor número de pacientes incluidos y quizás a la confiabilidad de la técnica usada.

Usar PCR en tiempo real para analizar el error $\Delta F508$, fue pionero en el país; por su rapidez y confiabilidad es la técnica mundialmente recomendada en la búsqueda de mutaciones genéticas; con nuestro protocolo contribuimos con la estandarización para su uso rutinario.

En las comunidades latinoamericanas el primer reporte de la frecuencia del alelo $\Delta F508$, fue un estudio realizado en Argentina, aquí analizaron principalmente descendientes de italianos y de otros grupos europeos, con una frecuencia del alelo $\Delta F508$ de 63% y en otro reporte más reciente se encontró una frecuencia de 57% ^[36].

En México la frecuencia del alelo oscila entre 10% y 50,1% ^[33], Brasil presenta frecuencia promedio reportada de 47%, con marcada heterogeneidad intrapoblacional ^[37]; por su parte en Cuba se ha reportado una frecuencia de 34% ^[38]; en Colombia la frecuencia a nivel nacional varía entre 35,4% y 48% ^[39] con diferencias entre los departamentos y regiones estudiadas, con el

valor más bajo de 25% en el departamento Bolívar y el más alto 66,6% en Santander ^[40]. En Chile la frecuencia es de 29,2% ^[41]

En comparación a estos países latinoamericanos, se observa que la frecuencia alélica en nuestro estudio es significativamente baja lo asociamos con la reportada en Argentina, Brasil y Chile ($p < 0,001$). Con respecto a Cuba, México y Colombia no se observaron diferencias significativas en la distribución del alelo $\Delta F508$. Lo más llamativo es que observamos que las diferencias se mantienen con países donde predominó la migración europea de países con alta frecuencia de la mutación $\Delta F508$, a diferencia de los países donde el mestizaje fue mayor y donde se vienen encontrando mutaciones propias.

Con éstos nuevos resultados y teniendo hasta ahora la mayor población estudiada para medir la frecuencia alélica de la mutación $\Delta F508$ en niños en el Perú, colaboramos no sólo con el hallazgo estadístico; sino también con la estandarización del PCR en tiempo real como prueba ideal para el secuenciamiento genético de una enfermedad cada vez más frecuente en nuestro país, debido a la sospecha y búsqueda activa que se realiza actualmente; pacientes que antes eran considerados como tuberculosos de difícil manejo o con enfermedades gástricas de etiología desconocida, ahora son pesquisados para fibrosis quística. La insuficiencia pancreática asilada es una variable predictora de la presencia de la mutación fibrosis quística,

aunque un estudio con un mayor marco muestral puede aclarar este hallazgo.

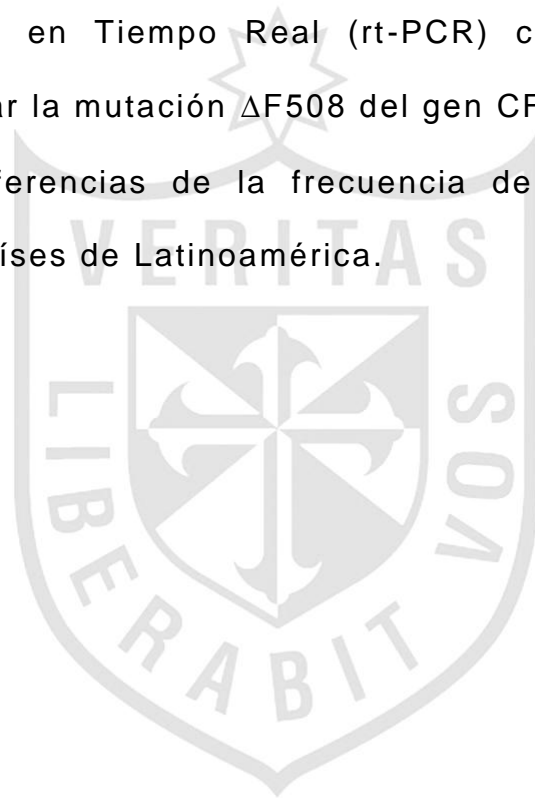
Esperemos que en un futuro no muy lejano, podamos secuenciar todo el gen de un gran grupo de estos pacientes, debido a que la mayoría de los diagnosticados se encuentran incluidos en los centros hospitalarios de referencia nacional como el Hospital Edgardo Rebagliati (Seguro Social de Salud) y del Instituto Nacional de Salud del Niño (Ministerio de Salud).

Bajo ésta óptica un proyecto liderado por Benoit Diringier, pretende analizar el gen completo en todos los pacientes con diagnóstico de fibrosis quística en nuestro país y encontrar nuestro perfil genético, sus hallazgos permanecen aún en investigación.

Queda aún mucho por hacer, si sumamos que nuestra carencia de recursos económicos vuelven difícil la investigación de genética poblacional que amerita ésta enfermedad, aunado al desconocimiento de los profesionales de la salud, sobre Fibrosis Quística, prueba de ello es el tardío diagnóstico y que el diagnóstico precoz está aún en reglamentación, nuestra labor es educar y demostrar que la enfermedad no es ajena a nuestro país como se ha venido creyendo.

CONCLUSIONES

- La frecuencia de la mutación $\Delta F508$ del gen CFTR en niños con fibrosis quística fue del 39,1%(26.1% heterocigotos, 13% homocigotos); con una frecuencia alélica de 26,62%.
- La mayoría de los pacientes fueron del sexo masculino, entre los 6 a 10 años, provenientes de Lima.
- Se confirma y estandariza el uso de Reacción en Cadena de Polimerasa en Tiempo Real (rt-PCR) como prueba para diagnosticar la mutación $\Delta F508$ del gen CFTR.
- Existen diferencias de la frecuencia de la mutación con algunos países de Latinoamérica.



RECOMENDACIONES

- Recomendamos apoyar las iniciativas que busquen abarcar una mayor muestra y realizar el mapeo completo del gen CFTR, donde se deben buscar las mutaciones propias o “autoctonas del país”, tomando como ejemplo las encontradas en países de alto mestizaje como el nuestro, para intentar tener nuestro perfil mutacional en fibrosis quística.
- Incluir y fortalecer el tamizaje neonatal con la prueba de tripsinogeno inmunoreactivo para la detección precoz de fibrosis quística.
- Reforzar el conocimiento y difusión de las características clínicas y cuando se debe sospechar de fibrosis quística para disminuir el número de pacientes sub-diagnosticados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*. 1989; 245(4922): 1073-80.
2. Puchelle E, De Bentzmann S, Hubeau C, Jacquot J, Gaillard D. Mechanisms involved in cystic fibrosis airway inflammation. *Pediatr Pulmonol*. 2001; 23:143-5.
3. Rich DP, Anderson MP, Gregory RJ, Cheng SH, Paul S, Jefferson DM, McCann JD, et al. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature*. 1990; 347(6291):358- 63.
4. Ramalho AS, Clarke LA, Amaral MD. Quantification of CFRT Transcripts. *Methods Mol Biol*. 2011; 741:115-35.
5. Boat TF. Cystic fibrosis. *Nelson Textbook of Pediatrics*. Philadelphia, Pa: WB Saunders Co; 2000: 1315-1327.
6. Strausbaugh SD, Davis PB. Cystic fibrosis: a review of epidemiology and pathobiology. *Clin Chest Med*. 2007; 28(2):279-88.
7. Venegas PB, Novak JM, Oscar CA, Sánchez FL, Gutiérrez IG, et al. Cystic fibrosis mutations in Costa Rica. *Hum Biol*. 2003; 75(2):179-88
8. Valle EP, Burgos RI, Valle JR, Egas Béjar D, Ruiz-Cabezas JC. Analysis of CFRT gene mutations and cystic fibrosis incidence in the Ecuadorian population. *Invest Clin*. 2007; 48(1):91-8.
9. Stallings VA, Stark LF, Robinson KA, Feranchak AP, Quinton H. Evidence-based practice recommendations for nutrition-related management of

- children and adults with cystic fibrosis and pancreatic insufficiency: Results of a systematic review. *J Am Diet Assoc.* May 2008; 108(5).
10. Keyeux G, Rodas C, Bienvenu T, Garavito P, Vidaud D, Sánchez D, et al. CFRT mutations in patients from Colombia: implications for local and regional molecular diagnosis programs. *Hum Mutat.* 2003; 22(3):259.
 11. Alonso MJ, Heine-Suñer D, Calvo M, Rosell J, Giménez J, et al. Spectrum of mutations in the CFRT gene in cystic fibrosis patients of Spanish ancestry. *Ann Hum Genet.* 2007; 71(2): 194-201.
 12. Silva C. Mutaciones más frecuentes en el gen CFRT de pacientes diagnosticados con fibrosis quística del Instituto Especializado de Salud del Niño. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Mayor de San Marcos. Lima-Perú.
 13. Zavaleta A, Silva CA, Rivera L, Del Castillo H, Torres DI. Mutación $\Delta F508$ en pacientes diagnosticados con fibrosis quística del Instituto de Salud del Niño. *Enfer Tórax* 2006; 50(2): 36-38.
 14. Genetic testing for cystic fibrosis. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement on genetic testing for cystic fibrosis. *Arch Intern Med.* 1999; 159(14):1529-39.
 15. Freedman SD, Blanco PG, Zaman MM, Shea JC, Ollero M, Hopper IK, Weed DA, et al. Association of cystic fibrosis with abnormalities in fatty acid metabolism. *N Engl J Med.* 2004; 350(6):560-9.
 16. Kunzelmann K, Schreiber R, Nitschke R, Mall M. Control of epithelial Na⁺ conductance by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Pflugers Arch.* 2000; 440(2):193-201.

17. Sagel SD, Sontag MK, Wagener JS, Kapsner RK, Osberg I, Accurso FJ. Induced sputum inflammatory measures correlate with lung function in children with cystic fibrosis. *J Pediatr* 2002;141:811-7.
18. Konstan MW, Davis PB. Pharmacological approaches for the discovery and development of new anti-inflammatory agents for the treatment of cystic fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:1409-23.
19. Koehler DR, Downey GP, Swezey NB, Tanswell AK, Hu J. Lung inflammation as a therapeutic target in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;31:377-81.
20. Muir A, Soong G, Sokol S, et al. Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;30:777-83.
21. Deschaght P, Van Daele S, De Baets F, Vaneechoutte M. PCR and the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in respiratory samples of CF patients. A literature review. *Journal of Cystic Fibrosis*. Sep 2011; 10 (5):293-297.
22. Saiman L, Marshall BC, Mayer-Hamblett N, Burns JL, Quittner AL, Cibene DA, et al.; Macrolide Study Group. Azithromycin in patients with cystic fibrosis chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2003; 290(13):1749-56.
23. Mogayzel PJ Jr., Flume PA. Update in cystic fibrosis 2009. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 181(6):539-44.
24. Bustin, S.A. Real-Time Reverse Transcription PCR. In: *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics* M.Podda & J.Fuchs, editors. Marcel Dekker. New York.2005:1131-5.
25. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 2005; 352(19):1992-2001.

26. Donaldson SH, Boucher RC. Update on pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Curr Opin Pulm Med.* 2003; 9(6):486-91.
27. Borowitz D, Robinson KA, Rosenfeld M, et al. Cystic Fibrosis Foundation evidence-based guidelines for management of infants with cystic fibrosis. *J Pediatr.* 2009; 155(6):73-93.
28. Flume PA, Mogayzel PJ Jr, Robinson KA, Rosenblatt RL, Quittell L, Marshall BC; Clinical Practice Guidelines for Pulmonary Therapies Committee; Cystic Fibrosis Foundation Pulmonary Therapies Committee. Cystic fibrosis pulmonary guidelines: pulmonary complications: hemoptysis and pneumothorax. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010; 182(3):298-306.
29. Konstan MW, Schluchter MD, Xue W, Davis PB. Clinical use of Ibuprofen is associated with slower FEV1 decline in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 176(11):1084-9.
30. Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, Tullis E, Bell SC, Devnek P, et al., for the VX08-770-102 Study Group. A CFTR Potentiator in Patients with Cystic Fibrosis and the G551D Mutation. *N Engl J Med.* 2011; 365: 1663-72.
31. Montiel-Gonzalez MF, Vallecillo-Viejo I, Yudowski GA, Rosenthal JJ. Correction of mutations within the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by site-directed RNA editing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:18285-90.
32. Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. "Population variation of common cystic fibrosis mutations" 2000; <http://www.sickkids.on.ca/CFRT/>
33. Restrepo C, Pineda L, Rojas A, Gutierrez C, Morales-Machin A, Gómez Y, et al. CFTR mutations in three latin american countries. *Am J Med Genet* 2000; 91:277-279.

34. Arzimanoglou I, Tuchman A, Li Z, Gilbert F. Cystic fibrosis carrier screening in hispanics. *Am J Hum Genet* 1995; 56:544-547.
35. Morales, Machín Frecuencia de la mutación F508 en pacientes venezolanos afectados con fibrosis quística *Invest Clin*; 2004; 45(2):121-130
36. Chertkoff L, Visich A, Bienvenu T, Grenoville M, Segal E, Carniglia L, Kaplan J, Barreiro C. Spectrum of CFTR mutations in Argentine cystic fibrosis patients. *Clinical Genetics* 1997; 51: 43-47.
37. Raskin S, Phillips J, Krishnamani M, Vnencak-Jones C, Parkler R, Rozov T, Cardieri J, et al. DNA analysis of cystic fibrosis in Brazil by direct PCR amplification from Guthrie cards. *Am J Med Genet* 1993; 46:665-669
38. Collazo T, Magarino C, Chavez R, Suardiaz B, Gispert S, Gómez M, Rojo M, Heredero L. Frequency of Delta-F508 mutation and XV2C/KM19 haplotypes in Cuban cystic fibrosis families. *Hum Hered* 1995; 45:55-57.
39. Mateus, Heidi. Frecuencia de la mutación $\Delta F508$ del en estudiantes de la Facultad de Medicina de la Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia *Colomb. Med*; 2007; 38(4):352-6.
40. Keyeux G, Sánchez D, Garavito P, Stand I, Rodas C, Bienvenu T, Aristizábal G, Zarante I, et al. Estudios moleculares en pacientes colombianos con fibrosis quística. *Acta Méd Colomb* 1997; 22: 167-173.
41. Rios J, Orellana O, Aspillaga M, Avendaño I, Largo I, Rivero N. CFTR mutations in Chilean cystic fibrosis patients. *Hum Genet* 1994; 94: 291-294.