

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**  
Facultad de Ciencias Exactas  
Departamento de Ciencias Biológicas

Tesis de Maestría en Ciencias del  
Laboratorio Clínico



**“DETECCIÓN MOLECULAR DE TRES GRANDES DELECCIONES  
DEL GEN CFTR EN PACIENTES FIBROQUÍSTICOS DE LA  
PROVINCIA DE BUENOS AIRES”**

**Inés Echeverría**

Dirección  
Prof. Dra. Susana B. Etcheverry

Co-dirección  
Lic. Marta Elena Palumbo

La Plata, Argentina

2011

Este trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría “Sup. Sor María Ludovica” en un proyecto colaborativo con la Cátedra de Bioquímica Patológica, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Prof. Dra. Susana B. Etcheverry y la co-dirección de la Lic. Marta Elena Palumbo. Constituye la Tesis de Maestría que elevo a consideración de las autoridades correspondientes para optar al título de Magíster en Ciencias del Laboratorio Clínico.

## **Dedicado a**

*Mi hijo Alejandro, mi esposo Luis*

*Mis padres Sixto y María Teresa*

*Mis hermanos Cristóbal y Armando*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Susana Etcheverry, Directora de tesis.

A la Lic. Marta Elena Palumbo, Jefa del Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría “Sup. Sor María Ludovica”.

A Laura Orellano, Mónica Labollita y al personal del Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría “Sup. Sor María Ludovica”.

A la Lic. Leonora Kozubsky, Jefa de la Unidad Bioquímica Especializada del Laboratorio Central del Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría “Sup. Sor María Ludovica”.

A la Dra. Graciela Bailleit, investigadora del IMBICE por el soporte técnico brindado para la secuenciación de las muestras.

Al Doctor Fernando Rentería por permitirnos el acceso a las historias clínicas de los pacientes.

A la Dra. Nilda Fink, Coordinadora de la Maestría.

A Luis por su colaboración en la búsqueda de las publicaciones.

A la Dra. Sonia Ulic y su esposo Roberto García, nuestra familia en Argentina.

A mi familia por ser mi constante motivación de superación.

A todos los investigadores de la enfermedad fibroquística por dedicar parte de su vida en la búsqueda de respuestas, de métodos de detección precoz de la enfermedad y a alcanzar alternativas terapéuticas eficaces e inocuas que mejoran las expectativas y la calidad de vida de los pacientes.

## RESUMEN

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad hereditaria autosómica recesiva más frecuente en la población mundial. La enfermedad fibroquística es la expresión de diferentes mutaciones en el gen que codifica la proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), responsable del flujo de iones cloruro a través de la membrana celular del tejido epitelial. El gen CFTR posee acción pleiotrópica que le confiere a la fibrosis quística la característica de ser multisistémica, comprometiendo principalmente, además de las glándulas sudoríparas, la función pulmonar, pancreática, hepática y los varones afectados manifestarán infertilidad.

Se han descrito más de 1600 mutaciones en este gen. Originalmente se creía que eran exclusivamente mutaciones puntuales o micro-delecciones/inserciones y recién desde 1993 se incluyeron los grandes reordenamientos del gen CFTR como mutaciones causantes de la FQ. A pesar de que la distribución y frecuencia de las mutaciones presentan marcadas variaciones étnicas y geográficas, la delección de una fenilalanina en la posición 508 del polipéptido (F508del) es la mutación más común en el mundo. Actualmente el diagnóstico de las mutaciones del gen CFTR se realiza con *kits* comerciales diseñados para detectar las mutaciones más frecuentes en la población caucásica.

En este trabajo se determinó la presencia de tres grandes delecciones del gen CFTR (exones 17a/17b/18, 20, 24) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se estudiaron 130 pacientes no relacionados que incluían aquellos con una sola mutación previamente detectada y pacientes con manifestaciones clínicas y diagnóstico de sospecha para fibrosis quística que permanecían como no identificados para el perfil de mutaciones del gen CFTR que realiza el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría "Sup. Sor María Ludovica" de La Plata.

Se complementó esta investigación con la determinación de las mutaciones en los familiares de los pacientes portadores de las mutaciones, la revisión de las historias clínicas y la secuenciación de los fragmentos mutantes del gen CFTR amplificados.

Como resultados principales de este trabajo se detectaron tres pacientes heterocigotos para la mutación CFTRdele17a\_18 (3120+1Kbdele8.6Kb), una deleción de los exones 17a/17b/18 que elimina la parte terminal (10-12) del dominio transmembrana 2 (TM2) del gen CFTR.

El fenotipo de los tres pacientes con la mutación CFTRdele17a\_18 (3120+1Kbdele8.6Kb) es severo, incluye grave deterioro pulmonar e insuficiencia pancreática, el genotipo se completa porque los pacientes son también portadores de una mutación de clase II. La secuenciación del fragmento mutado amplificado confirma que es una mutación de 159 aminoácidos.

La mutación CFTRdele17a\_18 (3120+1Kbdele8.6Kb) se ha descrito en pacientes con ascendencia árabe, que nos permite relacionar un componente de Medio Oriente en la población argentina.

No se detectó ningún paciente portador de las mutaciones CFTRdele20 y CFTRdele24, lo que coincide con la frecuencia reportada en las publicaciones existentes.

Empleando secuencias específicas de cebadores previamente publicadas, se pueden determinar grandes deleciones del gen CFTR de una manera sencilla y accesible para todo laboratorio de Diagnóstico Molecular.

## ABREVIATURAS

<b>FQ:</b>	Fibrosis quística
<b>CFTR:</b>	Regulador de la Conductancia Transmembrana de la Fibrosis Quística
<b>ADN :</b>	Acido desoxirribonucleico
<b>ARN :</b>	Acido ribonucleico
<b>PCR:</b>	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>pb:</b>	Pares de bases
<b>Kb:</b>	Kilo base
<b>dNTP :</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>EDTA :</b>	Etilen diamino tetra acético
<b>NADH :</b>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
<b>RCLB:</b>	Buffer de lisis de glóbulos rojos ( <i>Red cell lysis buffer</i> )
<b>TAE :</b>	Tris acetato EDTA
<b>TBE :</b>	Tris borato EDTA
<b>DHPLC:</b>	Cromatografía líquida desnaturalizante de alto rendimiento ( <i>Denaturing high-performance liquid chromatography</i> )
<b>MLPA:</b>	Ligadura-dependiente multiplex de amplificación de la sonda ( <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> )
<b>QMPSF:</b>	Múltiplex cuantitativa de fragmentos cortos fluorescentes ( <i>Quantitative Multiplex Polymerase Chain Reaction of Short Fluorescent</i> )
<b>QFM-PCR:</b>	PCR multiplex fluorescente semi-cuantitativa ( <i>Quantitative fluorescent multiplex PCR</i> )

**SQF-PCR:** PCR semi-cuantitativa fluorescente (*Semiquantitative fluorescent PCR*)

**CBAVD:** Ausencia congénita bilateral de vasos deferentes

# ÍNDICE

Resumen.....	VII
Abreviaturas .....	VIII
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1 Fibrosis quística .....	2
1.1.1 Generalidades .....	2
1.1.2 Antecedentes .....	3
1.1.3 Gen y proteína CFTR .....	10
1.1.4 Espectro de mutaciones del gen CFTR .....	14
1.1.5 Correlación genotipo-fenotipo .....	20
1.1.6 Incidencia y distribución étnica .....	23
1.1.7 Fisiopatología .....	25
1.1.7.1 Enfermedad del aparato respiratorio .....	25
1.1.7.2 Manifestaciones gastrointestinales, hepáticas y nutricionales .....	27
1.1.7.3 Otras manifestaciones .....	29
1.1.8 Diagnóstico .....	31
1.1.9 Tratamiento .....	39
1.1.9.1 Sintomático .....	39
1.1.9.2 En etapa de investigación .....	40
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>42</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
3.1 Materiales .....	44
3.1.1 Área de trabajo .....	44
3.1.2 Población de estudio .....	44
3.1.3 Reactivos y materiales .....	45
3.1.4 Equipos .....	46
3.2 Esquema de trabajo .....	47
3.3 Métodos .....	47
3.3.1 Extracción de ADN .....	48
3.3.2 Electroforesis .....	48
3.3.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR .....	49
3.3.4 PCR ASO reversa ( <i>Reverse dot-blot</i> ) .....	51
3.3.5 Determinación de las mutaciones .....	53
3.3.5.1 F508del .....	53
3.3.5.2 INNO-LiPA CFTR 19 y 17+Tn Innogenetics .....	55
3.3.5.3 Deleción de los exones 17a/17b/18 .....	58
3.3.5.4 Deleción del exón 20 .....	60
3.3.5.5 Deleción del exón 24 .....	62
3.3.6 Secuenciación de ADN .....	64
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>71</b>
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>85</b>

6. ANEXOS .....	88
7. BIBLIOGRAFIA .....	91

---

# **INTRODUCCIÓN**

---

## 1.1 Fibrosis quística

### 1.1.1 Generalidades

La fibrosis quística es la enfermedad hereditaria autosómica recesiva más frecuente en la población mundial.<sup>1</sup> Se la denomina también enfermedad fibroquística del páncreas o mucoviscidosis.

La fibrosis quística se produce por la expresión de las mutaciones en el gen regulador de la conductancia transmembrana, conocido como CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) que codifica una proteína de membrana que participa en el transporte del ión cloruro mediado por ATP.

Es una enfermedad multiorgánica, caracterizada por disfunción de las glándulas sudoríparas (en las que se genera un sudor salado) y de las glándulas de secreción exocrina, debido a la formación de moco espeso y pegajoso que obstruye el intestino, las vías biliares y pancreáticas y se acumula en las vías áreas distales después del nacimiento. En consecuencia las manifestaciones clínicas son diversas y de gravedad variable.

El curso del cuadro es progresivo, la mayoría de los pacientes presentan enfermedades respiratorias recurrentes y malabsorción desde la lactancia. Sin embargo, es frecuente también hallar adultos sin diagnóstico con compromiso leve del aparato respiratorio y esterilidad.<sup>2</sup>

La fibrosis quística tiene una incidencia variable en las diferentes etnias y en las distintas regiones geográficas. La incidencia global en la población caucásica es de 1 en 2500 nacidos vivos y la frecuencia de portadores heterocigotos es de 1:25 individuos.<sup>2</sup>

Datos provenientes de programas de detección de errores congénitos implementados en Argentina, estiman su incidencia en 1:6100 recién nacidos, la prevalencia de portadores sanos de la mutación es de aproximadamente 1:40.<sup>3</sup> En la provincia de Buenos Aires, los primeros estudios de pesquisa neonatal con tripsina inmunorreactiva elevada mostraron una incidencia de 1/5691.<sup>4</sup>

No existe un tratamiento curativo para la fibrosis quística, el beneficio de la detección temprana es la oportunidad de monitorear de forma adecuada las manifestaciones clínicas de las infecciones respiratorias, prevenir la desnutrición e instaurar un tratamiento precoz al prescribir antibióticos adecuados para evitar el daño pulmonar irreversible, todo en conjunto mejorará la supervivencia y la calidad de vida del paciente.<sup>5</sup>

### 1.1.2 Antecedentes

El nombre de “fibrosis quística del páncreas” hace referencia al proceso característico de cicatrización (fibrosis) y formación de quistes dentro del páncreas, reconocido por primera vez por Dorothy Andersen en 1930.<sup>6</sup>

Andersen en 1938 describe a la fibrosis quística como entidad nosológica al correlacionar las historias clínicas de los pacientes y los resultados de las autopsias que evidenciaban el deterioro del tejido pulmonar, pancreático e intestinal.<sup>2,6</sup>

Farber en 1950 describió las secreciones espesas y denominó a la enfermedad “mucoviscidosis”<sup>2</sup>

Paul di Sant' Agnese en 1953 describió anomalías en los electrolitos del sudor, debido al exceso de iones cloruro y sodio. Gibson y Cooke describieron y publicaron el método estandarizado para la prueba de sudor, mediante iontoforesis con pilocarpina que hasta la actualidad es empleado para el diagnóstico de la enfermedad.<sup>7</sup>

En 1983 Paul Quinton contribuye a futuras investigaciones al descubrir el defecto específico en la reabsorción de cloro.<sup>2</sup>

En 1985 Lap-Chee Tsui traza el mapa del gen CFTR en el cromosoma 7q.<sup>8</sup>

En 1989 Rommens, Riordan y Kerem describen el gen y descubren la primera mutación causante de la enfermedad F508del. Riordan denomina al gen *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR).<sup>9</sup>

En 1990 Francis Collins describió el aislamiento y significado del gen<sup>10</sup>. En 1992 presenta la patogénesis específica que determina el gen CFTR.<sup>11</sup> El gen CFTR fue uno de los primeros genes en ser localizado y secuenciado por mapeo genético y algunos de los participantes en este proyecto, como Collins, estuvieron más tarde implicados en el Proyecto Genoma Humano.

En Argentina, las publicaciones realizadas muestran el trabajo conjunto de los profesionales del área médica y bioquímica que aportan información valiosa e

incentivan a futuras investigaciones. En 1996 Bienvenu T y colaboradores, identificaron tres nuevas mutaciones en el gen CFTR en pacientes fibroquísticos argentinos, manifestando la falta de información disponible de la incidencia de esta enfermedad en el país. Dado que la mayor corriente migratoria recibida por Argentina fue de Italia y España, en menor proporción de Europa Central-Oriental y del Medio oeste, el origen étnico de la población argentina es heterogéneo y con distribución geográfica particular, haciéndola de interés para detectar los desórdenes hereditarios más comunes en la población caucásica.<sup>12</sup>

En 1997 Chertkoff L y colaboradores, establecieron el espectro de mutaciones del gen CFTR en pacientes fibroquísticos argentinos. Concluyeron que la incidencia de las mutaciones es similar a la de la población del sur de Europa y con marcada diferencia a la de otros países Latinoamericanos.<sup>13</sup>

En el año 2001 Visich A y colaboradores publican el análisis de tres microsátelites del gen CFTR empleados como marcadores para realizar estudios de ligamiento en familias fibroquísticas de población argentina<sup>14</sup>. Este mismo año Roqué M y colaboradores, concluyeron mediante un screening en 1000 muestras que la frecuencia de portadores de la mutación F508del en una población de Mendoza es del 2.1%, similar a lo observado en la población europea.<sup>15</sup>

En el año 2002 Visich A y colaboradores, presentan los resultados de un extensivo análisis molecular del gen CFTR para establecer la naturaleza y distribución de las mutaciones causantes de la fibrosis quística en la población argentina, evidenciando el amplio espectro de mutaciones del gen CFTR en concordancia con la heterogeneidad de origen étnico de esta población.<sup>16</sup>

En el año 2004 Levy EM y colaboradores, identificaron diferentes mutaciones del gen CFTR y variantes poli-T del intrón 8 (IVS8) en pacientes argentinos con ausencia congénita bilateral de vasos deferentes (CBAVD), una forma de infertilidad masculina. Se evaluaron los resultados de la prueba de sudor y de otras características clínicas relacionadas con la fibrosis quística, se realizaron determinaciones en familiares de los pacientes para el asesoramiento genético y así reducir el riesgo de FQ/CBAVD en los descendientes.<sup>17</sup>

En el año 2006 Oller Ramírez y colaboradores, publicaron en su trabajo el espectro y la frecuencia de las mutaciones del gen CFTR en pacientes de Córdoba<sup>18</sup>. En el 2008 los mismos autores contribuyeron a la caracterización molecular de 93 pacientes con fenotipos clásicos y atípicos, además de la detección de portadores. Concluyeron que las investigaciones fármaco-terapéuticas se basan en el tipo de mutación, por lo que conocer las mutaciones de los pacientes (genotipo) tiene significativa importancia para la futura aplicación de terapias específicas.<sup>19</sup>

En una comunicación personal, en el año 2007, Orellano L y colaboradores, presentaron los resultados del análisis estadístico de 199 muestras estudiadas en el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría “Sup. Sor María Ludovica” de La Plata, (Centro Provincial de Fibrosis Quística) y determinaron que la frecuencia de las principales mutaciones analizadas fue semejante a la de la población del sur de Europa dado que el 56.5% de los alelos presentaron F508del.<sup>20</sup>

Debido a que los grandes reordenamientos genómicos del gen CFTR no son fácilmente detectables por las técnicas convencionales basadas en la PCR, se ha sugerido que estas mutaciones podrían explicar los alelos no identificados. Las primeras detecciones se realizaron sin la aplicación de un proceso de investigación sistemático.

Los reordenamientos genómicos se incluyeron en el espectro de mutaciones del gen CFTR a partir del año 1993. Actualmente con la aplicación de tecnología vanguardista los investigadores continúan contribuyendo con la detección y caracterización de los grandes reordenamientos del gen CFTR.

En 1993 Morral N y colaboradores, mostraron la primera gran deleción identificada en el gen CFTR, que consiste en 50 kb en dos tramos de ADN: una de 10 kb del exón 4 y el exón 7, y otro de 40 kb, que abarca los exones 11 a 18. La supresión se detectó a través de microsatélites de herencia uniparental de los alelos CFTR (IVS17BTA y IVS17BCA). Se sugiere que esta mutación es responsable de un fenotipo clínico grave, indistinguible de los pacientes homocigotos F508del. La deleción detectada sugiere que otros grandes defectos moleculares menos complejos también podrían existir en el gen CFTR.<sup>21</sup>

En 1996 Magnani C y colaboradores, detectaron la segunda gran deleción del gen CFTR en un paciente fibroquístico en base a un patrón anormal de la herencia de los microsatélites intragénicos IVS17b/TA y IVS17b/CA. El análisis Southern blot reveló la presencia de una banda anómala en el paciente y su padre, en la región que abarca los exones 13 a 19. La clonación y secuenciación de los fragmentos de ADN que abarcan la región de interés demostró la presencia de una deleción de 703 pb que causa la eliminación completa de exón 17 b en el gen CFTR.<sup>22</sup>

Lerer I y colaboradores en 1999 detectaron la mutación CFTRdele17a\_18, con una incidencia del 13% en la población árabe Palestina.<sup>23</sup>

Dörk T y colaboradores en el año 2000 caracterizaron la gran deleción CFTRdele2-3 (21kb), que presenta una frecuencia del 5% en la población eslava, siendo la más frecuente en Europa Oriental.<sup>24</sup>

En el año 2004, Audrézet M y colaboradores presentaron la primera detección sistemática en los 27 exones del gen CFTR para los grandes reordenamientos, empleando múltiplex cuantitativa de fragmentos cortos fluorescentes (QMPSF). Identificaron y caracterizaron cinco nuevas mutaciones (una deleción grande y cuatro inserciones/deleciones). Estos autores demostraron que los grandes reordenamientos genómicos representan aproximadamente el 16% de los alelos CFTR no identificados.<sup>25</sup>

Niel F y colaboradores en el año 2004 publicaron que los reordenamientos del gen CFTR representan el 20% de los alelos FQ no identificados y el 1,3% de todas las mutaciones de FQ en la población francesa.<sup>26</sup>

Chevalier-Porst F y colaboradores en el año 2005, empleando una combinación de diferentes métodos, encontraron tres nuevas deleciones y reportaron los puntos de interrupción de la deleción EX4\_EX10del40kb. Un polimorfismo de deleción intrónica que afecta el intrón 17b se encontró en casi el 1% de los cromosomas "normales". El estudio de las secuencias de los puntos de interrupción confirmó que el intrón 17b es de hecho un punto caliente (*hot spot*) para las deleciones, y que la mayoría de estos reordenamientos son causados por recombinación no homóloga.<sup>27</sup>

En el mismo año Bombieri C y colaboradores, empleando QMPSF determinaron que la frecuencia de los reordenamientos del gen CFTR presente en la población FQ italiana coincide con lo publicado por Audrézet M y colaboradores en el año 2004, en la población FQ francesa, donde los reordenamientos del gen CFTR representan 8/49 (16%) de los alelos FQ previamente no identificados.<sup>28</sup>

En el año 2006 Férec C y colaboradores detectan seis nuevas mutaciones (CFTRdele20, CFTRdele24), empleando QMPSF y DHPLC cuantitativa. Estos resultados incrementaron a 21 el número total de las deleciones participantes en los grandes reordenamientos del gen CFTR. Estas mutaciones son completamente caracterizadas a partir de 274 alelos no identificados provenientes de 10 países. Estas 21 mutaciones son causadas por recombinación no homóloga.<sup>29</sup>

En el mismo año Nectoux J y colaboradores publicaron los resultados de su investigación en una población FQ de la Isla de la Reunión (Departamento de Ultramar de Francia), caracterizaron la gran deleción genómica IVS16+ 3316\_IVS18+ 644del5288, que representa el 46% de los alelos no identificados (6 /13) y el 2,63% (6/228) de las mutaciones de FQ en la Isla de la Reunión. Esta deleción parece ser la cuarta mutación más frecuente en esta población. Utilizaron en este estudio la recién desarrollada ligadura-dependiente multiplex de amplificación de la sonda (MLPA).<sup>30</sup>

Hantash F y colaboradores en el año 2006 empleando el ensayo de PCR semi-cuantitativa fluorescente (SQF-PCR) determinaron que la frecuencia de los reordenamientos del gen CFTR en pacientes con FQ clásica fue de 60% (10/16), cuando tras la extensiva secuenciación del ADN sólo se identificó una mutación. La detección de deleciones y duplicaciones en los exones del gen CFTR sería beneficiosa en casos de FQ clásica, sobre todo cuando por las metodologías estándares se identifica una sola mutación.<sup>31</sup>

En el año 2007 Girardet A y colaboradores presentaron el esquema de detección de dos grandes deleciones del gen CFTR ya identificadas en estudios previos, en dos pacientes franceses, para la caracterización emplearon SQF-PCR.<sup>32</sup>

Ratbi I y colaboradores en el año 2007 detectaron cuatro grandes reordenamientos en pacientes CBAVD, hombres infértiles portadores de una mutación leve: dos deleciones parciales conocidas (exones 17a\_18 y 22 a 23), una deleción completa y una nueva duplicación parcial (exones 11 a 13). Utilizaron PCR multiplex semi-cuantitativa fluorescente (QFM-PCR). Los reordenamientos representaron el 7% de los alelos antes desconocidos y el 1% de todos los alelos sin identificar. Concluyeron que la detección de los reordenamientos debería ser parte de los estudios exhaustivos del gen CFTR en pacientes CBAVD y que tiene impacto para el asesoramiento genético de los pacientes y sus familias.<sup>33</sup>

En el mismo año Taulan M y colaboradores ampliaron el espectro mutacional del gen CFTR en pacientes con ausencia congénita bilateral de los conductos deferentes (CBAVD), al detectar dos grandes deleciones en dos pacientes CBAVD. El diseño de su protocolo incluye SQF-PCR y confirmar los grandes reordenamientos por amplificación de los fragmentos de empalme e identificación de los puntos de interrupción por secuenciación directa.<sup>34</sup>

En el año 2008 Paracchini V y colaboradores, empleando MLPA caracterizaron nueve deleciones diferentes y una nueva duplicación. La deleción de los exones 22-23 (7/82) fue la más frecuente en la población estudiada, todos los pacientes presentaron la forma clásica de la fibrosis quística. La búsqueda de deleciones/duplicaciones del gen CFTR ha hecho posible alcanzar una tasa de detección del 94,1% con una mejora de la tasa de detección (1,6%) de portadores en la población italiana.<sup>35</sup>

Des Georges M y colaboradores en el año 2008 reportaron la detección de la primera gran deleción c.54-1161\_c.164+1603del2875 del gen CFTR en un paciente FQ sudafricano. Aplicaron la siguiente metodología: SQF-PCR, amplificación completa del genoma (WGA) y MLPA.<sup>36</sup>

En el mismo año Schrijver I y colaboradores empleando MLPA en pacientes FQ hispánicos, identificaron en un individuo una deleción de los exones 2-3 y en tres pacientes una deleción de los exones 22-23. En los cuatro casos determinaron que los puntos de interrupción son congruentes con los datos reportados en publicaciones previas.<sup>37</sup>

En el año 2010 Ramos M y colaboradores concluyeron tras su trabajo investigativo y otros estudios previos realizados, que los reordenamientos del gen CFTR representan el 1,3% de los alelos FQ españoles.<sup>38</sup>

A la fecha de la realización de esta investigación, no se encontraron datos publicados de la frecuencia de los reordenamientos del gen CFTR en la población fibroquística argentina.

### 1.1.3 Gen y proteína CFTR

El gen de cuyas mutaciones es expresión la fibrosis quística está localizado en el brazo largo del cromosoma 7 región q31.2<sup>39</sup>. Es un gen grande de 230 Kb y posee 27 exones que codifican un ARNm de 6129 Kb, que a su vez codifica una glicoproteína de 1480 aminoácidos que ha recibido el nombre de regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística, CFTR por sus siglas en inglés (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulador*).<sup>8</sup> Esta proteína es un "canal de cloro" mediado por AMPc y tiene un rol en la regulación del transporte iónico a través de la membrana apical de las células epiteliales. La estructura general del CFTR es bastante similar a la familia de proteínas de membrana transportadoras con sitios de unión al ATP (ATP-binding cassette) denominadas ABC.<sup>40</sup>

Las proteínas transportadores ABC como grupo, utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para bombear activamente innumerables solutos (lípidos, sales biliares, compuestos tóxicos, péptidos) contra gradientes electroquímicos.

La expresión del gen CFTR es variable y específica según el tipo celular, la fisiopatología de la fibrosis quística aparece limitada a órganos de línea epitelial y en tejidos como el de las vías aéreas, aparece limitada a determinados tipo celulares.

Los intrones del gen CFTR contienen información que permite el *splicing* alternativo del ARN, lo que puede provocar una disminución de la cantidad de proteína normal expresada.<sup>41</sup>

La caracterización de la región promotora del gen, reveló un alto contenido de GC y la ausencia de TATA Box, que son características de genes de bajo nivel de expresión (*housekeeping gene*) en todos o casi todos los tejidos.<sup>42</sup>

Los modelos matemáticos basados en secuencias proteicas que se utilizan para estimar la estructura y función de una proteína de membrana sugieren la siguiente conformación para la proteína CFTR (Figura 1.1.):

- Dos grupos de seis dominios transmembrana, TMD1 y TMD2, separados por una región citosólica ubicada entre el TMD 6 y el 7, que contribuyen a la formación del canal de cloruros.

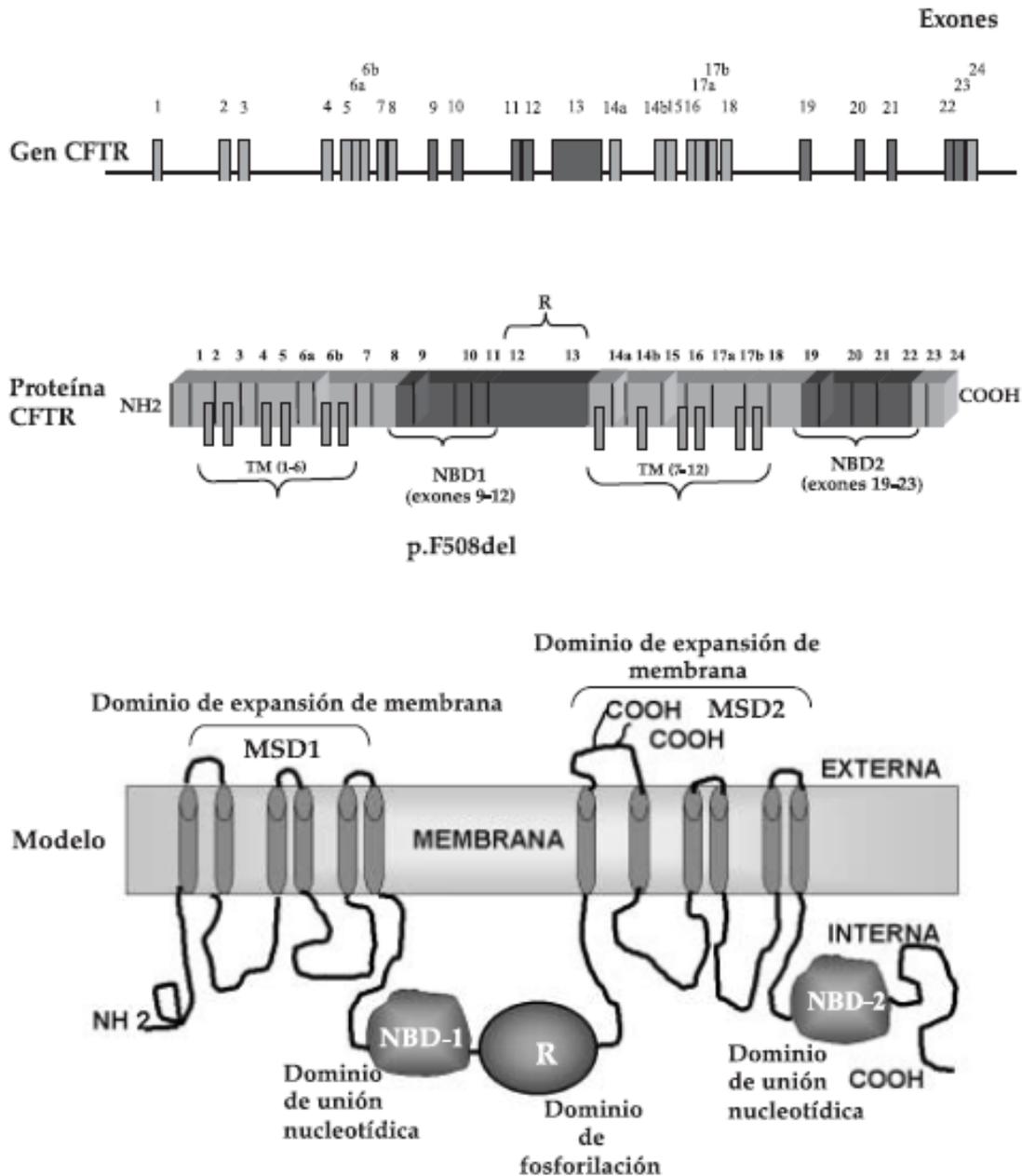
- Dos dominios de unión a nucleótidos, NBD1 y NBD2, separados por una región bastante larga y supuestamente globular (dominio regular R), que controlan la actividad del canal a través de nucleótidos citosólicos.
- Un dominio regulatorio R, que también controla la actividad del canal a través de su fosforilación por medio de proteína quinasa A (PKA) dependiente de AMP cíclico, lo cual es requerido para la apertura del mismo.

Existen dos lugares, situados en un bucle extracelular entre los TMD 7 y 8, donde se produce la glicosilación; este proceso tiene lugar sólo si la proteína está madura (traducida por completo). La forma madura, completamente glicosilada, tiene un peso molecular de 150 kD; la forma inmadura sin sus azúcares tiene un peso molecular de aproximadamente sólo 130 kD.<sup>2</sup>

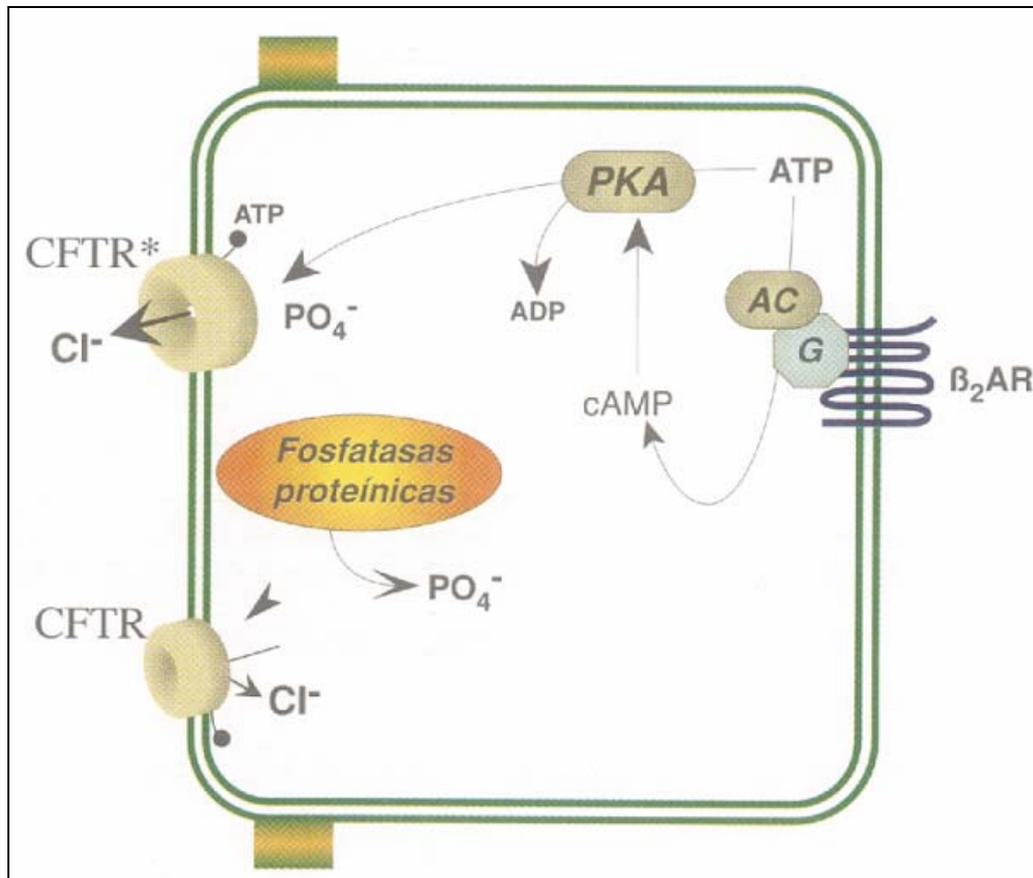
Un defecto celular fundamental de la fibrosis quística es la incapacidad de las glándulas sudoríparas para responder al estímulo de los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos. La unión de ligandos agonistas  $\beta$ ) al receptor  $\beta$ -adrenérgico, actúa por medio de una proteína G trimérica Gas para activar la adenilciclase (AC), que es la encargada de convertir el ATP en AMPc. El AMPc activa las subunidades catalíticas de PKA que fosforila al CFTR.<sup>43,44</sup>

Una vez fosforilado, se requiere la unión y la hidrólisis intracelular del ATP, de uno o de los dos NBDs para la activación. El canal se abre y el movimiento de cloruros tanto en una dirección como en la otra es regulado por su gradiente electroquímico, sin que se requiera energía adicional. Cuando disminuye la actividad de la PKA, las fosfatasas proteínicas endógenas desfosforilan y desactivan el CFTR, y éste retorna a su estado de impermeabilidad a los iones cloruros. La función de la proteína CFTR no es solamente la de un canal de cloruro regulado por AMPc, sino que regula otros canales iónicos.<sup>45</sup> (Figura 1.2.)

Se sabe que el CFTR permite el paso de los iones cloruros a través de la membrana celular de muchas de las células epiteliales secretoras y absorbentes, pero no de todas. Su expresión es más profunda y constante en los denominados tejidos epiteliales exócrinos.<sup>46,47</sup>



**FIGURA 1.1.** Gen CFTR y su síntesis proteica. Esta proteína presenta 5 dominios, 2 dominios de expansión de membrana (MSD 1 y 2), cada uno con 6 segmentos transmembrana (TM 1-12) que forman el poro del canal; 2 dominios de unión al ATP (NBDs) y 1 dominio regulatorio de fosforilación (R) dependiente de AMPc.<sup>21</sup>



**FIGURA 1.2.** Modelo clásico de la activación del CFTR dependiente de PKA/ATP. Un ligando agonista  $\beta$  se une a un receptor  $\beta$ -adrenérgico en la membrana basolateral que se acopla a una proteína G, la cual controla la adenilciclasa, que activada transforma el ATP en AMPc y activa la proteína quinasa A, que a su vez fosforila el CFTR; si el ATP está disponible para unirse al CFTR fosforilado, éste se activa y se abre para el transporte de iones cloruros. Cuando disminuye la actividad de la PKA las fosfatasas proteínicas endógenas desfosforilan y desactivan el CFTR.<sup>2</sup>

### 1.1.4 Espectro de mutaciones del Gen CFTR

En la actualidad se han identificado más de 1600 mutaciones en el gen CFTR.<sup>39</sup> La deleción de la fenilalanina en la posición 508 de la glicoproteína (F508del, sigla anterior  $\Delta$ F508) es la mutación más común a nivel mundial en alrededor del 66%.<sup>48</sup> Sin embargo las mutaciones comunes (F508del, G542X, G551D, N1303K, W1282X), presentan frecuencias diferentes entre distintos grupos étnicos y localizaciones geográficas. (Ver tabla 1.1.)

La gran mayoría de estos alelos mutantes son sustituciones de un solo par de bases o microinserciones / deleciones.

En la Base de Datos de las Mutaciones de la Fibrosis Quística se registran las siguientes frecuencias: las mutaciones que provocan el cambio de un aminoácido por otro (*missense*) representan un 40.65% de las mutaciones asociadas a la enfermedad; un 8.57% las que provocan un codón de terminación prematuro (*nonsense*); las inserciones o deleciones que causan un cambio en el marco de lectura (*frameshift*) un 16.12% y aquellas que alteran nucleótidos conservados en sitios de unión intrón-exón y afectan el procesamiento del pre-ARNm (*splicing*) un 11.94%.<sup>39</sup> (Ver tabla 1.2.)

Existen 2.59% de reordenamientos genómicos (grandes deleciones o inserciones), y otro 0.8 % que afecta la zona promotora. Un 14% de cambios neutros denominados polimorfismos no ocasionan enfermedad.<sup>19,39</sup>

Las mutaciones del gen CFTR no identificadas podrían estar en intrones o en regiones regulatorias, o corresponden a reordenamientos genómicos como las grandes deleciones.<sup>38</sup>

#### Reordenamientos genómicos

Los reordenamientos de nuestro genoma se hacen responsables de los rasgos heredados y de los esporádicos e introducen variaciones en nuestro genoma como mecanismo de selección natural y, como tal, desempeñan una función evolutiva.

Los reordenamientos genómicos pueden causar enfermedades Mendelianas, producen rasgos complejos o representan cambios polimórficos benignos. Los mecanismos por los cuales los reordenamientos transmiten fenotipos son diversos e incluyen la dosis génica, la interrupción del gen, la generación de un gen de fusión, los efectos de posición, el desenmascaramiento de las regiones codificantes de las

mutaciones recesivas (polimorfismos de un solo nucleótido SNP, en el ADN codificante) u otros SNPs funcionales, y tal vez por los efectos de transversión.<sup>49</sup>

La identificación precisa de los puntos de interrupción permite el diseño de cebadores para PCR convencional, un método más fácil y barato que se puede utilizar en la búsqueda de reordenamientos del gen CFTR.<sup>26</sup>

La detección de reordenamientos genómicos del gen CFTR debe ser considerada en las poblaciones en las cuales la proporción de mutaciones puntuales es particularmente baja. Se sugiere también en los pacientes portadores de mutaciones sin sentido cuya severidad es cuestionable en lo que respecta a las propiedades bioquímicas de los aminoácidos y la conservación de la secuencia de la proteína CFTR entre las especies, y en comparación con otras proteínas ABC.<sup>50</sup>

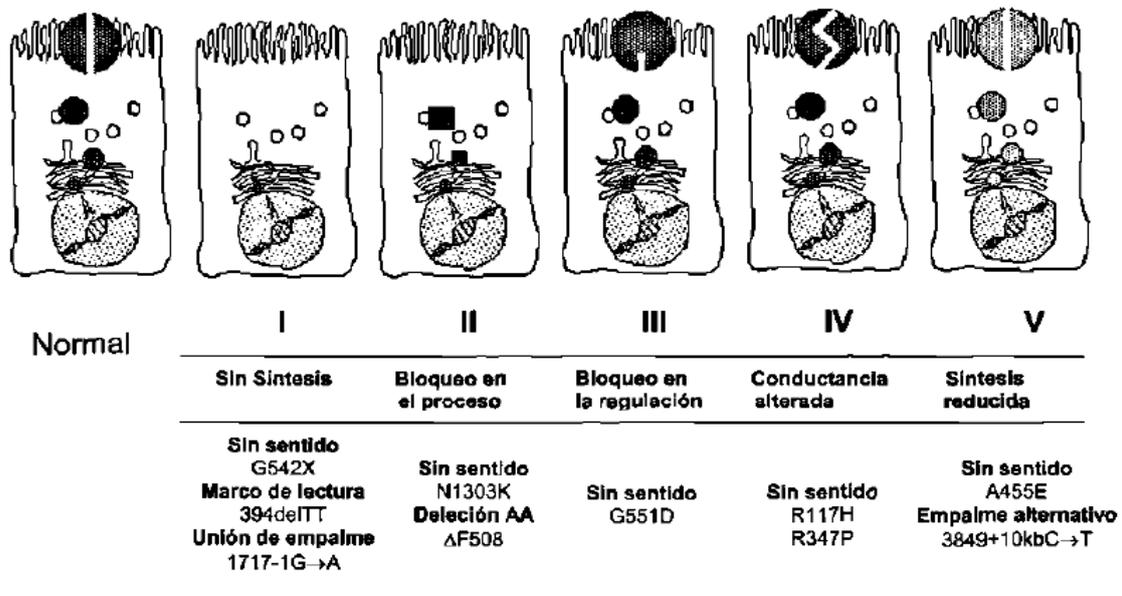
Debe ser considerada la detección de reordenamientos del gen CFTR en pacientes con una enfermedad relacionada al gen CFTR y que portan una mutación leve, ya que pueden tener una mutación grave de FQ en *trans*.<sup>26</sup>

### **Clasificación funcional de las mutaciones del gen CFTR**

De acuerdo al criterio funcional, las mutaciones en el gen CFTR asociadas a la fibrosis quística pueden ser divididas en cinco clases<sup>51</sup>:

- Clase I: incluye aquellas mutaciones que provocan una producción defectuosa de proteína, como las mutaciones que determinan señales prematuras de terminación, mutaciones sin sentido y aquellas que involucran un cambio de marco de lectura. En estos casos el ARNm es degradado rápidamente. Pertenecen a este grupo: G542X, W1282X.
- Clase II: comprende a las mutaciones que presentan un procesamiento defectuoso de la proteína, lo que impide su correcta localización en la membrana celular. Existen fallas en la maduración de la proteína, no se glicosila completamente siendo degradada en el retículo endoplásmico, sin ser detectada en la superficie celular. Ejemplos: F508del y la N1303K.

- Clase III: mutaciones que generan una regulación defectuosa del CFTR como canal de cloruros. La proteína mutada está presente en la membrana celular, pero debido a mutaciones en los sitios de unión a nucleótidos pierde totalmente su funcionalidad, es el caso de la G551D, o la conserva parcialmente, como en la G551S. Esto ocurre por la regulación de la apertura del CFTR a través de la interacción directa de estos dominios con el ATP intracelular.
- Clase IV: estas mutaciones afectan la conductividad a través del canal. Muchas de estas mutaciones involucran residuos con carga eléctrica, en general, arginina, en los dominios transmembrana. Estas mutaciones presentan una actividad residual de la conductividad del cloruro y frecuentemente se asocian a la preservación de la función exócrina del páncreas. Ejemplos: R117H, R334W, R347P.
- Clase V: estas mutaciones destruyen o crean sitios consenso de *splicing*. Se expresa una proteína normal como en el caso de 621+1G→T o una reducción parcial de la expresión como en la mutación 3849+10Kb.C→T.



**FIGURA 1.3.** Consecuencias moleculares de las diferentes clases de mutaciones del gen CFTR<sup>51</sup>

**TABLA 1.1.** Mutaciones más comunes del gen CFTR en el mundo.

Mutación	Frecuencia	(%)	Localización	Población con la más alta prevalencia
F508del ( $\Delta$ F508)	28,948	(66.0)	Exón 10	
G542X	1,062	(2.4)	Exón 11	Española
G551D	717	(1.6)	Exón 11	Inglesa
N1303K	589	(1.3)	Exón 21	Italiana
W1282X	536	(1.2)	Exón 20	Judía-asquenazi
R553X	322	(0.7)	Exón 11	Alemana
621+1G->T	315	(0.7)	Exón 4	Francesa-canadiense
1717-1G->A	284	(0.6)	Intrón 10	Italiana
R117H	133	(0.3)	Exón 4	
R1162X	125	(0.3)	Exón 19	Italiana
R347P	106	(0.2)	Exón 7	
3849+10kbC->T	104	(0.2)	Exón 19	Judía-asquenazi, hispánica
Ile507del	93	(0.2)	Exón 10	
394delTT	78	10-30%*	Exón 3	Nórdico-finlandés
G85E	67		Exón 3	
R560T	67		Exón 11	
A455E	62		Exón 9	Holandesa
1078delT	57		Exón 7	Celtas
2789+5G->A	54		Intrón 14b	Española
3659delC	54		Exón 19	
R334W	53		Exón 7	
1898+1G->T	53		Exón 12	
711+1G->T	49		Intrón 5	Francesa-canadiense
2183AA->G	40		Intrón 8	Italiana
3905insT	38	6-17%*	Exón 20	Suiza; amish; acadia
S549N	30		Exón 11	
2184delA	29		Exón 13	
Q359K/T360K		87.5%*	Exón 7	Judía-georgiano
M1101K		69%*	Exón 17b	Huterita
Y122X		48%*	Exón 4	Francesa, Reino Unido
1898+5G->T		30%	Intrón 12	China, taiwanés
3120+1G->A		11%	Intrón 16	Africana-americana
I148T		9.1%	Exón 4	Francesa-canadiense

Los datos fueron obtenidos del Consorcio de Análisis Genético CF (1994). La frecuencia se basa en la proyección de 43849 alelos FQ, aunque no todos ellos han sido probados para las mutaciones indicadas. Las mutaciones se encuentran en pacientes de origen caucásico, salvo indicación contraria. La ubicación geográfica (o grupo étnico), con la prevalencia más alta es indicada para algunas de las mutaciones. Una frecuencia relativa aproximada (expresado en %, \*) se da para las mutaciones estudiadas en muestras relativamente pequeñas o en las poblaciones indicadas.<sup>39</sup>

**TABLA 1.2.** Nomenclatura estándar y coloquial para las mutaciones del gen CFTR y variantes.

Cambio de secuencia del ADN	Cambio de aminoácido (código de tres letras)	Nomenclatura coloquial Comúnmente utilizada	Sitio de mutación (número de exón/intrón)	Tipo de mutación
c.254G>A	p.Gly85Glu	G85E	Exón 3	Cambio de un aminoácido por otro (missense)
c.350G>A	p.Arg117His	R117H	Exón 4	Cambio de un aminoácido por otro (missense)
c.443T>C	p.Ile148Thr	I148T	Exón 4	Cambio de un aminoácido por otro (missense)
c.489+1G>T (AJ574942.1:g.240G>T)		621+1G>T	Intrón 4	Afecta el procesamiento del pre-ARNm (splicing)
c.579+1G>T (AJ574943.1:g.261G>T)		711+1G>T	Intrón 5	Afecta el procesamiento del pre-ARNm (splicing)
c.948delT	p.Phe316Leufs X12	1078delT	Exón 7 (no 8)	Inserción o deleción que cambian el marco de lectura (frameshift)
c.1000C>T	p.Arg334Trp	R334W	Exón 7 (no 8)	Cambio de un aminoácido por otro (missense)
c.1040G>C	p.Arg347Pro	R347P	Exón 7 (no 8)	Cambio de un aminoácido por otro (missense)
c.1210-12T(5_9) (AJ574948.1:g.152T(5_9))		5T/7T/9T polimorfismo	Intrón 8 (no 9)	Afecta el procesamiento del pre-ARNm (splicing)
c.1210-12[5] (AJ574948.1:g.152T[5])		5T		
c.1210-12[9] (AJ574948.1:g.152T[9])		9T		
c.1364C>A	p.Ala455Glu	A455E	Exón 9 (no 10)	Cambio de un aminoácido por otro (missense)
c.1519_1521delATC	p.Ile507del	Delta I507	Exón 10 (no 11)	Deleción que cambia el marco de lectura (in-frame deletion)
c.1521_1523delCTT	p.Phe508del	Delta F508	Exón 10 (no 11)	Deleción que cambia el marco de lectura (in-frame deletion)
c.1585-1G>T (AJ574980.1:g.116G>A)		1717-1G>T	Intrón 10 (no 11)	Afecta el procesamiento del pre-ARNm (splicing)
c.1624G>T	p.Gly542X	G542X	Exón 11 (no 12)	Provocan un codón de terminación prematuro (Nonsense)

c.1652G>A	p.Gly551Asp	G551D	Exón 11 (no 12)	Cambio de un aminoácido por otro (missense)
c.1657C>T	p.Arg553X	R553X	Exón 11 (no 12)	Provocan un codón de terminación prematuro (Nonsense)
c.1679G>C	p.Arg560Thr	R560T	Exón 11 (no 12)	Cambio de un aminoácido por otro (missense)
c.1766+1G>A (AJ574983.1:g.179G>A)		1898+1G>A	Intrón 12 (no 13)	Afecta el procesamiento del pre-ARNm (splicing)
c.2052delA	p.Lys684AsnfsX38	2184delA	Exón 13 (no 14)	Inserción o deleción que cambian el marco de lectura (frameshift)
c.2657+5G>A (AJ574995.1:g.216G>A)		2789+5G>A	Intrón 14b (no 16)	Afecta el procesamiento del pre-ARNm (splicing)
c.2988+1G>T (AJ575003.1:g.305G>T)		3120+1G>T	Intrón 16 (no 18)	Afecta el procesamiento del pre-ARNm (splicing)
c.3437delC	p.Ala1146ValfsX2	3569delC	Exón 18 (no 21)	Inserción o deleción que cambian el marco de lectura (frameshift)
c.3484C>T	p.Arg1162X	R1162X	Exón 19 (no 22)	Provocan un codón de terminación prematuro (Nonsense)
c.3718-2477C>T (AY848832.1:g.40725C>T)		3849+10Kb C>T	Intrón 19 (no 22)	Otra
c.3846G>A	p.Trp1282X	W1282X	Exón 20 (no 23)	Provocan un codón de terminación prematuro (Nonsense)
c.3909C>G	p.Asn1303Lys	N1303K	Exón 21 (no 24)	Cambio de un aminoácido por otro (missense)

La numeración de nucleótidos se basa en la secuencia de ADN de referencia NM\_000492.3. Se debe tener en cuenta que el número de versión de esta secuencia de referencia puede ser actualizada con frecuencia.<sup>52</sup>

### 1.1.5 Correlación genotipo-fenotipo

Ha sido de gran interés para los investigadores el estudio de la relación entre el tipo de mutación presente (genotipo) y la expresión clínica (fenotipo).

Aunque es imposible establecer una correlación absoluta del fenotipo con un genotipo específico, parece existir una correlación razonable entre el porcentaje de función normal del CFTR y la manifestación de enfermedad en varios órganos. Esta información puede ser útil en la evaluación de un paciente con síntomas sugerentes de fibrosis quística pero con pruebas de sudor negativas.<sup>53</sup>

La heterogeneidad clínica de la fibrosis quística debe generarse a partir de la heterogeneidad alélica, efectos de otros loci modificadores o factores no genéticos.

Los pacientes homocigotos o heterocigotos compuestos por dos mutaciones severas (Clases I, II o III), como F508del y Ile507del manifiestan insuficiencia pancreática, mientras se espera que un 20% de pacientes con fenotipo pancreático suficiente porten una mutación benigna en uno de sus alelos (Clases IV o V).<sup>1,51</sup>

En el extremo terminal del intrón 8 del gen CFTR existe una cadena de timidinas denominadas locus Tn de características muy variables, se pueden encontrar 3 alelos diferentes dependiendo del número de timidinas presentes (5, 7 y 9). El número de timidinas determina la eficacia con la que el sitio aceptor del procesamiento del intrón 8 es utilizado, a medida que la cadena de timidinas residual es más corta la eficacia disminuye.<sup>54</sup>

Además del locus polimórfico Tn, el gen CFTR presenta más de 120 polimorfismos, la combinación de alelos particulares en varios loci polimórficos pueden resultar en una proteína CFTR menos funcional o insuficiente.<sup>39</sup>

El espectro clínico de la fibrosis quística es altamente variable, desde el cuadro clásico con insuficiencia pancreática y afectación pulmonar temprana hasta formas leves, que podrían afectar a un solo órgano o evidenciarse en la edad adulta.<sup>3</sup> La enfermedad pulmonar parece ser influenciada por factores genéticos y medio ambientales, así como la exposición a agentes patógenos respiratorios y al tratamiento aplicado. La insuficiencia pancreática exócrina y los trastornos gastrointestinales son

vinculados directamente con la mutación presente, el íleo meconial parecería estar regido por genes modificadores ubicados en el cromosoma 19.<sup>2</sup>

### **Mutaciones severas**

Las mutaciones asociadas con la pérdida completa de la función del CFTR resultan en una expresión fenotípica clásica de la fibrosis quística, denominándolas mutaciones severas, son ejemplos: F508del, G542X, G551D, R553X, N1303K, W1282X, 621+1G→A y 1717-1G→A.<sup>51</sup>

Los pacientes que presentan dos mutaciones severas en su genotipo manifestarán tempranamente insuficiencia pancreática exócrina. De ellos, aproximadamente el 10 al 15% tendrán íleo meconial y el 95% de los varones presentan ausencia bilateral congénita de conductos deferentes.<sup>2</sup>

El grado de afectación pulmonar es variable e influenciado por el grado de certeza en la terapia y en la administración de fármacos aplicada, así como también factores medioambientales y familiares.

### **Mutaciones medias o leves**

El diagnóstico es más tardío, debido a que se produce un bajo nivel de proteína normal como resultado de un *splicing* alternativo. Se preserva una actividad parcial del canal de cloruro, la insuficiencia pancreática es moderada y casi nunca presentan íleo meconial.

Las mutaciones R117H, A455E, 3849+10Kb.C→T, R334W, R347P, 2789+5G→A, cuando forman complejos heterocigotos con mutaciones severas, manifiestan expresión moderada con preservación de la función pancreática y valores límites de prueba de sudor.<sup>55</sup>

### **Mutaciones de *splicing* y *splicing* alternativo**

Estas mutaciones afectan al transcrito primario o a la síntesis de la proteína. Se asocian a un fenotipo medio, los órganos se ven afectados en diferente grado, lo que evidencia los niveles de *splicing* alternativos en los distintos tejidos.

El cambio de un aminoácido por otro puede ocasionar enfermedad o tratarse de polimorfismos.

El gen CFTR presenta *splicing* alternativos, denominados IVS8 o alelos T, son una serie de 5, 7 o 9 timidinas en el intrón 8. Los alelos 7T y 9T están asociadas con un

*splicing* eficiente del exón 9, mientras que en la mayoría de los transcritos que posean la variante 5T el ARNm carecerá de la secuencia del exón 9, la proteína transcrita no madura y no es funcional.<sup>54</sup>

El alelo 5T afectaría diferencialmente a los distintos órganos y se considera un polimorfismo en la población normal, mientras en pacientes con el fenotipo “CBAVD” (ausencia congénita bilateral de conductos deferentes) es una mutación leve, la más común de este grupo. Si la mutación R117H alberga el alelo 5T se afectará la gravedad del fenotipo.<sup>56</sup>

### 1.1.6 Incidencia y distribución geográfica

La fibrosis quística es considerada la enfermedad autosómica recesiva más grave y frecuente en la población de raza blanca<sup>1</sup>.

Esta enfermedad varía entre las etnias y su distribución geográfica es variable también.

En poblaciones derivadas de Europa se estima que 1 en 2000-3000 recién nacidos presentarán la enfermedad,<sup>57</sup> y que aproximadamente 1 en 25 individuos serán portadores heterocigotos con marcadas variaciones regionales.<sup>50</sup> Países como España, Portugal, Italia, Grecia comparten la incidencia de esta enfermedad con la región norte y central de Europa. Es mucho menor su incidencia en poblaciones de raza mongólica, negra y asiática<sup>48</sup>.

En los países en vías de desarrollo, se desconoce con exactitud la incidencia de la fibrosis quística debido a la elevada mortalidad y la consiguiente falta de diagnóstico.

La mutación F508del es la más común a nivel mundial (66%),<sup>48</sup> sin embargo ciertas mutaciones pueden alcanzar frecuencias diferentes en poblaciones particulares como la mutación M1101K en huteritas<sup>58</sup>, la G551D en celtas<sup>59</sup>, W1282X en judíos asquenazi<sup>60</sup>, CFTRdele2,3(21Kb) en polacos, rusos y rumanos.<sup>61</sup>

Datos provenientes de programas de detección de errores congénitos implementados en distintos lugares de Argentina, estiman su incidencia en 1:6100 recién nacidos, la prevalencia de portadores sanos de la mutación es de aproximadamente 1:40.<sup>3</sup>

Estudios realizados en la provincia de Buenos Aires, indican que la incidencia de las mutaciones más comunes del gen CFTR es similar a las publicadas en las poblaciones del sur de Europa y marcadamente diferentes de otros países Latinoamericanos.<sup>13,14</sup>

En la provincia de Buenos Aires, los primeros estudios de pesquisa neonatal con tripsina inmunorreactiva elevada mostraron una incidencia de 1/5691.<sup>4</sup>

Del análisis estadístico de 199 muestras estudiadas en el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría “Sup. Sor María Ludovica” de La Plata, (Centro Provincial de Fibrosis Quística), se determinó

que la incidencia de las principales mutaciones analizadas fue semejante a la población del sur de Europa. El 56.5% de los alelos presentaron F508del, G542X 6.03%, R334W 2.26%, G85E 1.51%, N1303K 1.25%, W1282X 1.00%, alelo 5T 1.00%, Ile507del 0.75%, 3849+10Kb C→T 0.75%, R1162X 0.50%, R553X 0.25%. Este análisis directo de las mutaciones permitió la detección de 286/398 alelos FQ (71,9%). Por ASO reversa fueron detectadas: 2789+5G>A, 3272-26A>G, 394delTT, 1717-1G>A y 3659delC. Se concluyó la necesidad de investigar otras mutaciones que permitirán establecer una correlación con la clínica y futuras estrategias terapéuticas sustentadas.<sup>20</sup>

### 1.1.7 Fisiopatología

El gen CFTR posee acción pleiotrópica, que es la capacidad de provocar manifestaciones aparentemente no relacionadas en varios tejidos y órganos, así se evidenciarán manifestaciones pulmonares, digestivas, anomalías del sudor y la ausencia casi constante del conducto deferente (varones afectados). Las manifestaciones digestivas, principalmente pancreáticas, se deben a que las secreciones poco hidratadas de los acinos no son adecuadamente vehiculizadas por los conductos, se estancan y los dilatan, esto conduce a la producción de cavidades con secreción, que por compresión van provocando la atrofia del tejido secretor. Las manifestaciones pulmonares son provocadas por la acumulación de moco espeso y la posterior colonización de gérmenes.<sup>62</sup>

#### 1.1.7.1 Enfermedad del aparato respiratorio

Las mutaciones en el gen CFTR provocan deficiencia, ausencia o alteración de la proteína reguladora de la conductancia de transmembrana de la fibrosis quística, la secreción de ión cloruro disminuye e incrementa la reabsorción celular de sodio. El trastorno en la secreción celular de ión cloruro produce secreciones respiratorias deshidratadas, viscosas, de volumen excesivo y la depuración mucociliar es alterada.<sup>2</sup>

La infección de las vías aéreas en los pacientes fibroquísticos con microorganismos característicos, especialmente *Pseudomonas aeruginosa* induce un proceso inflamatorio persistente y no controlado, produciendo un círculo vicioso que conduce a la triada característica de la enfermedad: inflamación, infección y obstrucción. El daño pulmonar es irreversible con bronquiectasias, insuficiencia respiratoria y muerte.<sup>2</sup> (Ver figura 1.4.)

La infección pulmonar en la FQ es producida por bacterias circunscriptas a una localización bronquial intraluminal, la infección alveolar ocurre raramente, en general hacia el final de la enfermedad.

En la fase inicial de la enfermedad, el principal patógeno aislado es *Staphylococcus aureus* o *Haemophilus spp* y posteriormente *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>63,64</sup> Una vez producida la infección crónica por *Pseudomonas aeruginosa*, es casi imposible su erradicación a pesar del uso agresivo de antibióticos sistemáticos o inhalados. La colonización temprana por este microorganismo se asocia con una peor función pulmonar y mortalidad precoz.<sup>65</sup>

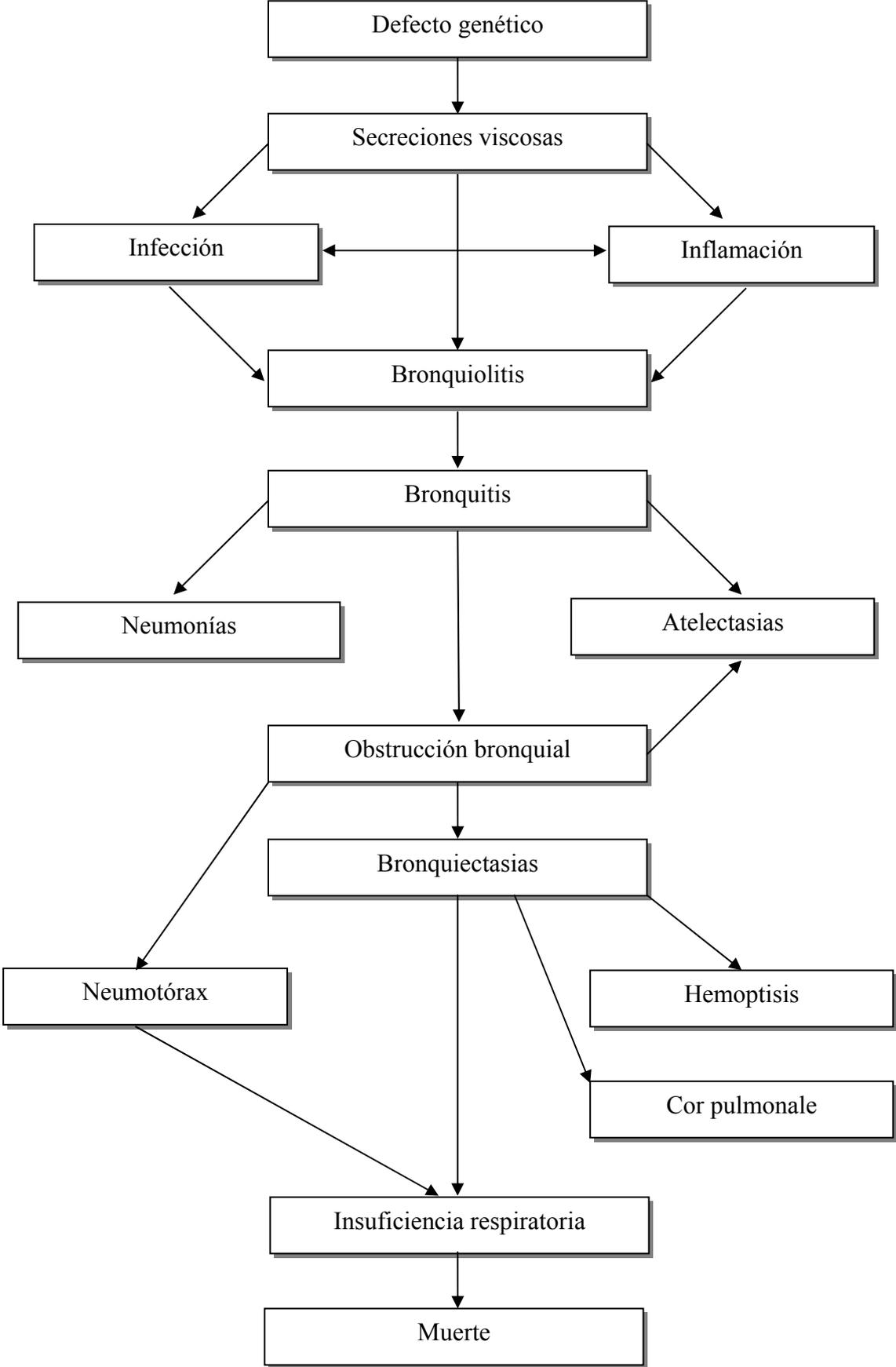


Figura 1.4. Fisiopatología y complicaciones de la enfermedad pulmonar.<sup>2</sup>

### 1.1.7.2 Manifestaciones gastrointestinales, hepáticas y nutricionales

El CFTR se localiza en la superficie apical de las células de las vellosidades intestinales y de las criptas, las mutaciones en el gen CFTR determinan una alteración en la secreción de cloruro y bicarbonato por las células epiteliales y, en consecuencia, una disminución del contenido de fluidos en el lumen intestinal. (Ver tabla 1.3.)

La insuficiencia pancreática exocrina está presente en alrededor del 90% de los pacientes con fibrosis quística<sup>66</sup>. La enfermedad del páncreas se cree que resulta de la reducción del volumen de la secreción pancreática con bajas concentraciones de  $\text{HCO}_3^-$ .<sup>67</sup>

Sin suficiente líquido y sin  $\text{HCO}_3^-$  que neutralice el contenido gástrico ácido que entra al intestino delgado, las proenzimas digestivas son retenidas en los conductos pancreáticos y se activan prematuramente, en última instancia esto conduce a la destrucción tisular y la fibrosis. La malabsorción aguda o crónica resultante contribuye al incumplimiento de los requerimientos energéticos, causado por el estado hipermetabólico asociado con la infección endobronquial.<sup>68</sup>

Estos factores pueden exacerbar la infección en los pulmones, dando lugar a un círculo vicioso de malnutrición e infección. El estado nutricional es un fuerte determinante en el pronóstico y la supervivencia.<sup>69</sup>

El ileo meconial es la manifestación más temprana de la fibrosis quística, ocurre en el 15-20% de los pacientes portadores de dos mutaciones severas.<sup>69</sup>

El CFTR se expresa en las células de las vías biliares, y por lo menos un tercio de los pacientes tienen resultados anormales de las pruebas de función hepática. En un 30% de los pacientes con fibrosis quística, la vesícula biliar, presenta disminución de tamaño y funcionamiento. Los cálculos biliares están presentes en un 10% de los pacientes FQ.<sup>70,71</sup>

En los pacientes FQ que presentan enfermedad hepática, se aumenta la malabsorción de vitaminas liposolubles por la deficiencia de sales biliares.

**Tabla 1.3.** Manifestaciones gastrointestinales, hepáticas y nutricionales de la fibrosis quística.<sup>53</sup>

<p><b>Sistémicas</b>  Fallo de crecimiento  Malnutrición / kwashiorkor  Deficiencias de micronutrientes</p>
<p><b>Esófago</b>  Reflujo gastroesofágico  Esofagitis  Várices esofágicas</p>
<p><b>Páncreas</b>  Insuficiencia pancreática  Pancreatitis</p>
<p><b>Hepatobiliares</b>  Extrahepáticas  Microvesículas  Dilatación vesicular  Colelitiasis  Estenosis del conducto biliar común  Colangiocarcinoma  Colangitis esclerosante</p> <p><b>Intrahepáticas</b>  Colestasis neonatal  Esteatosis  Cirrosis biliar focal  Cirrosis multilobular</p>
<p><b>Intestino</b>  Íleo meconial  Síndrome de obstrucción intestinal distal  Constipación  Prolapso rectal  Colonopatía fibrosante</p>

### **1.1.7.3 Otras manifestaciones**

#### **Aparato reproductor**

El 98% de los hombres con fibrosis quística son infértiles, con azoospermia obstructiva o ausencia de conductos deferentes y dilatación o ausencia de las vesículas seminales.<sup>72</sup> Aún las variantes más benignas de la fibrosis quística se asocian con ausencia del conducto deferente y la consiguiente esterilidad se atribuye a una secreción anormal del conducto de Wolf que determina su oclusión.<sup>62</sup>

La función sexual y la espermatogénesis son normales. La función reproductiva femenina es normal, aunque el moco cervical puede estar deshidratado, lo que podría ocasionar infertilidad.<sup>73</sup>

#### **Diabetes**

En la fibrosis quística son frecuentes las anormalidades del metabolismo glucídico, que van desde una leve intolerancia a la glucosa, con hiperglucemia posprandial variable, o una hiperglucemia transitoria en ayunas, hasta diabetes crónica con hiperglucemia en ayunas.<sup>74,75</sup>

La diabetes en pacientes con fibrosis quística comparte características de los desórdenes tipo 1 y 2 y, en la mayoría de los pacientes, existe una combinación de reducción y retraso de la secreción de insulina con insulino resistencia.<sup>76,77</sup>

#### **Enfermedad ósea**

Los pacientes fibroquísticos presentan mineralización ósea anormal.<sup>78</sup> La masa mineral ósea en los pacientes FQ se ve disminuida por deficiencia de nutrientes específicos como la vitamina K, magnesio, zinc y otros que debido a sus características liposolubles no son absorbidos como sucede con la vitamina D y el calcio.

La osteoporosis es una enfermedad esquelética sistémica, caracterizada por una masa ósea disminuida y un deterioro de la microarquitectura del tejido óseo, que determina una mayor fragilidad ósea y riesgo de fracturas. La consecuencia más crítica de la osteoporosis es la fractura no traumática de las vértebras, que puede afectar a la función pulmonar, alterar la mecánica respiratoria y la talla del paciente.<sup>79</sup>

## Manifestaciones osteoarticulares

### Artritis episódica (AE)

Se caracteriza por episodios de inflamación aguda (artritis recurrente), muy dolorosos, que puede afectar a una o a múltiples articulaciones.<sup>80</sup>

El compromiso articular, generalmente asimétrico, afecta en orden de frecuencia a rodillas, tobillos, carpos, codos, hombros y más raramente, a las pequeñas articulaciones de las manos, cadera y columna.<sup>81</sup>

Se sugiere que la AE sería desencadenada por mecanismos inmunológicos, la estimulación antigénica en respuesta a infecciones crónicas provocaría el daño tisular.<sup>82,83</sup>

### Osteoartropatía hipertrófica pulmonar (OAHP)

Es un síndrome poco frecuente que se caracteriza por la asociación de “dedo en palillo de tambor”, dolor óseo simétrico y crónico de los huesos largos, artritis y signos de periostitis proliferativa, en las extremidades distales de los huesos largos.

El comienzo de la afección suele ser tardío, predomina en varones adultos jóvenes y se la encuentra relacionada con enfermedad pulmonar severa y significativa mortalidad.<sup>84,85</sup>



**Figura 1.5.** Osteoartropatía hipertrófica pulmonar. Dedos en “palillo de tambor”.

---

### **Otras formas de compromiso articular asociadas con la fibrosis quística**

La artritis reumatoidea y la artritis reumatoidea juvenil han sido descritas en muy pocos pacientes FQ. Éstos presentaron poliartritis crónica simétrica con compromiso de pequeñas articulaciones, factor reumatoideo positivo y erosiones articulares.<sup>86</sup>

### **Manifestaciones cutáneas**

Se han descrito tres tipos de alteraciones cutáneas en pacientes FQ: exantema maculopapular, rash purpúrico palpable, eritema nodoso.<sup>87,88</sup>

#### **1.1.8 Diagnóstico**

Casi todos los pacientes FQ presentan enfermedad sinusopulmonar crónica y el 90% tiene insuficiencia pancreática exócrina<sup>1</sup>. En la mayoría de los casos se encuentran una o más expresiones clínicas de la enfermedad, que se confirman con la prueba del sudor (>60 mmol/L).<sup>53</sup> El diagnóstico de la enfermedad se basa en criterios clínicos y estudios de laboratorio. (Ver tablas 1.4. y 1.5.)

Existe sospecha de fibrosis quística ante la presencia de una o más de las siguientes características fenotípicas:

- Enfermedad sinusopulmonar crónica
- Anormalidades gastrointestinales o nutricionales
- Síndrome de pérdida de sal
- Azoospermia
- Hermano/a con FQ
- Pesquisa neonatal positiva

La patología es confirmada por:

- Resultado positivo de la prueba del sudor en al menos dos ocasiones
- O presencia de dos mutaciones del gen CFTR causantes de FQ
- O demostración de diferencia de potencial nasal transepitelial anormal

Basado en el Consenso de Fibrosis Quística, Comité Nacional de Neumonología, Sociedad Argentina de Pediatría, 1999.

**Tabla 1.4.** Signos clínicos de la fibrosis quística

<p><b>Enfermedad respiratoria crónica</b>  Tos productiva crónica  Colonización de las vías respiratorias con patógenos (<i>S aureus</i>,  <i>P aeruginosa mucoide</i>)  Anomalías persistentes en la radiografía de tórax  Obstrucción de las vías respiratorias  Dedos en “palillo de tambor”  Pansinusitis  Pólipos nasales</p>
<p><b>Enfermedad gastrointestinal</b>  Íleo meconial, Síndrome de obstrucción intestinal distal, prolapso  rectal  Insuficiencia pancreática, pancreatitis  Cirrosis biliar  Retraso en el crecimiento, edema con hipoproteinemia, deficiencia  de vitaminas liposolubles</p>
<p><b>Síndrome de pseudo-Bartter’s (pérdida de sal relacionado con  alcalosis metabólica)</b></p>
<p><b>Infertilidad por azoospermia obstructiva</b></p>

En aproximadamente 2% de los pacientes existe un fenotipo “atípico” caracterizado por enfermedad pulmonar crónica, insuficiencia pancreática y concentración de cloruros en sudor normales o con valores límites.<sup>89</sup> Además, existen presentaciones monosintomáticas, con predominio de una manifestación clínica única, por ejemplo anomalías en los electrolitos, pancreatitis, enfermedad hepática, sinusitis o azoospermia obstructiva.

En estos pacientes con fenotipo “atípico”, la demostración de mutaciones FQ en el gen CFTR o la demostración *in vivo* de anomalías en el transporte iónico a través del epitelio nasal, se puede utilizar como ayuda diagnóstica.<sup>90</sup>

Además, para lograr el diagnóstico, es importante realizar una exhaustiva evaluación clínico-radiográfica y de laboratorio, que incluya microbiología del tracto respiratorio, función pancreática exocrina, evaluación de senos paranasales y del tracto genital masculino.

**Tabla 1.5.** Manifestaciones clínicas de la fibrosis quística por grupos etarios.<sup>53</sup>

<p><b>Recién nacido</b>  Íleo meconial  Ictericia prolongada  Tos y taquipnea persistente  Pobre ganancia de peso</p>
<p><b>Lactante</b>  Síndrome de malabsorción, esteatorrea  Fallo de crecimiento  Tos, taquipnea, retracciones intercostales  Bronquiolitis prolongada o recurrente  Atelectasia persistente  Atrapamiento aéreo bilateral persistente  Infección pulmonar recurrente  Síndrome de edemas y anemia  Deshidratación hiponatrémica con alcalosis metabólica  Sabor salado, cristales de sal en la piel  Prolapso rectal</p>
<p><b>Niños</b>  Síndrome de malabsorción, esteatorrea  Fallo de crecimiento  Tos crónica  Sibilancias recurrentes, asma atípica  Infección pulmonar recurrente  Rx de tórax patológicas en forma persistente  Cultivo de secreciones bronquiales positivos para <i>Staphylococcus aureus</i> o <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p>
<p><b>Adolescentes y adultos</b>  Pólipos nasales  Sinusitis crónica  Bronquitis crónica  Azoospermia obstructiva  Menor fertilidad femenina</p>

## Métodos diagnósticos

### Pesquisa neonatal

Los programas modernos de detección se enfocan en dos pasos: la primera prueba, de tripsina inmuno-reactiva en manchas de sangre seca y en segundo lugar, confirmar el resultado por el análisis de ADN en los casos positivos.<sup>91</sup>

Dado que el estado nutricional es vinculado a un mejor pronóstico, se justifica la introducción de un cribado neonatal en toda la población. Los beneficios del diagnóstico precoz podrían ser contrarrestados por la exposición temprana a patógenos

---

característicos de la fibrosis quística en los centros de atención que no hayan implementado las medidas adecuadas de higiene.<sup>92,93</sup>

### **Prueba del sudor**

La determinación cuantitativa de electrolitos en la secreción de sudor se realiza mediante iontoforesis con pilocarpina. El volumen mínimo de sudor aceptable (15 ul para el sistema Wescor Macroduct), o peso (75 mg para el procedimiento de Gibson-Cooke), deberá recolectarse durante un período de 30 minutos, para garantizar una tasa de sudoración promedio de más de 1g/m<sup>2</sup>/min.<sup>94</sup>

La concentración de cloruros mayor de 60 mmol/L es consistente con el diagnóstico de fibrosis quística, pero el resultado deberá ser interpretado en el contexto de la edad y las manifestaciones clínicas por un médico especializado en la enfermedad.<sup>66</sup> El diagnóstico de FQ se concreta sólo si existe elevada concentración de cloruros en dos ocasiones diferentes en un paciente con uno o más signos clínicos del fenotipo FQ o el antecedente de un hermano afectado por la enfermedad.

Valores de concentración de sodio en el sudor de 60 a 80 mmol/L, están relacionados también con otras enfermedades. En los casos con valores límites, se recomienda realizar la cuantificación de sodio y cloruro al mismo tiempo. En los pacientes fibroquísticos, ambos analitos deberán estar proporcionalmente elevados, y la proporción cloruro/sodio es casi siempre mayor a 1.<sup>89</sup>

### **Potencial de membrana**

El epitelio respiratorio regula la composición del fluido que baña la superficie de la vía aérea, transportando sodio y cloro. Este transporte activo genera una diferencia de potencial eléctrico transepitelial que puede medirse *in vivo*.<sup>3,53</sup>

Los pacientes con FQ tienen el epitelio nasal hiperpolarizado debido al aumento de la absorción del sodio a través de una barrera relativamente impermeable al cloruro.

La tensión medida (promedio normal -24.7±0.9 mV; anormal -53±1.8 mV) se correlaciona con el movimiento de sodio a través de la membrana celular, una función fisiológica anormal en pacientes portadores de mutaciones en el gen CFTR.<sup>95</sup>

Las mediciones se repiten después de perfusión de la mucosa con amilorida, que

bloquea el canal epitelial de sodio, provocando una gran caída de la diferencia de potencial, que es mayor en los pacientes con fibrosis quística (73%) que en sujetos normales (53%).<sup>95</sup> Una subsiguiente perfusión con una solución libre de cloruros e isoproterenol, normalmente produce fuertes incrementos en la diferencia de potencial (de unos 30 mV), pero tiene poco efecto cuando la función del CFTR es anormal.<sup>95</sup>

Las mediciones de diferencia de potencial eléctrico transepitelial (nasal) pueden demostrar anomalías en la función del CFTR más fiables que la prueba del sudor.<sup>96</sup>

### **Diagnóstico molecular**

El estudio del gen CFTR representa uno de los análisis genéticos más frecuentes realizado de forma rutinaria en todo el mundo. Estas pruebas se llevan a cabo en diversas situaciones, incluyendo el diagnóstico molecular de la fibrosis quística, el diagnóstico prenatal y la prueba de portador.

En la actualidad se han identificado más de 1600 mutaciones en el gen CFTR,<sup>39</sup> a menudo con variaciones étnicas o geográficas en la frecuencia y que se encuentran tanto en la fibrosis quística como en los fenotipos “atípicos”.

Se requiere de un buen conocimiento de las manifestaciones clínicas y de la patología molecular del gen CFTR al momento de elegir las herramientas, las estrategias y al interpretar los resultados. Las pruebas genéticas se deben efectuar en el contexto de un asesoramiento genético apropiado y los laboratorios deberían trabajar en estrecha colaboración con genetistas clínicos y laboratorios de referencia para garantizar que las pruebas pertinentes se llevan a cabo y que se proporcione la información adecuada a los pacientes. Se enfatiza la necesidad de organización de las redes regionales o nacionales de los laboratorios de diagnóstico molecular.<sup>97</sup>

Indicaciones para realizar estudio molecular:

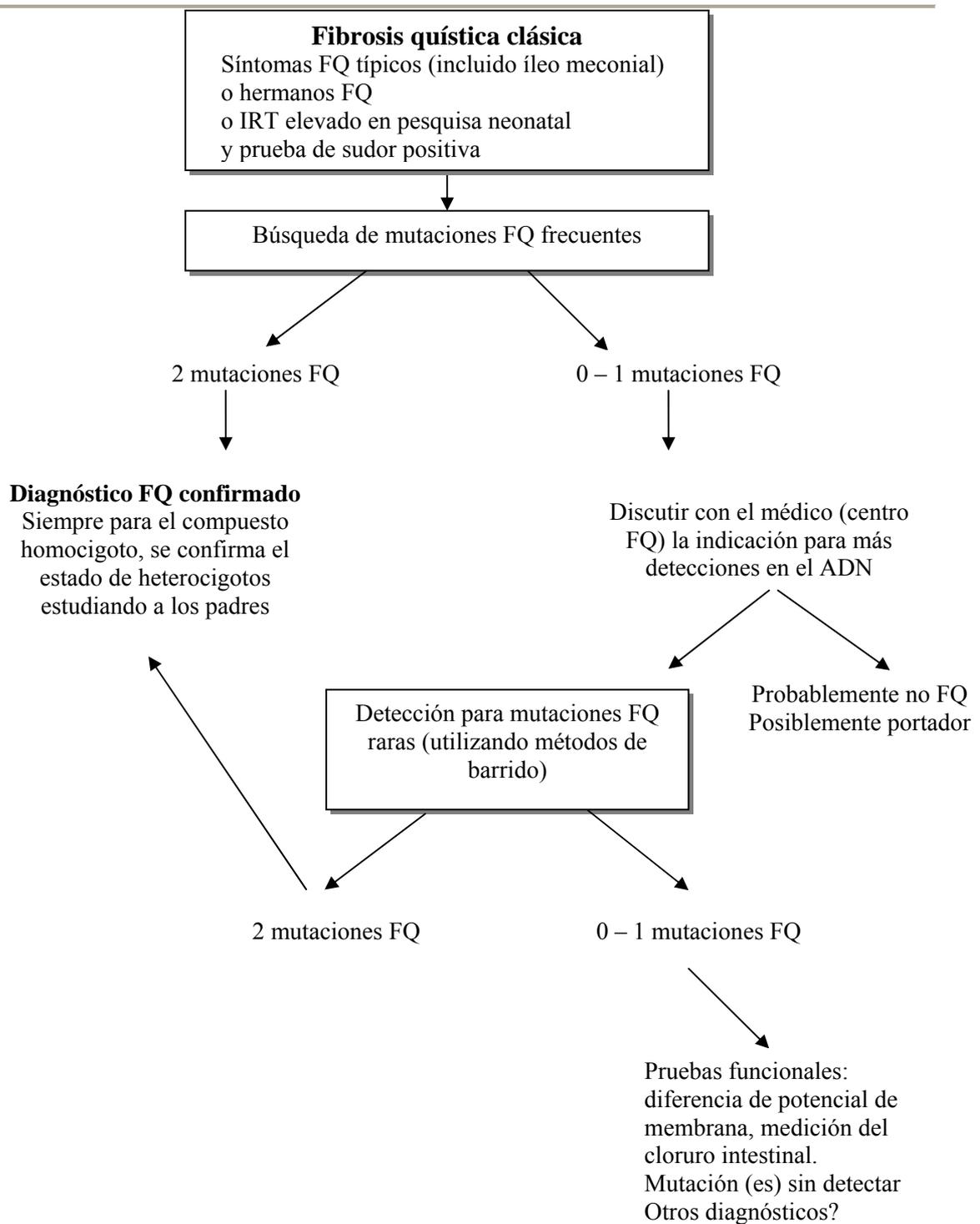
- Confirmación del diagnóstico (valores de concentración de cloruro en sudor intermedios o límites)
- Diagnóstico en recién nacidos con patología sugestiva.
- Diagnóstico presintomático en recién nacidos y lactantes con sospecha de FQ por antecedentes familiares o pesquisa neonatal positiva.

- Definición genotípica de los pacientes con FQ confirmada y detección de portadores asintomáticos en la familia, para su adecuado asesoramiento genético.
- Diagnóstico de formas con presentación atípica.
- Diagnóstico prenatal en biopsia de vellosidades coriónicas o amniocentesis.
- Diagnóstico preimplantatorio.

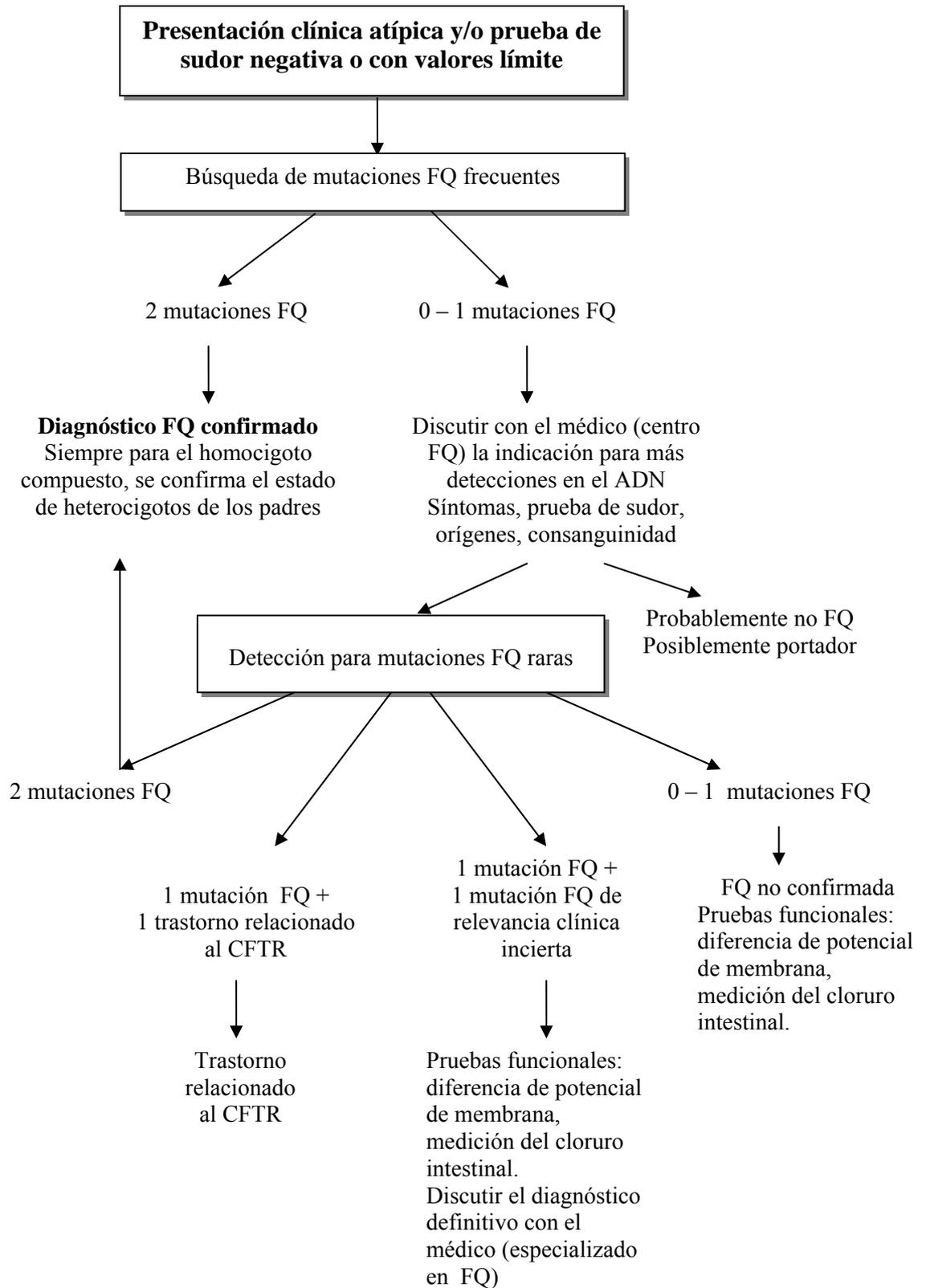
En general, se acepta que el nivel de sensibilidad mínimo requerido para que un método de laboratorio pueda ser utilizado como método de diagnóstico es del 70%. La no detección de mutaciones no excluye la patología ya que, los estudios disponibles se limitan en general al análisis de las mutaciones más frecuentes.<sup>3</sup>

Paracchini V y colaboradores en el 2008; propusieron que la estrategia ideal para la detección de las mutaciones en el gen CFTR debería incluir los siguientes pasos: detectar las 20-30 mutaciones más comunes del gen CFTR utilizando los *kits* comerciales disponibles; si es negativo, el segundo paso debería ser la búsqueda de grandes reordenamientos en pacientes con FQ clásica (prueba de sudor con resultados patológicos, presencia de insuficiencia pancreática y enfermedad pulmonar). El tercer paso comprende el análisis extensivo de los 27 exones por medio de DHPLC y secuenciación; si continúa siendo negativo, utilizar QMPSF. Este enfoque paso a paso deberá maximizar la proporción de alelos mutantes detectados en la mayoría de las poblaciones.<sup>25,35</sup>

En la actualidad se emplea MLPA como la técnica que permite la identificación de deleciones y duplicaciones de varias kilobases por la detección de la pérdida o ganancia de hasta 45 secuencias *target* en una sola reacción.<sup>37</sup>



**FIGURA 1.6.** Las pruebas de diagnóstico en la presentación FQ típica. El algoritmo de diagnóstico se aplica sin considerar la edad del paciente FQ, de la pesquisa neonatal o de diagnóstico tardío en los adultos. Si bien el diagnóstico de la FQ puede basarse en la presencia de una o más características fenotípicas, la presentación clásica de la FQ fundamentalmente asocia síntomas respiratorios con obstrucción pulmonar e infecciones, disfunción pancreática exocrina, y la infertilidad en los hombres adultos, junto con concentraciones de cloruro en el sudor por encima de 60 mEq/L, que proporcionan una evidencia de un defecto del CFTR.<sup>97</sup>



**FIGURA 1.7.** Pruebas de diagnóstico en la presentación de FQ atípica y/o prueba de sudor con valores límite o negativo. Se requieren pruebas genéticas para confirmar el diagnóstico. Los pacientes presentan suficiencia pancreática pero pueden presentar pancreatitis aguda o crónica. Los síntomas respiratorios son variables, se incluyen asma, pólipos nasales, rinosinusitis crónica o bronquiectasia diseminada.<sup>97</sup>

## 1.1.9 Tratamiento

### 1.1.9.1 Sintomático

#### Infección

El objetivo principal del tratamiento en los pacientes FQ es la prevención de infección pulmonar de origen bacteriano. La aplicación temprana de estrategias terapéuticas antibacterianas ha mejorado la expectativa de vida de los pacientes.

La mayoría de los pacientes son inicialmente infectados por *S. aureus* o *H. influenzae*. Los pacientes con exacerbación pulmonar serán tratados con antibióticos antiestafilococos durante 2 – 4 semanas.<sup>66</sup> La tasa de infección por *S. aureus* en pacientes con fibrosis quística disminuye con la edad, y aumenta la de *P. aeruginosa*, el microorganismo patógeno más importante en esta enfermedad.

La aplicación de cursos repetidos de antibióticos a dosis altas, está garantizada para evitar el daño pulmonar permanente. El cambio frecuente de un antibiótico antipseudomonas por otro, podría ser una opción para evitar el riesgo de resistencia a un medicamento específico.<sup>88,99,100</sup>

#### Inflamación

Los corticoides sistémicos (prednisona) poseen efectos pleiotrópicos sobre los neutrófilos, y se indican en las exacerbaciones graves y por períodos breves.<sup>66</sup> Mucolíticos como la N-acetilcisteína tienen poco efecto sobre la enfermedad pulmonar en los pacientes FQ, por el contrario, se ha reportado que la DNasa humana recombinante reduce la viscosidad de la expectoración, mejora la función pulmonar y reduce el número de exacerbaciones pulmonares en pacientes con enfermedad pulmonar leve y moderada.<sup>101</sup> Además, la aplicación a corto plazo de suero salino hipertónico mejora la depuración de las vías respiratorias y la función pulmonar, aunque en menor medida que la DNasa humana recombinante.<sup>102</sup> Aún se desconoce el efecto a largo plazo con este fármaco o la solución salina.

#### Transplante pulmonar

Los candidatos a transplante de pulmón deben presentar enfermedad pulmonar grave, insuficiencia respiratoria irreversible, ausencia de disfunción o enfermedad de otros órganos vitales, y perfil psicosocial estable. El transplante no es una cura, es un procedimiento de rescate que permite en algunos pacientes una mejor calidad de vida, pero que presenta una alta morbimortalidad.<sup>2</sup>

---

## **Insuficiencia pancreática, nutrición y enfermedad hepática**

Los pacientes con fibrosis quística con estado nutricional deficiente tienen peor pronóstico y son más propensos a infecciones respiratorias que los que tienen buen estado nutricional. Si la absorción de grasa es normal, mejorará el pronóstico pulmonar.<sup>92</sup>

Desde 1970, se han utilizado microesferas ácido-resistentes de enzimas pancreáticas. Es indispensable lograr el estado nutricional óptimo de los pacientes, con esta finalidad se han introducido suplementos orales de calorías y la alimentación enteral por sonda nasogástrica o por tubo de gastrostomía.<sup>66</sup>

### **1.1.9.2 En etapa de investigación**

#### **Terapia farmacológica**

Está dirigida a tratar de disminuir la viscosidad de las secreciones respiratorias que presentan grandes cantidades de ADN y filamentos de actina,<sup>103</sup> o a afectar la producción intracelular, el transporte, o la activación del CFTR a través de modificaciones en el ARNm.<sup>104</sup>

Se propone que la maduración del CFTR puede ser modulada por compuestos químicos después de su paso a través del retículo endoplásmico.<sup>66</sup>

Los activadores de la secreción de cloruro como UTP (uridina trifosfato) o los inhibidores de la absorción de sodio como amilorida son objetivos adicionales de la farmacoterapia CFTR. Ambos fármacos tienen una vida media muy corta, lo que limita su eficacia, pero se están probando en ensayos preclínicos, nuevos compuestos con un perfil farmacocinético mejorado.<sup>66</sup>

#### **Terapia génica**

La estrategia moderna del tratamiento para la fibrosis quística, consiste en restaurar la función del CFTR mediante transfección de células con el receptor de tipo nativo (*wild-type*). En pacientes con fibrosis quística, los ensayos de terapia génica *in vivo*, se han hecho con vectores virales y lípidos catiónicos, sin embargo, no se obtuvieron efectos a largo plazo.<sup>105</sup>

---

---

## **OBJETIVOS**

---

---

## OBJETIVOS

1. Determinar la presencia de deleciones en los exones 17a/17b/18, 20 y 24 en pacientes de genotipo incompleto para las mutaciones del gen CFTR mediante un proyecto colaborativo con el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría “Sup. Sor María Ludovica” de la ciudad de La Plata y la Cátedra de Bioquímica Patológica, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.
2. Implementar la detección de las deleciones de los exones 17a/17b/18, 20 y 24 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en el perfil de mutaciones del gen CFTR que realiza el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría “Sup. Sor María Ludovica” de la ciudad de La Plata.
3. Caracterizar mediante secuenciación del gen CFTR las deleciones detectadas.
4. Detectar o descartar portadores a nivel molecular en las familias de los pacientes FQ
5. Recopilar datos clínicos y estudios de relevancia de las historias clínicas de los pacientes portadores de las mutaciones a investigar a fin de tratar de establecer en lo posible una correlación fenotipo-genotipo.

---

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

### 3.1 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1.1 Área de trabajo

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría “Sup. Sor María Ludovica” de La Plata.

La extracción y purificación de los fragmentos mutados se realizó en el Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE). Los productos de PCR fueron derivados a la empresa Macrogen (Corea) para su secuenciación.

Las consultas bibliográficas, el procesamiento estadístico de los datos y la discusión de los resultados se llevaron a cabo en la Cátedra de Bioquímica Patológica, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

#### 3.1.2 Población de estudio

Las muestras a analizar están representadas por ácido desoxirribonucleico (ADN) obtenido a partir de leucocitos de sangre periférica (aproximadamente 5 ml) utilizando EDTA al 5% como anticoagulante.

El esquema de detección de las mutaciones del gen CFTR en el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría “Sup. Sor María Ludovica”, se inició con la determinación de F508del. En los pacientes heterocigotos (F508del/otro) y con aquellos en los que no se detectó la mutación F508del, se procedió a realizar los *kits* INNO-LiPA CFTR 19 y 17+Tn que permiten detectar 36 mutaciones más las variantes polimórficas Tn. En los pacientes detectados como homocigotos para la mutación (F508del/F508del) el genotipo está completo.

Se analizaron 130 muestras de pacientes no relacionados que presentaron genotipo incompleto para las mutaciones del gen CFTR estudiadas y recopiladas por el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría “Sup. Sor María Ludovica” en el período de abril de 1998 hasta julio de 2010.

Los pacientes de genotipo incompleto se subdividieron en dos grupos: 102 pacientes que presentaron una mutación FQ en un alelo y 28 pacientes con dos alelos que permanecen sin identificar.

La detección molecular de tres grandes deleciones del gen CFTR se realizó en un total de 158 alelos no identificados.

Para los pacientes FQ que presentaron las mutaciones investigadas, se estudiaron sus familias, para detectar o descartar el estado de portadores a nivel molecular.

### 3.1.3 Reactivos y materiales

#### Reactivos

La lisis celular se realizó con la solución hipotónica RCLB compuesta por: Tris-clorhídrico (Invitrogen), cloruro de magnesio (SIGMA), cloruro de sodio (SIGMA).

Para la desnaturalización enzimática de las proteínas plasmáticas se utilizó Proteinasa K (WEIB), en medio de buffer de extracción (WEIB).

El ADN se extrajo con fenol – cloroformo (SIGMA), se purificó con una mezcla de alcohol isoamílico-cloroformo (Merck), y fue precipitado con etanol- cloruro de sodio (Merck) y disuelto en buffer Tris-EDTA (Invitrogen).

En el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se empleó: secuencias específicas de cebadores (Eurofins Operon Oligos), Taq DNA polimerasa recombinante 5 U/ $\mu$ l (Fermentas, incluye 10X Taq buffer y cloruro de magnesio), dNTPs (Fermentas), dimetilsulfóxido (ICN Biomedicals Inc), aceite mineral (SIGMA Chemical Company).

Para la electroforesis en gel se utilizó: TAE (Tris-base, ácido acético glacial, EDTA), TBE (Tris-base, ácido bórico, EDTA), azul de bromofenol, xilencianol, sacarosa. Tris-base (Invitrogen), ácido acético glacial (ANEDRA), EDTA (Invitrogen), ácido bórico (BIO-RAD).

Los productos de PCR fueron separados en geles de poliacrilamida 10% y agarosa de distinta concentración (Invitrogen Agarosa Ultrapure 100) y se tiñeron con bromuro de etidio. Para elaborar los geles de poliacrilamida al 10% se requiere de: acrilamida (BIO BASIC), N,N'-metilenebisacrilamida (Gibco BRL), persulfato de amonio (SIGMA), N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (SIGMA).

Los marcadores de peso molecular empleados fueron: 100 bp DNA Ladder (Fermentas o Invitrogen) y 1 Kb DNA Ladder (Gibco BRL).

Para las determinaciones empleando los *kits* INNO-LiPA CFTR 19 y 17+Tn (Innogenetics) se utilizó adicionalmente *Máxima Hot Start* Taq DNA polimerasa (Invitrogen).

Para la secuenciación de los fragmentos, éstos fueron extraídos del gel de agarosa (Gibco BRL Ultrapure Agarosa) y fueron purificados en columnas con el *kit* NucleoSpin Extract II (MACHEREY-NAGEL).

En la cuantificación de los productos de PCR para secuenciar se empleó el *kit* Quant-iT ds DNA HS Assay 0.2 – 100 ng (Invitrogen).

### **Materiales**

Micropipetas automáticas de distinta graduación (HTL, Gibson, BIOHIT), tubos para microcentrífuga (0.2, 0.5 y 1.5 ml marca Molecular Bio Products, Labnet), tips con y sin filtro (10, 20, 250 ul marca Rainin), tubos cónicos de polipropileno de 15 ml, pipetas pasteur.

#### **3.1.4 Equipos**

Lisis de células y obtención de ADN: centrífuga (Cavour), microcentrífuga Eppendorf.

Preparación de reactivos: balanza analítica.

PCR: termocicladores MJ Research, Perkin Elmer.

Electroforesis: cámaras horizontales y verticales (BIO-RAD), fuente de poder (BIO-RAD).

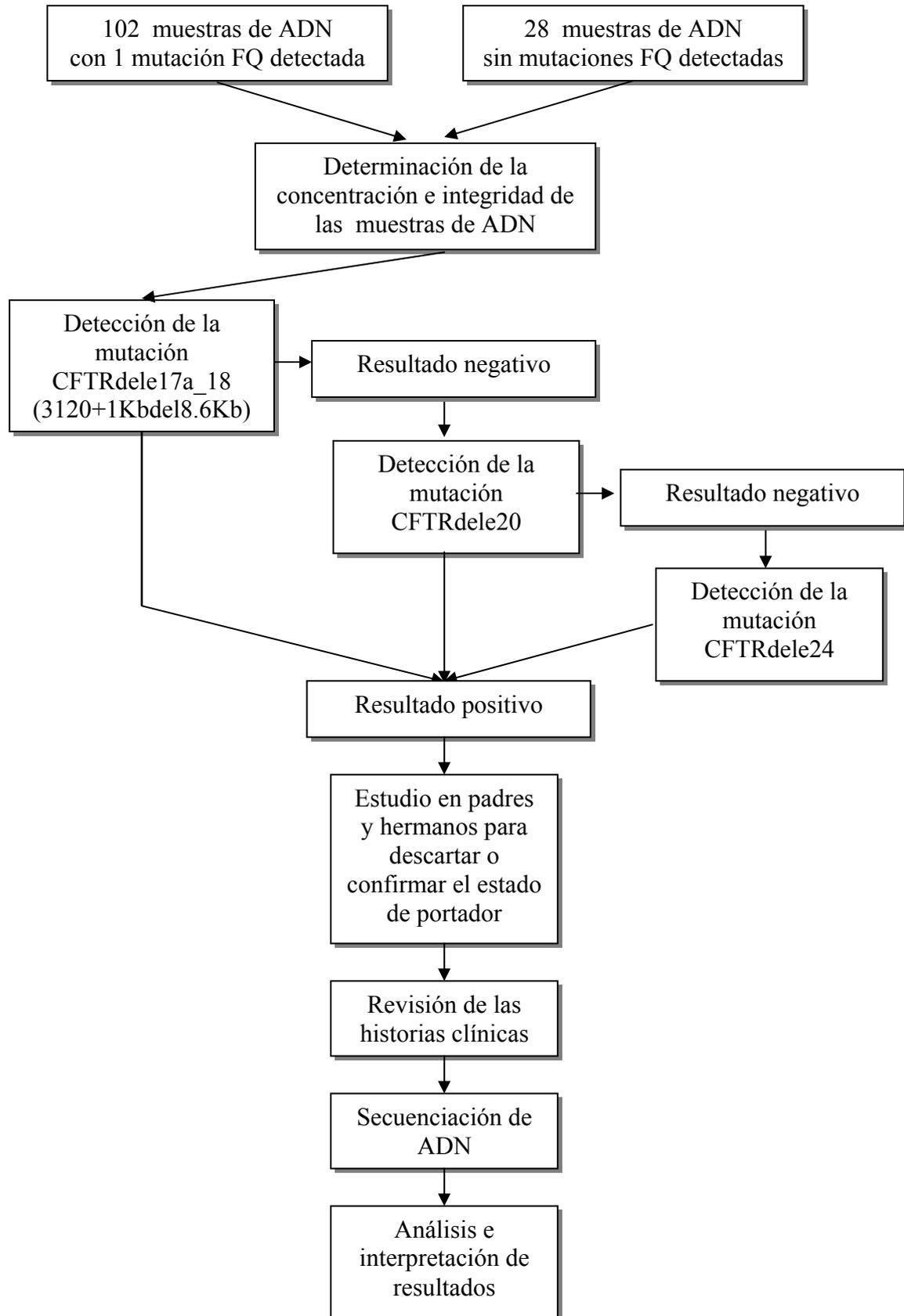
Análisis de los productos amplificados: transiluminador UV (FOTODYNE).

*Kits* CFTR 17+Tn y 19: baño termostático.

Cuantificación de los productos de PCR para secuenciar: Qubit Fluorómetro (Invitrogen).

La empresa MACROGEN utiliza el secuenciador ABI 3730XL.

3.2 ESQUEMA DE TRABAJO



### 3.3 MÉTODOS

#### 3.3.1 Extracción de ADN

Se realizó la búsqueda de las muestras de los pacientes con genotipo incompleto en el Banco de ADN del Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría “Sup. Sor María Ludovica”.

En las muestras nuevas, a partir de 5 ml de sangre periférica anticoagulada con EDTA 5%, se realizó la lisis de los eritrocitos con la solución hipotónica RCLB. Se centrifuga y se descarta el sobrenadante, los lavados son consecutivos hasta obtener el *pellet* de leucocitos.

Para liberar el contenido citoplasmático de los leucocitos, el *pellet* se resuspendió en buffer de extracción y se añadió Proteinasa K que degrada enzimáticamente las proteínas plasmáticas, se colocaron en un baño termostático a 37° C durante 12 horas o 2 horas a 62° C.

La extracción de ADN se realizó con solventes orgánicos. El componente proteico fue precipitado con fenol y los componentes orgánicos solubles fueron removidos con cloroformo, el material genético se encuentra en la fase acuosa.<sup>106</sup> Posteriormente el ADN fue purificado con una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico. La precipitación se produjo por acción del etanol absoluto y del cloruro de sodio. El ovillo de ADN se libera del exceso de sales con un lavado en una solución de etanol, se dejó secar y finalmente se resuspendió en buffer Tris-EDTA, debiendo permanecer al menos 8 horas a 37° C. (Ver anexo 1).

Para semi-cuantificar el ADN extraído y evidenciar su calidad, se realiza la electroforesis en gel de agarosa al 1% con una alícuota de 1 ul de la suspensión de ADN en buffer Tris-EDTA. El gel se tiñe con bromuro de etidio y se expone a luz UV.

Se comparó con ADN patrones de concentración conocida determinada por espectrofotometría y se estimó la concentración de ADN de las muestras en ng/ul.

#### 3.3.2 Electroforesis

La concentración e integridad del ADN extraído y la separación de los fragmentos de ADN por tamaño molecular se determinaron por electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida.

La electroforesis consiste en la separación de moléculas (proteínas, isoenzimas, ácidos nucleicos) a través de una matriz tamponada (agarosa, acrilamida, almidón). La matriz funciona como un filtro, separando las moléculas en un campo eléctrico, de

acuerdo al tamaño y la carga neta que poseen. En los ácidos nucleicos, el grupo fosfato presenta fuerte carga negativa a pH neutro, haciendo que durante la electroforesis los fragmentos migren hacia el ánodo (carga positiva). Las soluciones amortiguadoras de pH (soluciones *buffers*) utilizadas fueron TAE 50X solución stock, TAE 1X, TBE 10X solución stock, TBE 5X.<sup>106</sup>

La resolución y la velocidad de separación de los fragmentos de ADN se regulan a través del voltaje y de la concentración de agarosa o acrilamida en el gel.

La agarosa funciona como un filtro en el que los fragmentos de menor tamaño migran más rápidamente hacia el ánodo que aquellos de mayor tamaño. Se obtiene mejor resolución al aumentar la concentración de agarosa que dificulta el movimiento de los fragmentos a lo largo del gel. El incremento del voltaje aumenta proporcionalmente la velocidad de migración de los fragmentos.

Las moléculas (fragmentos) de gran tamaño se separaron con concentraciones del 0.8 % y a voltajes de 60-75 V. Los segmentos de 1500 pb en adelante con geles al 1%, los segmentos de 500 pb a 1500 pb en geles 1,5% o 2% y los segmentos pequeños de 100 pb a 500 pb en geles al 4-6%; el voltaje aplicado puede variar de 20 V a 120 V.

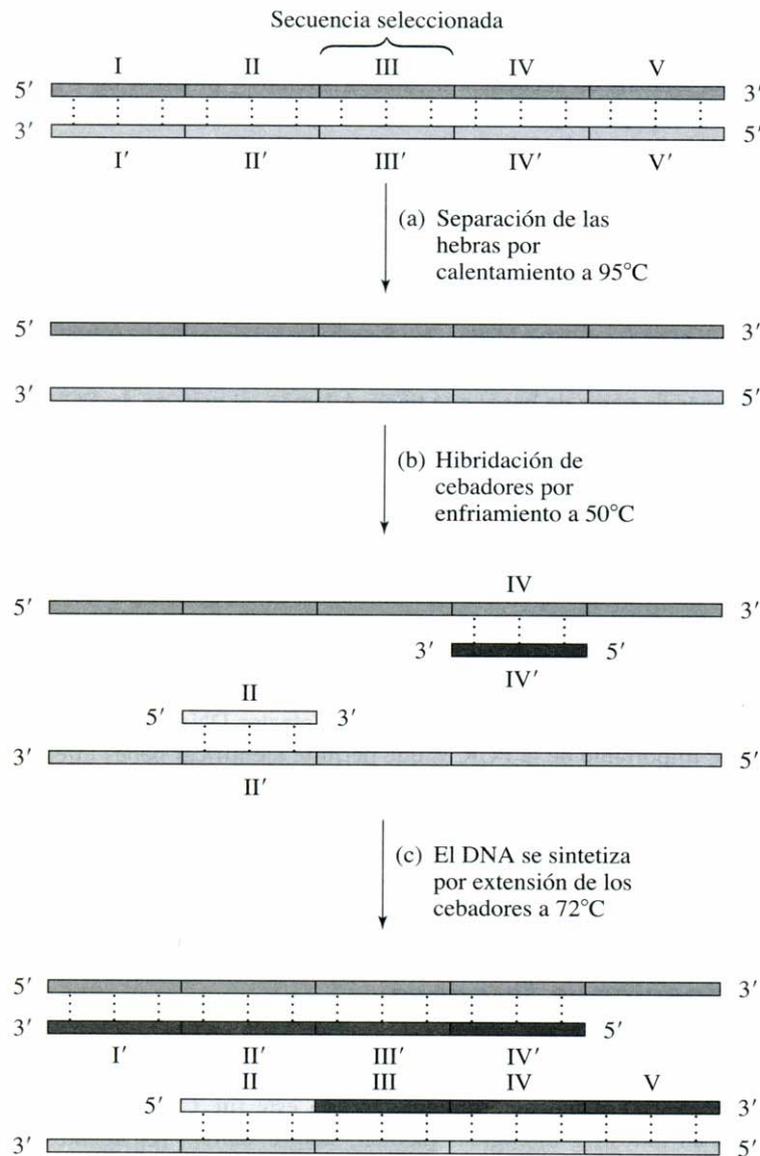
Los ácidos nucleicos separados en geles de agarosa pueden visualizarse mediante tinción con colorantes fluorescentes, que actúan mediante inserción entre los pares de bases que conforman el ácido nucleico. El bromuro de etidio es el más frecuentemente utilizado, advirtiéndose su alto poder cancerígeno y mutagénico.

### **3.3.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Este método desarrollado por Kary Mullis en 1983<sup>107</sup>, permite generar múltiples copias de un determinado fragmento de ADN cuando se conoce parte de la secuencia del mismo.

El ADN molde de doble hebra se divide en cinco regiones marcadas de la I a la V. (Ver figura 3.1). Las regiones complementarias son las marcadas de la I' a la V'. La región III y III' son las escogidas para amplificarse, si se conocen las secuencias de los nucleótidos de las regiones vecinas II y IV. Los requerimientos para la PCR incluyen:<sup>108</sup>

1. Dos oligonucleótidos cebadores sintéticos (*primers*) de unos 12 – 20 pares de bases cada uno, que sean complementarios con las secuencias II y IV de los flancos.
2. Una ADN polimerasa termoestable.
3. Los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato, dATP, dGTP, dCTP y dTTP.



**FIGURA 3.1.** La reacción en cadena de la polimerasa tiene tres etapas: a) separación de las hebras por calentamiento a 95° C, b) hibridación de los cebadores, y c) extensión de los cebadores por la síntesis de ADN. Los segmentos se marcan como I, II, III, IV y V en la hebra de ADN original y I', II', III', IV' y V' sobre la hebra complementaria.<sup>108</sup>

La PCR se lleva a cabo en ciclos de tres pasos. Cada ciclo consiste en:<sup>108</sup>

1. Desnaturalización para separar el ADN molde, que se hace calentando una mezcla de todos los componentes a 95° C por unos 15 segundos.
2. Enfriamiento brusco de la mezcla hasta el intervalo de 37° C a 55° C para permitir que los cebadores se hibriden con las regiones de flanco apropiadas. Los cebadores se orientan sobre el molde de manera que sus extremos 3' se dirigen uno al otro. La síntesis de ADN se extiende a través de las regiones III y III'. Los oligonucleótidos complementarios localizan los puntos de partida para la duplicación del segmento de ADN deseado y sirven como cebadores 3'-hidroxilo para iniciar la síntesis de ADN. Al ADN se le añade un exceso de cebadores para favorecer la hibridación y evitar que se vuelvan a unir las hebras del ADN molde.
3. La síntesis del ADN seleccionado se cataliza por la ADN polimerasa Taq. La temperatura se eleva a 72° C para aumentar la velocidad de la reacción de polimerización. La enzima extiende ambos cebadores, originando dos nuevas hebras de ADN, II-III-IV-V y II'-III'-IV'-V'. Las enzimas son termoestables y permiten obtener una elevada tasa de síntesis de ADN. La reacción de síntesis de ADN normalmente se completa en unos 30 segundos.

La utilidad de la PCR radica en las tres etapas: desnaturalización, hibridación y síntesis de ADN; que se pueden repetir muchas veces simplemente cambiando la temperatura de la mezcla de reacción. Cada nueva hebra de ADN sintetizado puede servir de molde, de esta manera se incrementa en forma exponencial la concentración del ADN seleccionado.

### 3.3.4 PCR ASO reversa (*Reverse dot-blot*)

En este ensayo, las colas homopolímero con desoxirribonucleotidiltransferasa terminal se añaden a las sondas oligonucleótido alelo específico (*ASO dot-blot*) que se adjuntaron en la membrana de nylon por reticulación UV (*uv crosslinking*). El ADN se amplifica con cebadores biotinilados y se hibridan con oligonucleótidos inmovilizados

en la membrana. La hibridación se detecta mediante la adición a la membrana de estreptavidina-peroxidasa de rábano, donde se unirá a cualquier ADN biotinilado que se ha hibridado con los oligonucleótidos.

Entonces se puede obtener una señal positiva por una simple reacción colorimétrica no radiactiva. Esta técnica permite analizar simultáneamente una serie de secuencias amplificadas en una reacción de hibridación.

Innogenetics ha comercializado INNO-LIPA *kit* que utiliza esta técnica para detectar diez y nueve mutaciones FQ frecuentes y diecisiete mutaciones raras en forma secuencial más las variantes Tn. Esta técnica puede ser automatizada a nivel de post-PCR, por lo tanto el tiempo de trabajo y los errores pueden ser reducidos.<sup>109</sup>

### 3.3.5 Determinación de las mutaciones

#### 3.3.5.1 F508del

La muestra de ADN extraída es semi-cuantificada por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 – 1% comparando con patrones de concentración conocida, se verifica además la calidad del material genético.

Para realizar la PCR, se requieren alícuotas de 200 ng/ul de ADN íntegro, se sugiere trabajar con diluciones de las muestras, porque el exceso de ADN inhibe la reacción, además se garantiza conservar libre de contaminación y/o degradación a la muestra original.

La enzima Taq ADN polimerasa sintetiza de manera precisa la secuencia nucleotídica complementaria a la hebra molde comprendida entre los dos oligonucleótidos cebadores diseñados para cubrir el área flanqueante a la región del exón 10 donde se encuentra el codón 508 de la proteína CFTR (10i5':5'-GCA GAG TAC CTG AAA CAG GA-3' y 10i3':5'-CAT TCA CAG TAG CTT ACC CA-3').

La mezcla de reacción con un volumen final de 25 ul comprende: buffer de enzima 10X, cloruro de magnesio (25 mM), dNTPs (10 mM), los dos cebadores *Forward* (F) y *Reverse* (R) de concentración 25 pmol/ul, Taq ADN polimerasa (Fermentas) 1U, 200 ng de ADN y agua calidad miliQ.

Es necesario adicionar unas gotas de aceite mineral estéril en los tubos para evitar la evaporación de la mezcla en el termociclador.

En el termociclador el primer paso es la desnaturalización del ADN a 95° C durante 5 minutos.

Los 30 ciclos posteriores comprenden: 1minuto a 95° C (desnaturalización), 1minuto a 55°C (annealing), 1minuto a 72° C (extensión). El paso final de elongación son 10 minutos a 72° C.

Una vez obtenidos los fragmentos amplificados, son controlados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% a 75 V durante 30 minutos, posteriormente se tiñe con bromuro de etidio y se observan las bandas fluorescentes con radiación UV.

Con los productos de PCR controlados, se inicia la electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%, se siembran 12 ul del producto con 3 ul de sacarosa-*loading buffer* al 40%. Es preciso sembrar una alícuota de agua control y un control heterocigoto (F508del/normal). El buffer de corrida empleado fue TBE 1X, realizándose la

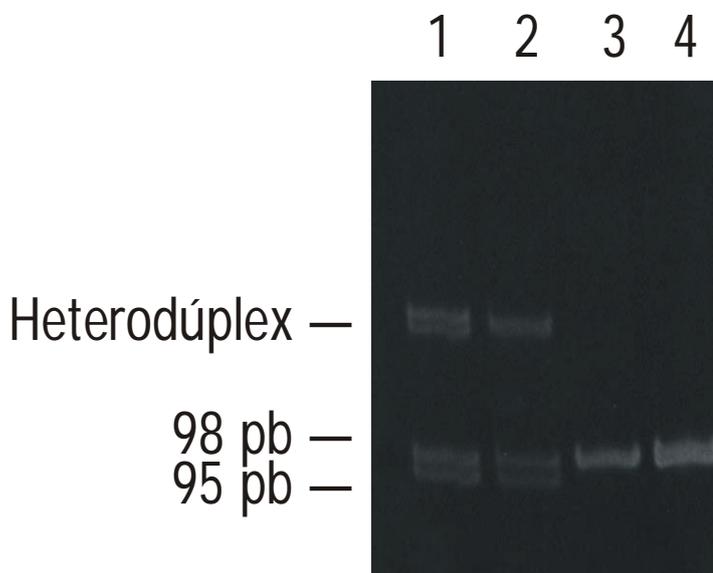
electroforesis a 30 mA durante 10 minutos, luego se reduce a 28 mA durante aproximadamente 3 horas, hasta que los fragmentos recorran aproximadamente 15 cm.

El gel se tiñe con bromuro de etidio y se visualizan los fragmentos en el transiluminador UV.

La electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% permitió detectar la pérdida de tres pares de bases en los fragmentos amplificados. El fragmento más pequeño que migra con mayor rapidez corresponde al alelo mutado de 95 pares de bases y el fragmento de 98 pares de bases corresponde al alelo normal.

Las muestras en las que se visualizaron fragmentos de 98 pares de bases corresponden a pacientes que no presentan la mutación, si se observan dos bandas correspondientes a un fragmento normal y uno mutado el paciente es heterocigoto para la mutación (F508del/otro) y si se observan únicamente fragmentos de 95 pares de bases el paciente es un homocigoto para la mutación (F508del/ F508del). (Ver figura 3.2.)

En los pacientes homocigotos para la mutación F508del/F508del se comprobó el patrón de herencia en los progenitores. Mientras en los pacientes heterocigotos o que no se les detectó la mutación F508del se procedió a utilizar los *kits* INNO-LiPA CFTR 19 y 17+Tn.



**FIGURA 3.2.** Detección de la mutación F508del. Gel de PAA 10%. Líneas 1 y 2 heterocigotos F508del. Líneas 3 y 4 no F508del. Cortesía Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Interzonal de Agudos “Sor María Ludovica”.

### 3.3.5.2 INNO-LiPA CFTR 19 y 17+Tn (Innogenetics)

Los ensayos de identificación de tipo de INNO-LiPA de Innogenetics (Bélgica) se basan en el principio de hibridación inversa.

#### Amplificación CFTR

La muestra de ADN es amplificada por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. La mezcla de reacción contiene exceso de desoxirribonucleótidos 5'-trifosfatos (dNTPs), cebadores biotinilados y *Máxima Hot Start Taq* ADN polimerasa. Es una amplificación multiplex para el gen CFTR en dos reacciones separadas:

- a) Exón/intrón 4, intrón 5, exón 10, intrón 10/exón 11, intrón 12, intrón 16, exón 20 y exón 21.
- b) Exón 2, intrón 1/intrón 3, exón 3, exón 7, intrón 8/ exón 9, exón 13, intrón 14b, exón 17a, intrón 17a/exón 17b, exón 19 e intrón 19. Un amplicón extra de 224 pares de bases correspondientes al intrón 1/intrón 3, es amplificado solo en presencia de la gran delección CFTRdele2,3 (21 Kb).

La desnaturalización por calor a 95° C por 15 minutos, separa la doble hebra de ADN con el fin de exponer la cadena simple a las secuencias específicas de cebadores. Los cebadores son complementarios a las regiones que flanquean la secuencia diana. Un posterior enfriamiento a 57° C por 1 minuto, permite a los cebadores unirse a las regiones específicas (*annealing*). En el siguiente paso a 68° C por 1 minuto la enzima *Máxima Hot Start Taq* ADN polimerasa extiende los cebadores ubicados específicamente a lo largo del molde diana (extensión). Luego a 72° C por 15 minutos se permite completar la formación de las nuevas secuencias (elongación). De esta manera dos copias exactas biotiniladas de la secuencia molde se producen después de un ciclo de desnaturalización, *annealing* y extensión. Después de repetir 30 ciclos, se obtienen secuencias biotiniladas específicas multi-amplificadas.

Una alícuota de 3-5 ul de los productos de PCR se controlan por electroforesis en gel de agarosa al 2% a 75 V por 30 minutos, posteriormente se tiñe el gel con bromuro de etidio y se expone a radiación UV. Se espera observar los siguientes patrones:

- a) Solución de cebadores 1: 491 pb (exón 10), 473 pb (exón 20), 460 pb (intrón 16), 425 pb (intrón 10/exón 11), 341 pb (exón 21), 331 pb (intrón 12), 304 pb (exón/intrón 4) y 144 pb (intrón 5). Las bandas correspondientes al exón 10, 20, intrón 16, exón 21 e intrón 12 no se diferencian como bandas separadas, por lo que únicamente se visualizaron 5 bandas definidas.
- b) Solución de cebadores 2: 495 pb (intrón 8/exón 9), 473 pb (exón 17a), 425 pb (intrón 19), 411 pb (exón 19), 395 pb (intrón 17a/exón 17b), 341 pb (exón 7), 328 pb (exón 2), 320 pb (intrón 14b), 311 pb (exón 3) y 181 pb (exón 13). Un amplicón extra de 224 pb (intrón 1/intrón 3), fue amplificado solo en presencia de la gran delección CFTRdele2,3 (21 Kb). Las bandas correspondientes al intrón 8/exón 9, exón 17a, intrón 19, exón 19, intrón 17a/ exón 17b, exón 7, exón 2, intrón 14 b, exón 3, intrón 1/intrón3, exón 13 no se diferencian como bandas separadas, por lo que únicamente son visibles 4 bandas claras.

### **Hibridación inversa**

El material de ADN biotinilado amplificado se desnaturaliza químicamente con EDTA, y las hebras separadas se hibridan con sondas de oligonucleótidos específicos inmovilizadas en bandas paralelas sobre tiras basadas en membranas.

Esto va seguido de una fase de lavado astringente a fin de eliminar cualquier material amplificado incorrectamente emparejado. Después del lavado astringente, se añade estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina, que queda ligada a cualquier híbrido biotinilado que se haya formado con anterioridad.

La incubación con una solución de sustrato que contiene un cromógeno produce un precipitado de color púrpura/marrón. La reacción se interrumpe mediante una fase de lavado, tras la que se registra el patrón de reactividad de las sondas.<sup>110</sup>

Las mutaciones incluidas en los *kits* INNO-LiPA CFTR 19 y 17+Tn son las siguientes:

<i>INNO-LiPA CFTR 19</i>	<i>INNO-LiPA CFTR 17+Tn</i>
F508del	621+1G→T
G542X	3849+10KbC→T
N1303K	2183AA→G
W1282X	394delTT
G551D	2789+5G→A
1717-1G→A	R1162X
R553X	3659delC
CFTRdele2,3(21Kb)	R117H
I507del	R334W
711+1G→T	R347P
3272-26A→G	G85E
3905insT	1078delT
R560T	A455E
1898+1G→A	2143delT
S1251N	E60X
3199del6	2184delA
3120+1G→A	711+5G→A
Q552X	Variantes polimórficas Tn en el gen CFTR: 5T, 7T, 9T

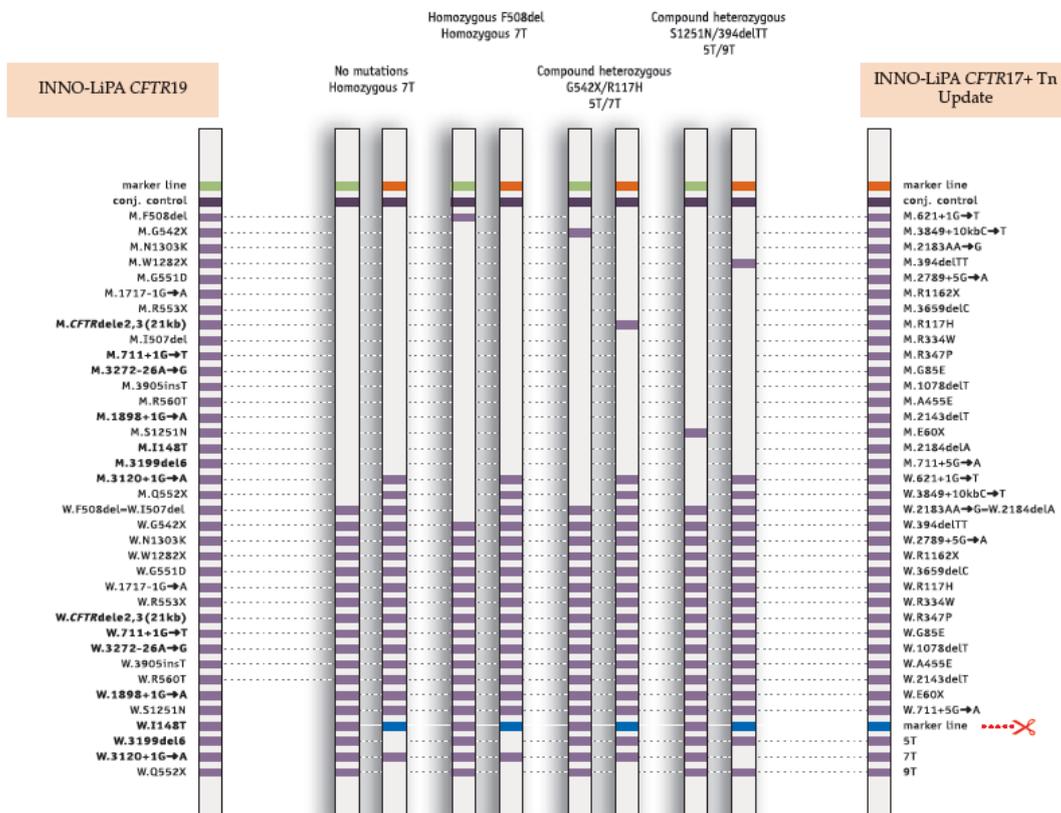


FIGURA 3.3. INNO-LiPA CFTR 19 y 17 + Tn. Tomado del manual de usuario Innogenetics.

### 3.3.5.3 Deleción de los exones 17a/17b/18 (CFTRdele17a\_18 ó 3120+1Kbdele8.6Kb)

Esta mutación tiene una extensión de 8.6 Kb, causa un marco de eliminación de 159 aminoácidos (997 - 1156), que forman parte de los dominios transmembrana 10 a 12 en el gen CFTR.<sup>23,35</sup>

Lerer I y colaboradores en 1999, describieron a esta mutación como 3120+1Kbdele8.6Kb, en una población de pacientes FQ árabes palestinos. La nomenclatura para esta mutación de acuerdo a la Base de Datos de Mutaciones de la Fibrosis Quística (CFMD, *Cystic Fibrosis Mutation Database*) es IVS16-2634\_IVS18+1508del8600<sup>39</sup> y de acuerdo a la Sociedad de Variación del Genoma Humano (HGVS, *Human Genome Variation Society*) le corresponde la nomenclatura c.2989-2634\_c.3468+1508del8600<sup>52</sup>.

En la PCR multiplex, la enzima *Taq* ADN polimerasa sintetiza de manera precisa la secuencia nucleotídica complementaria a la hebra molde comprendida entre los dos oligonucleótidos cebadores diseñados para cubrir el área flanqueante a la región de los exones 17a/17b/18 de la proteína CFTR (16delF:5'-AAC CAG ACT GTC AGT TTG CCT CAT-3' y 18delR:5'-AAT GCC CAT AAA CAC CCA GGA AAG-3'). Se utilizan dos cebadores como control interno de amplificación del exón 18 (18i5':5'-GTA GAT GCT GTG ATG AAC TGA-3' y 18i3': 5'-AGT GGC TAT CTA TGA GAC GGA-3').<sup>23,31,33</sup>

La mezcla de reacción con un volumen final de 25 ul comprende:

Buffer de enzima 10X	2.5 ul
Cloruro de magnesio (25 mM)	2.5 ul
dNTPs (1.25 mM)	3.0 ul
Cebador 16delF	15 pmol/ul
Cebador 18delR	15 pmol/ul
Cebador 18i5'	25 pmol/ul
Cebador 18i3'	25 pmol/ul
Taq ADN polimerasa (Fermentas)	2 U
ADN	200 ng
Agua csp	25 ul

Es necesario adicionar unas gotas de aceite mineral estéril en los tubos para evitar la evaporación de la mezcla en el termociclador.

El programa PCR inicia con la desnaturalización del ADN a 94° C durante 3 minutos.

Los 30 ciclos posteriores comprenden: 30 segundos a 94° C (desnaturalización), 30 segundos a 57°C (annealing), 30 segundos a 72° C (extensión).

El paso final de elongación son 7 minutos a 72° C.

Una vez obtenidos los fragmentos amplificados, se realiza la electroforesis en gel de agarosa al 2% a 75 V durante 30 minutos, el buffer de corrida empleado es TAE 1X. Se siembran 5 ul del producto con 1 ul de *loading buffer* 6X; una alícuota de agua control y el marcador de peso molecular 100 pb Fermentas o Invitrogen. Posteriormente se tiñe con bromuro de etidio y se observan las bandas fluorescentes con radicación UV.

El fragmento más pequeño que migra con mayor rapidez corresponde al alelo mutado de 235 pb y el fragmento de 451 pb corresponde al alelo normal.

Las muestras en las que se visualiza el fragmento de 451 pares de bases corresponden a pacientes que no presentan la mutación, si se observan dos bandas correspondientes a un fragmento normal y uno mutado el paciente es heterocigoto.

Para la mutación 3120+1Kbde18.6Kb si se observa únicamente el fragmento de 235 pb el paciente es un homocigoto para la mutación (3120+1Kbde18.6Kb/3120+1Kbde18.6Kb).

En los pacientes heterocigotos para la mutación 3120+1Kbde18.6Kb se comprobó el patrón de herencia en los progenitores. En los pacientes que no se les detectó la mutación 3120+1Kbde18.6Kb se procedió a realizar la determinación CFTRdele20.

### 3.3.5.4 Deleción del exón 20 (CFTRdele20)

Esta deleción tiene una extensión de 781 bp. Los cebadores F:5'-GAA TCA TTC AGT GGG TAT AAG CAG-3' y R:5'-TAT AGT CAG TCT ACC TGG AGG T-3' fueron diseñados para cubrir el área flanqueante a la región del exón 20 de la proteína CFTR.<sup>29,38</sup>

La nomenclatura para esta mutación de acuerdo a la Base de Datos de Mutaciones de la Fibrosis Quística (CFMD, *Cystic Fibrosis Mutation Database*) es IVS19-24\_IVS20+601del781<sup>39</sup> y de acuerdo a la Sociedad de Variación del Genoma Humano (HGVS, *Human Genome Variation Society*) le corresponde la nomenclatura c.3718-24\_c.3873+601del781<sup>52</sup>.

La mezcla de reacción con un volumen final de 25 ul comprende:

Buffer de enzima 10X	2.5 ul
Cloruro de magnesio (25 mM)	2.5 ul
dNTPs (4 mM)	4.0 ul
Cebador <i>Forward</i> (F)	15 pmol/ul
Cebador <i>Reverse</i> (R)	15 pmol/ul
Taq ADN polimerasa (Fermentas)	2.5 U
ADN	200 ng
Agua csp`	25 ul

Se adicionan unas gotas de aceite mineral estéril en los tubos para evitar la evaporación de la mezcla en el termociclador.

En el termociclador el primer paso es la desnaturalización del ADN a 94° C durante 3 minutos.

Los 30 ciclos posteriores comprenden: 30 segundos a 94° C (desnaturalización), 1 minuto a 57°C (annealing), 5 minutos a 72° C (extensión). El paso final de elongación son 10 minutos a 72° C.

Los fragmentos amplificados son controlados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a 75 V durante 30 minutos, el buffer de corrido empleado es TAE 1X. Se siembran 5 ul del producto de PCR con 1 ul de *loading buffer* 6X, además una alícuota de agua control y el marcador de peso molecular de 1 Kb.

La tinción del gel se realizó con bromuro de etidio y se observaron las bandas fluorescentes con radiación UV.

El fragmento de 3684 pb corresponde al alelo normal, el fragmento de menor tamaño de 2903 pb, migra con mayor rapidez y corresponde al alelo mutado. Las muestras en las que se visualizan únicamente fragmentos de 3684 pb corresponden a pacientes que no presentan la mutación, si se observan dos bandas correspondientes a un fragmento normal y uno mutado el paciente es heterocigoto para la mutación (CFTRdele20/otro) y si se observan únicamente fragmentos de 2903 pb el paciente es un homocigoto para la mutación (CFTRdele20/ CFTRdele20).

En los pacientes heterocigotos para la mutación CFTRdele20, se comprobó el patrón de herencia en los progenitores. En los pacientes a los que no se les detectó la mutación CFTRdele20 ni la 3120+1Kbde18.6Kb, se procedió a realizar la determinación CFTRdele24.

### 3.3.5.5 Delección del exón 24 (CFTRdele24)

Esta delección tiene una extensión de 582 bp. Los cebadores F:5'-AAG CAT TTG CTG ATT GCA CAG-3' y R:5'-TGA AAA CAT ACC ACC ATC AAC C-3' fueron diseñados para cubrir el área flanqueante a la región del exón 24 de la proteína CFTR.<sup>29,38</sup>

La nomenclatura para esta mutación de acuerdo a la Base de Datos de Mutaciones de la Fibrosis Quística (CFMD, *Cystic Fibrosis Mutation Database*) es 4344\_Stop+486del585insTTG<sup>39</sup> y de acuerdo a la Sociedad de Variación del Genoma Humano (HGVS, *Human Genome Variation Society*) le corresponde la nomenclatura c.4212\_c.4443+486del585insTTG<sup>52</sup>.

La mezcla de reacción con un volumen final de 25 ul comprende:

Buffer de enzima 10X	2.5 ul
Cloruro de magnesio (25 mM)	2.5 ul
dNTPs (4 mM)	4.0 ul
Cebador <i>Forward</i> (F)	15 pmol/ul
Cebador <i>Reverse</i> (R)	15 pmol/ul
Taq ADN polimerasa (Fermentas)	2.5 U
ADN	200 ng
Agua csp`	25 ul

La adición de unas gotas de aceite mineral estéril en los tubos evita la evaporación de la mezcla en el termociclador.

En el termociclador el primer paso es la desnaturalización del ADN a 94° C durante 3 minutos.

Los 40 ciclos posteriores comprenden: 30 segundos a 94° C (desnaturalización), 30 segundos a 57°C (annealing), 2 minutos a 72° C (extensión). El paso final de elongación son 10 minutos a 72° C.

Los fragmentos amplificados fueron controlados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a 75 V durante 30 minutos, el buffer de corrido empleado fue TAE 1X. Se sembraron 5 ul del producto de PCR con 1 ul de *loading buffer* 6X, además una alícuota de agua control y el marcador de peso molecular de 1 Kb.

La tinción del gel se realizó con bromuro de etidio y se observaron las bandas fluorescentes con radiación UV.

El fragmento de 2670 pb corresponde al alelo normal, el fragmento de menor tamaño de 2028 pb, migra con mayor rapidez y corresponde al alelo mutado. Las muestras en las que se visualizan únicamente fragmentos de 2670 pb corresponden a pacientes que no presentan la mutación, si se observan dos bandas correspondientes a un fragmento normal y uno mutado el paciente es heterocigoto para la mutación (CFTRdele24/otro) y si se observan únicamente fragmentos de 2028 pb el paciente es un homocigoto para la mutación (CFTRdele24/ CFTRdele24).

En los pacientes heterocigotos para la mutación CFTRdele24, se comprobó el patrón de herencia en los progenitores.

### 3.3.6 Secuenciación de ADN

#### Método enzimático de terminación de cadena (Método de Sanger o didesoxi)

Desarrollado en 1975 por Frederick Sanger y colaboradores, emplean didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs) como terminadores de la cadena de ADN.<sup>111</sup>

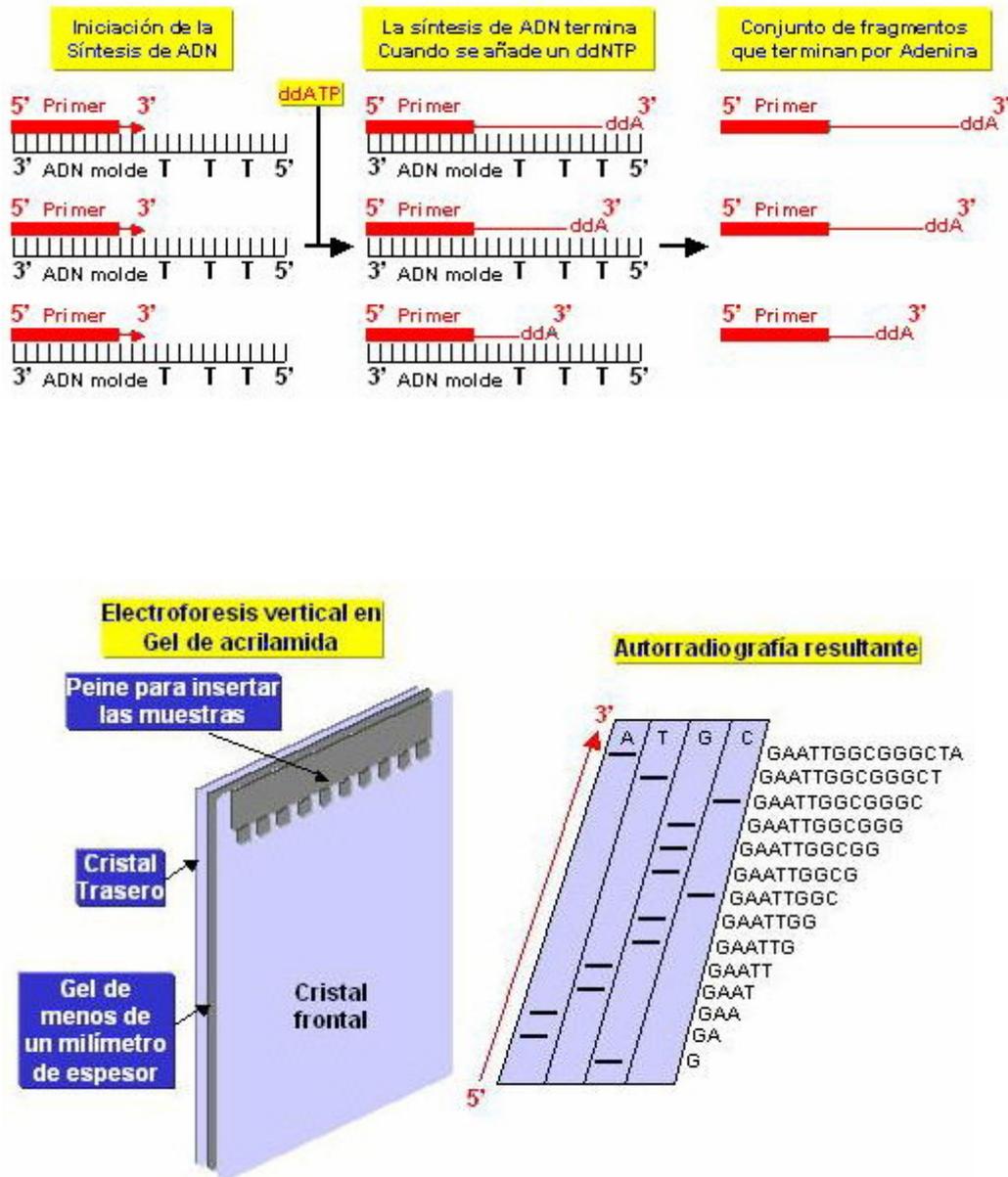
Se requiere de una hebra molde de ADN de cadena sencilla, un cebador de ADN con nucleótidos marcados radiactivamente o por fluorescencia, ADN polimerasa y didesoxinucleótidos.

La secuenciación se realiza en cuatro reacciones separadas en las que cada una contiene los cuatro desoxinucleótidos estándar (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) y en cada reacción se añade sólo uno de los cuatro didesoxinucleótidos (ddATP, ddGTP, ddCTP o dTTP). Estos didesoxinucleótidos terminan la elongación de la cadena de ADN naciente al carecer de un grupo hidroxilo en la posición 3' de la desoxirribosa que se necesita para la formación del enlace fosfodiéster.

La incorporación de un didesoxinucleótido en la cadena de ADN naciente termina su extensión, lo que produce varios fragmentos de ADN de longitud variable que terminan todos en el mismo nucleótido y marcados todos radiactivamente por el extremo 5'. Los fragmentos de ADN sintetizados y marcados son separados por tamaño mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-urea. Los productos de cada uno de las cuatro mezclas de reacción se corren en cuatro calles diferentes del gel y se visualizan las bandas de ADN mediante autoradiografía o luz ultravioleta. La secuencia de ADN se puede leer directamente a partir de la placa de rayos X o de la imagen del gel. (Ver figura 3.4.)

La aparición de bandas oscuras, en una posición concreta del gel, corresponden a los fragmentos de ADN de diferentes longitudes. El nucleótido terminal se identifica de acuerdo al didesoxinucleótido que se añadió en la reacción que dio lugar a esa banda.

Se obtiene la secuencia del ADN de nueva síntesis en dirección 5'-3', mediante la lectura del gel, iniciando por los fragmentos de menor tamaño (extremo 5') y avanzando hacia 3' por los fragmentos de mayor tamaño.



**FIGURA 3.4.** Método de Sanger o dideoxi. Se realiza en cuatro mezclas de reacción, cada una contiene los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, de dTTP y dGTP), ADN polimerasa, un cebador marcado radiactivamente y un nucleótido dideoxi, a una concentración baja. El nucleótido dideoxi utilizado competirá con su homólogo por incorporarse a la cadena de ADN que se está sintetizando, produciendo la terminación de la síntesis en el sitio de unión. En cada mezcla de reacción se producen moléculas de ADN de diferente longitud que terminan todas en el mismo nucleótido y marcadas todas radiactivamente por el extremo 5'. Los fragmentos de ADN de nueva síntesis obtenidos en cada mezcla de reacción se separan por tamaños mediante electroforesis en geles verticales de acrilamida que permiten distinguir fragmentos de ADN que se diferencian en un solo nucleótido. Una vez terminada la electroforesis, el gel se pone en contacto con una película fotográfica de autorradiografía. <http://www.ucm.es/info/genetica/>

### **Secuenciación por terminador fluorescente (Método automático de secuenciación)**

Es una modificación del método enzimático de terminación de cadena, en el que se marcan cada uno de los cuatro dideoxinucleótidos que terminan la cadena, con un colorante fluorescente diferente, con fluorescencia a distintas longitudes de onda.

Los fragmentos de ADN son separados mediante electroforesis capilar basada en la detección y registro de los picos de fluorescencia en un cromatograma.

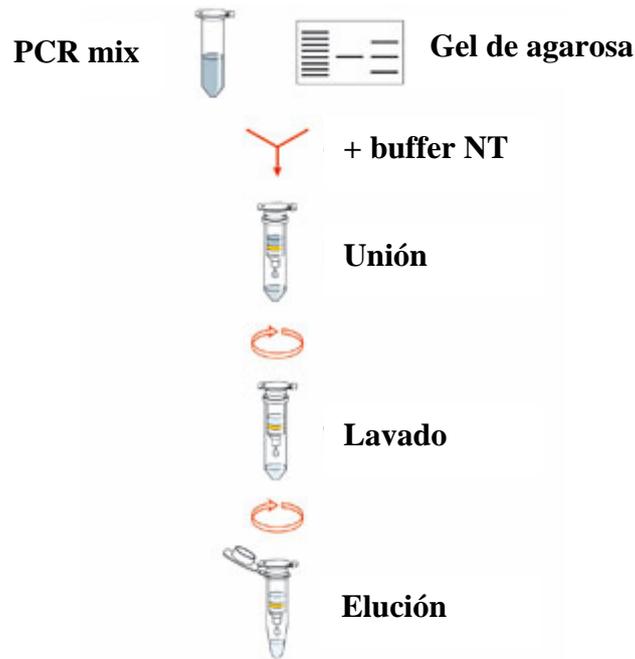
Este método permite realizar la secuenciación de forma rápida por llevarse a cabo en una sola reacción.

Es el método de referencia en la secuenciación automatizada empleado en conjunto con analizadores de secuencia computarizada de alto rendimiento. Sus ventajas son: fácil operabilidad, gran rapidez en la obtención de resultados y bajo costo.

### **Purificación de los fragmentos**

Los fragmentos mutados son extraídos con el *kit* PCR clean-up Gel extraction NucleoSpin Extract II (MACHEREY-NAGEL) a partir de un gel de agarosa al 2% (Ultra pure GIBCO). (Ver figura 3.5.)

En el método NucleoSpin Extract II el ADN se une a una membrana de sílica en presencia de una sal caotrópica añadida mediante la unión del buffer NT. La mezcla de unión se carga directamente en las columnas NucleoSpin Extract II. Contaminación, como sales y componentes macromoleculares solubles son removidos por un simple paso de lavado con tampón etanólico NT3. El ADN puro finalmente se eluye en condiciones de baja fuerza iónica con un poco de buffer alcalino NE.



**FIGURA 3.5.** Columnas de purificación para fragmentos en gel de agarosa. Figura del manual de usuario del *kit* PCR clean-up Gel extraction NucleoSpin Extract II (MACHEREY-NAGEL)

### Amplificación de los fragmentos purificados

Se realiza una reacción de PCR con 1  $\mu$ l de cada producto de PCR purificado en las columnas con los dos oligonucleótidos cebadores diseñados para cubrir el área flanqueante a la región de los exones 17a/17b/18 de la proteína CFTR (16delF:5'-AAC CAG ACT GTC AGT TTG CCT CAT-3' y 18delR:5'-AAT GCC CAT AAA CAC CCA GGA AAG-3'). Se utilizó como control el producto purificado en la columna de un fragmento del gel de agarosa puro.

La mezcla de reacción con un volumen final de 50 ul comprende:

Buffer de enzima 10X	5.0 ul
Cloruro de magnesio (25 mM)	5.0 ul
dNTPs (1.25 mM)	6.0 ul
Cebador 16delF	15 pmol/ul
Cebador 18delR	15 pmol/ul
Taq ADN polimerasa (Fermentas)	4 U
Producto de PCR purificado	1 ul
Agua csp	50 ul

Se adicionan unas gotas de aceite mineral estéril en los tubos para evitar la evaporación de la mezcla en el termociclador.

El programa PCR incluye:

Desnaturalización a 94° C durante 3 minutos.

30 ciclos posteriores comprenden: 30 segundos a 94° C

30 segundos a 57° C

30 segundos a 72° C

Elongación 7 minutos a 72° C.

Una vez obtenidos los fragmentos amplificados, se realiza la electroforesis en gel de agarosa al 2% a 75 V durante 30 minutos, el buffer de corrida empleado fue TAE 1X. Se siembran 5 ul del producto con 1 ul de *loading buffer* 6X; una alícuota de agua control y el marcador de peso molecular 100 pb Fermentas o Invitrogen. Posteriormente se tiñe con bromuro de etidio y se observan las bandas fluorescentes con radiación UV.

El único fragmento observado debe corresponder al alelo mutado de 235 pb y en el control de agarosa no se debe visualizar ninguna banda.

### **Cuantificación de los productos de PCR**

En la cuantificación de los productos de PCR para secuenciar se empleó el *kit* Quant-iT ds DNA HS Assay 0.2 – 100 ng (Invitrogen) y el fluorímetro Qubit (Invitrogen).

El *kit* Quant-iT ds DNA HS Assay emplea colorantes selectivos que se tornan fluorescentes cuando se unen al ADN. Estos colorantes son específicos para sus *targets*

y no se acoplan a contaminantes como fenol, sales, cloroformo y/o nucleótidos libres. El resultado es una lectura de fluorescencia que refleja exactamente la cantidad de la muestra a cuantificar. Esta plataforma ofrece alta selectividad y mayor sensibilidad utilizando sólo un microlitro (ul) de muestra.

La empresa MACROGEN (Corea) solicita que la concentración de las muestras sea de 50 ng/ul y el volumen mínimo de 20 ul.

Se deben enviar también los cebadores en una concentración de 10 pmol/ul (60 ng/ul) en un volumen superior a 20 ul.

---

**RESULTADOS**

**Y**

**DISCUSIÓN**

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La búsqueda de las deleciones/duplicaciones del gen CFTR es fundamental para establecer con alta sensibilidad el genotipo de los pacientes FQ, y como tal un consejo genético adecuado.<sup>35</sup> Varios estudios han reportado la identificación de deleciones exónicas en el gen CFTR. Se han caracterizado los grandes reordenamientos genéticos, incluidas las grandes deleciones/inserciones, que representan el 16-24% de los alelos FQ no identificados en la población europea.<sup>29,31</sup>

Lerer y colaboradores, 1999; Niel y colaboradores, 2004; Bombieri y colaboradores, 2005; Schrijver y colaboradores, 2008; concluyen que los reordenamientos del gen CFTR representan alrededor del 2% de los alelos FQ.

Ramos M y colaboradores en el año 2010, reportan que los reordenamientos del gen CFTR representan el 1,3% de los alelos FQ en España.<sup>38</sup>

Actualmente hay 1890 mutaciones que se señalan en la Base de Datos de Mutaciones de la Fibrosis Quística (*Cystic Fibrosis Mutation Database*), el análisis estadístico por tipo de mutación muestra que las grandes inserciones/deleciones del gen CFTR tienen una frecuencia del 2,59%.

En la tabla 4.1. se detalla la distribución de los 260 alelos correspondientes a los 130 pacientes fibroquísticos no relacionados incluidos en esta investigación.

Los pacientes de genotipo incompleto comprenden dos grupos: 102 pacientes que presentan una mutación FQ en un alelo y 28 pacientes con dos alelos que permanecen sin identificar.

La detección molecular de tres grandes deleciones del gen CFTR (3120+1Kbde18.6Kb, CFTRdele20, CFTRdele24) se realizó en un total de 158 alelos no identificados.

De las mutaciones detectadas previamente a este estudio, la mutación F508del es la más frecuente en los pacientes FQ de genotipo incompleto, correspondiente al 26,5% del total de los alelos.

De las tres grandes deleciones del gen CFTR investigadas en este trabajo, se detectaron tres pacientes heterocigotos portadores de la mutación 3120+1Kbde18.6Kb.

**TABLA 4.1.** Distribución de los alelos.

<b>Mutación</b>	<b>Número de alelos</b>	<b>%</b>
F508del	69	26,5
G542X	13	5,0
R334W	6	2,3
G85E	2	0,8
Ile507del	2	0,8
I148T	2	0,8
N1303K	1	0,4
3272-26A→G	1	0,4
W1282X	1	0,4
3849+10KbC→T	1	0,4
R1162X	1	0,4
394 del TT	1	0,4
R117H	1	0,4
1717-1G→A	1	0,4
Otro	158	60,7
<b>TOTAL</b>	<b>260</b>	<b>100%</b>

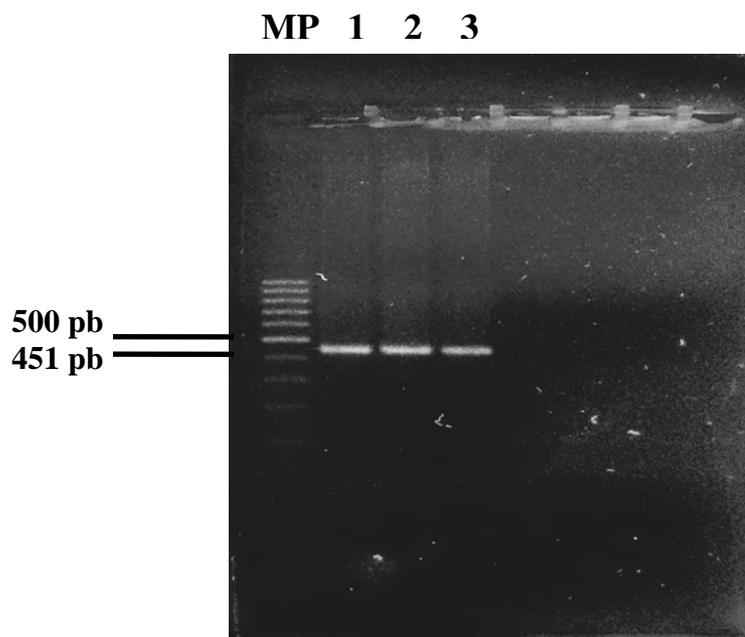
#### **Deleción de los exones 17a/17b/18 (CFTRdele17a\_18 ó 3120+1Kbdele8.6Kb)**

Las 130 muestras de ADN amplificaron el fragmento de 451 pb, correspondiente al control interno del exón 18. (Ver figura 4.1.)

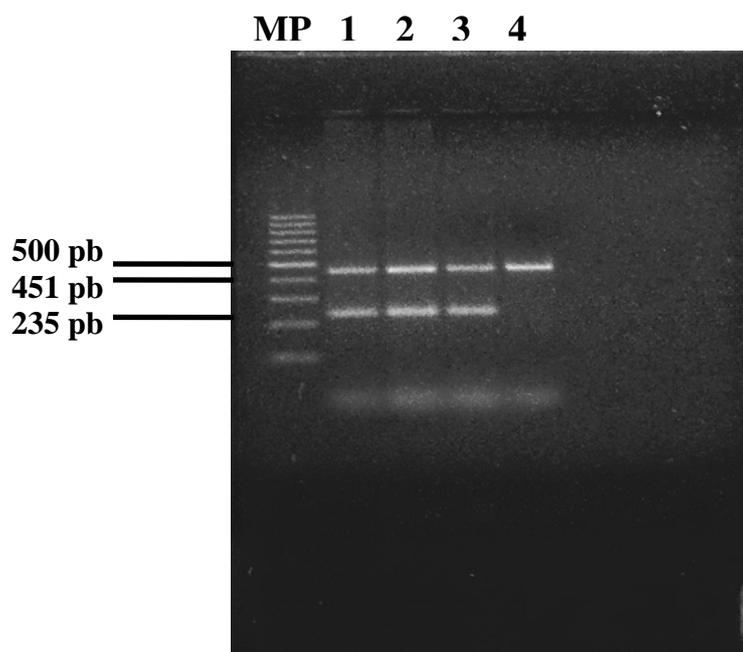
En tres muestras se amplificaron dos fragmentos: uno de 451 pb correspondiente al alelo normal y un fragmento de 235 pb correspondiente al alelo mutado. (Ver figura 4.2.) Los tres pacientes son heterocigotos para la mutación 3120+1Kbdele8.6Kb. Los tres casos corresponden a pacientes de genotipo incompleto con una mutación FQ de clase II detectada anteriormente, completándose así el genotipo.

Se realizó la detección de la mutación 3120+1Kbdele8.6Kb en ocho familiares de los pacientes. En el primer caso positivo (CF210) para la mutación 3120+1Kbdele8.6Kb, la madre es la portadora de la mutación F508del, por falta de muestra de ADN paterno no se pudo constatar el patrón de herencia ya que el padre debería ser el portador de la

mutación 3120+1Kbde18.6Kb. En los dos siguientes casos detectados (CF628 y CF 1143) se pudo comprobar el correcto patrón de herencia, en ambas situaciones la madre es la portadora de la mutación 3120+1Kbde18.6Kb, el padre es el portador de la mutación de clase II en el otro alelo. (Ver tabla 4.2.)



**FIGURA 4.1.** PCR de control interno del exón 18 (mutación CFTRdele17a\_18 ó 3120+1Kbde18.6Kb). Líneas 1-3: No 3120+1Kbde18.6Kb. Gel de agarosa al 2%. Marcador de peso molecular 100bp (Fermentas).



**FIGURA 4.2.** PCR Multiplex para la determinación de la mutación CFTRdele17a\_18 ó 3120+1Kbde18.6Kb. Gel de agarosa al 2%. Líneas 1-3: Het-heterocigoto. Línea 4: No 3120+1Kbde18.6Kb. Marcador de peso molecular 100 bp (Fermentas).

**TABLA 4.2.** Estudio en familiares de los pacientes portadores de la mutación 3120+1Kbde18.6Kb.

<b>FAMILIARES DE PACIENTES PORTADORES DE LA MUTACIÓN 3120+1Kbde18.6Kb</b>	<b>MUTACIÓN CONOCIDA/ IDENTIFICADA PREVIAMENTE</b>	<b>GENOTIPO</b>
<b>PRIMER PACIENTE (CF210)</b> Madre	F508del (exón 10)	F508del/3120+1Kbde18.6Kb F508del/Normal
<b>SEGUNDO PACIENTE (CF628)</b> Madre Padre Hermana	N1303K (exón 21)	N1303K/3120+1Kbde18.6Kb 3120+1Kbde18.6Kb/Normal N1303K/Normal Normal/Normal
<b>TERCER PACIENTE (CF1143)</b> Madre Padre Hermano Hermana	F508del (exón 10)  F508del (exón 10)	F508del/3120+1Kbde18.6Kb 3120+1Kbde18.6Kb/Normal F508del/Normal Normal/Normal F508del/Normal

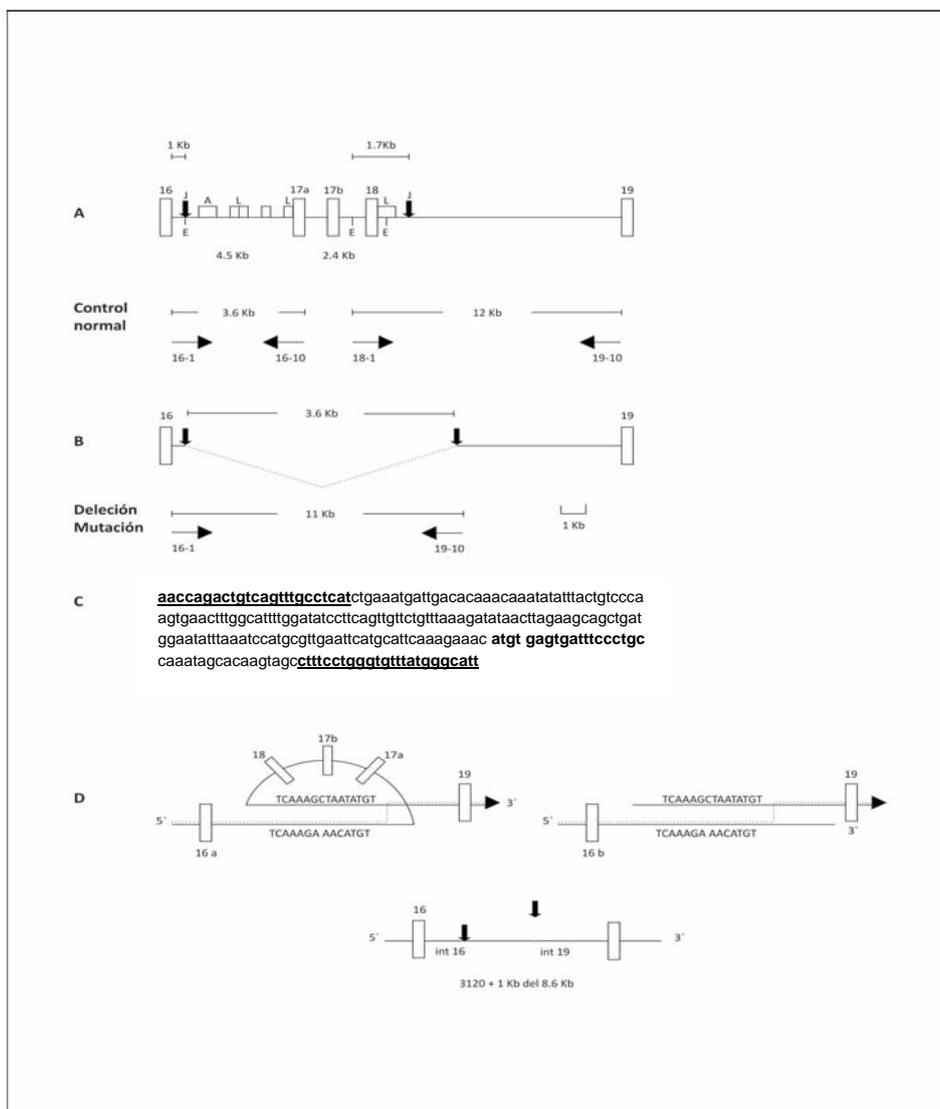
Los tres pacientes manifiestan la expresión clásica de la fibrosis quística, con un fenotipo severo caracterizado por: prueba de sudor positiva, grave deterioro de la función pulmonar con colonización permanente de gérmenes característicos a la FQ e insuficiencia pancreática. (Ver tabla 4.3.)

La mutación CFTRdele17a\_18 (3120+1Kbde18.6Kb) tiene una extensión de 8.6 Kb que comienza en 1 Kb en el intrón 16, exón 17a, intrón 17 a, exón 17 b, intrón 17 b, exón 18 y 1.7 Kb en el intrón 18.<sup>29</sup> En la proteína CFTR truncada por esta gran delección se unen los exones 16 al 19.<sup>31</sup>

Originalmente, Lerer I y colaboradores en 1999 describieron este reordenamiento del gen CFTR en la población árabe Palestina; estudios posteriores la reportan en americanos<sup>25</sup>, italianos<sup>31,35</sup> y españoles.<sup>29</sup>

La mutación CFTRdele17a\_18 (3120+1Kb del 8.6Kb) representa el 13% de los alelos FQ en pacientes árabes israelíes.<sup>23</sup>

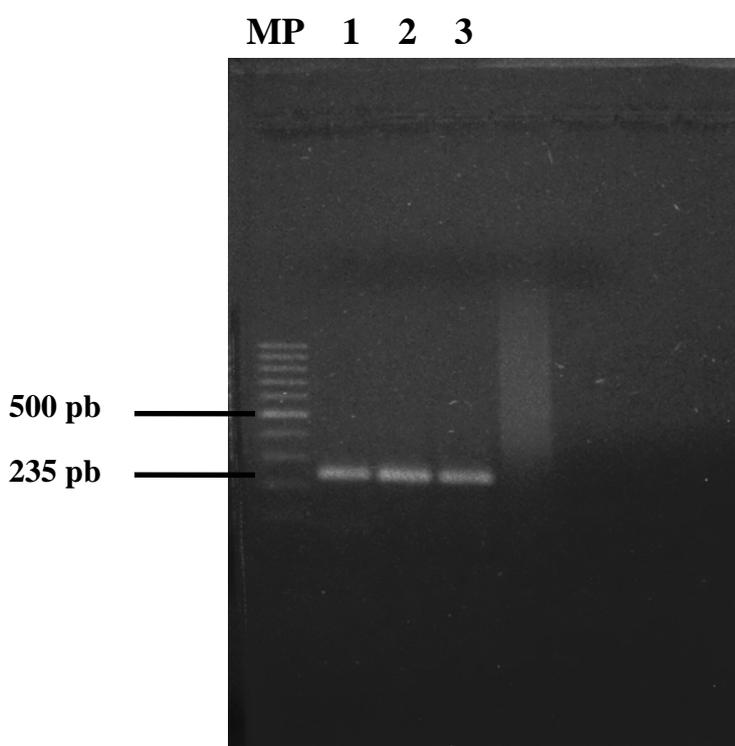
Lerer I y colaboradores, 1999; proponen el sobrecruzamiento desigual inter o intra cromosómicos (*unequal crossing-over*), como el mecanismo en la evolución de la eliminación de los exones 17a, 17b, 18.<sup>23</sup> (Ver figura 4.3.)



**FIGURA 4.3.** A. Presentación esquemática de la organización genómica de los exones 16 y 18 y la localización de los cebadores utilizados en este estudio. Sitios E-EcoRI, repetición L-LINE, repetición A-Alu, J-puntos de interrupción. B. Productos de PCR de ADNs controles normales y de la delección mutación 3120+1Kb del 8.6Kb. La línea discontinua representa la delección. C. La secuencia alrededor del punto de interrupción (*breakpoint junction*). Las 4 letras en **negrita** son los pares de bases idénticos en los intrones 16 y 18 en los cuales ocurre la interrupción. Las bases en *itálica* son del intrón 18, a la izquierda está la secuencia del intrón 16. Los cebadores 16delF y 18delR están subrayados. D. El sobrecruzamiento desigual es un mecanismo sugerido en la evolución de la delección. a) sobrecruzamiento desigual intra cromosómico (*intrachromosomal crossing-over*), b) sobrecruzamiento desigual inter cromosómico (*interchromosomal crossing-over*).<sup>23</sup>

Por secuenciación del fragmento mutado amplificado de 235 pb, se confirma que la mutación CFTRdele17a\_18 (3120+1Kbde18.6Kb) es de tipo cambio del marco de lectura (*in-frame deletion*), es una deleción de 159 aminoácidos (997 - 1156)<sup>23</sup> y elimina la parte terminal (10 a 12) del dominio transmembrana 2 (TM2) en la proteína CFTR<sup>35</sup>.

Los productos de PCR de los fragmentos purificados con las columnas de extracción NucleoSpin Extract II (MACHEREY-NAGEL) se obtuvieron en alta concentración y calidad. Se utilizó como control un fragmento de gel de agarosa puro que no amplificó ninguna banda, comprobando así que el proceso de extracción y purificación estuvo libre de contaminación. (Ver figura 4.4.)



**FIGURA 4.4.** PCR de amplificación de los fragmentos mutados purificados por método de extracción en columnas NucleoSpin Extract II. Líneas 1-3: fragmento de 235 pb puro. Gel de agarosa al 2%. Marcador de peso molecular 100 bp (Fermentas).

Esta mutación severa, cuando se combina con una segunda mutación severa, puede dar lugar a la presentación temprana de la FQ. En nuestro estudio, la FQ clásica se diagnosticó en los tres niños antes del primer año de vida; en el primer caso por historia familiar de FQ y pesquisa neonatal; en el segundo caso por manifestaciones clínicas de la FQ presentes al nacimiento y en el tercer caso por pesquisa neonatal.

La frecuencia de la mutación CFTRdele17a\_18 (3120+1Kbdele8.6Kb) en los 130 pacientes FQ incluidos en este estudio es del 2.3 % y las tres mutaciones detectadas corresponden al 2% de los alelos sin identificar.

**TABLA 4.3.** Genotipo e historia clínica de los pacientes portadores de la gran deleción CFTRdele17a\_18 ó 3120+1Kbdele8.6Kb.

GENOTIPO DEL PACIENTE	SEXO	EDAD Y FORMA DE DIAGNÓSTICO	EDAD ACTUAL	RESULTADO PRUEBA DE SUDOR (cloruros meq/L)	MANIFESTACIONES CLINICAS
<b>PRIMER CASO (CF210)</b> F508del/3120+1Kbdele8.6 Kb	M	1 mes Pesquisa neonatal Hermano FQ fallecido a los 6 meses de edad	Paciente falleció a los 8 años de edad	96	Afectación pulmonar grave Insuficiente pancreático Colonización por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina-resistente
<b>SEGUNDO CASO (CF628)</b> N1303K/3120+1Kbdele8.6 Kb	F	5 meses Ileo meconial	6 años	79	Afectación pulmonar grave Insuficiente pancreática Colonización por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina-resistente
<b>TERCER CASO (CF1143)</b> F508del/3120+1Kbdele8.6 Kb	M	1 mes Pesquisa neonatal	2 años(?)	97	Afectación pulmonar grave Insuficiente pancreático Colonización por <i>Streptococcus pneumoniae</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>

M masculino; F femenino

(?) Paciente no concurre a los dos últimos controles

En la tabla 4.4. se presenta la distribución final de los 260 alelos incluidos en este estudio. Dentro del total de 15 mutaciones del gen CFTR presentes en los 105 alelos mutados, a la mutación CFTRdele17a\_18 (3120+1Kbdele8.6Kb) le corresponde el cuarto lugar, y representa el 1.2% de los alelos FQ. Esta proporción de los reordenamientos del gen CFTR, se asemeja a lo publicado por Ramos M y colaboradores en el año 2010 en la población española (1.3%).

**TABLA 4.4.** Distribución final de los 260 alelos.

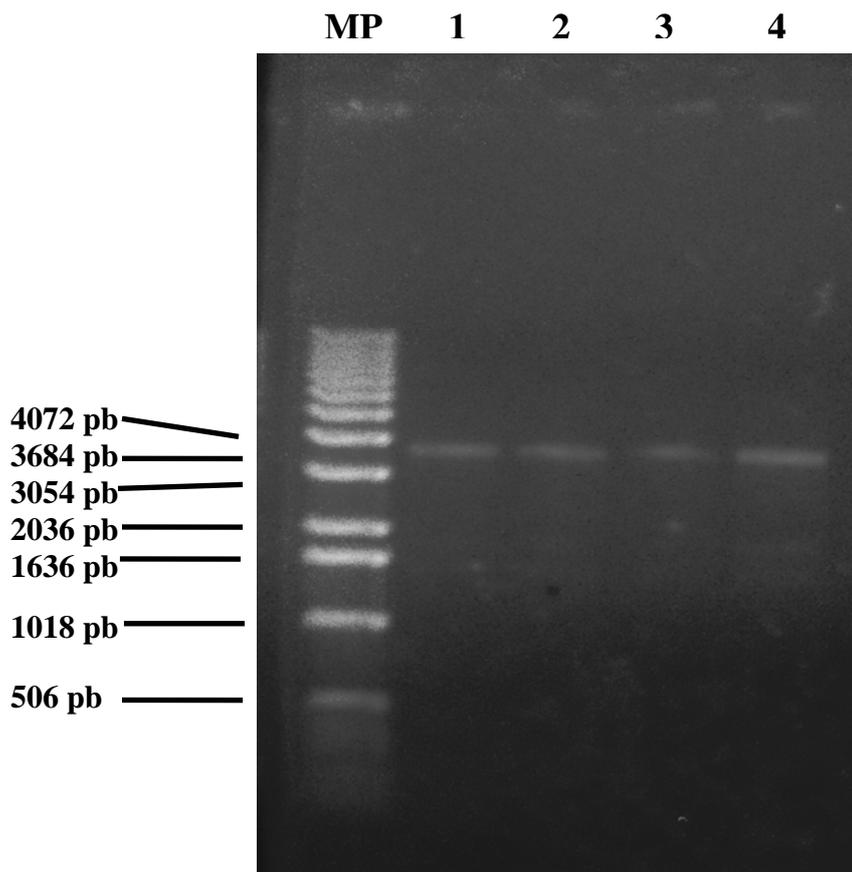
Mutación	Exón/Intrón	Número de alelos	%
F508 del	Exón 10	69	26.5
G542X	Exón 11	13	5.0
R334W	Exón 7	6	2.3
CFTRdele17a_18	Exones 17a/17b/18	3	1.2
G85E	Exón 3	2	0.8
Ile507del	Exón 10	2	0.8
I148T	Exón 4	2	0.8
N1303K	Exón 21	1	0.4
3272-26A→G	Intrón 17 a	1	0.4
W1282X	Exón 20	1	0.4
3849+10KbC→T	Intrón 19	1	0.4
R1162X	Exón 19	1	0.4
394 del TT	Exón 3	1	0.4
R117H	Exón 4	1	0.4
1717-1G→A	Intrón 10	1	0.4
Otro		155	59.6
<b>TOTAL</b>		260	100%

Existen publicaciones que relacionan los grandes reordenamientos del gen CFTR con el fenotipo CBAVD. Ratbi I y colaboradores en el año 2007, detectaron cuatro grandes reordenamientos del gen CFTR en un subgrupo de 61 hombres infértiles con ausencia congénita bilateral de vasos deferentes (CBAVD). Estos reordenamientos representan el 7% de los alelos previamente no identificados y el 1% de todos los alelos identificados (222 pacientes en total). La mutación CFTRdele17a\_18 (3120+1Kbde18.6Kb) se detectó en un paciente CBAVD proveniente de Siria. Se espera que los reordenamientos del gen CFTR estén presentes en al menos un alelo en pacientes CBAVD, en *trans* con una mutación leve.<sup>33</sup>

Hantash FM y colaboradores, 2006; concluyen que el análisis del gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística en búsqueda de deleciones exónicas y duplicaciones, debe ser incluido para el estudio completo de los pacientes CBAVD, en especial en aquellos que consideran la reproducción asistida.<sup>112</sup>

**Delección del exón 20 (CFTRdele20)**

En las 127 muestras de ADN se amplificaron únicamente fragmentos de 3684 pb, correspondientes a alelos normales (Ver figura 4.5.). Lo cual está de acuerdo con la baja frecuencia reportada para esta gran delección. De hecho, el único reporte encontrado en la literatura, hace referencia a Férec C y colaboradores que en el año 2006 caracterizaron seis nuevos grandes reordenamientos del gen CFTR en una población total de 274 alelos que fueron reclutados de 10 países: Australia (4), Algeria (29), Bélgica (3), República Checa (50), Francia (12), Irlanda (57). Italia (4), España (28), Túnez (51), Estados Unidos (36). La mutación IVS19-24\_IVS20+601del781 (CFTRdele20) es una delección simple con repeticiones cortas directas en la posición 5' y 3' de los puntos de interrupción (*breakpoints*). (Ver figura 4.6.) Se publicó la detección de esta gran delección en tres pacientes españoles.<sup>29</sup>



**FIGURA 4.5.** PCR para la determinación de la mutación CFTRdele20. Gel de agarosa al 1%. Líneas 1-4: N-normal. Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Gibco BRL).

---

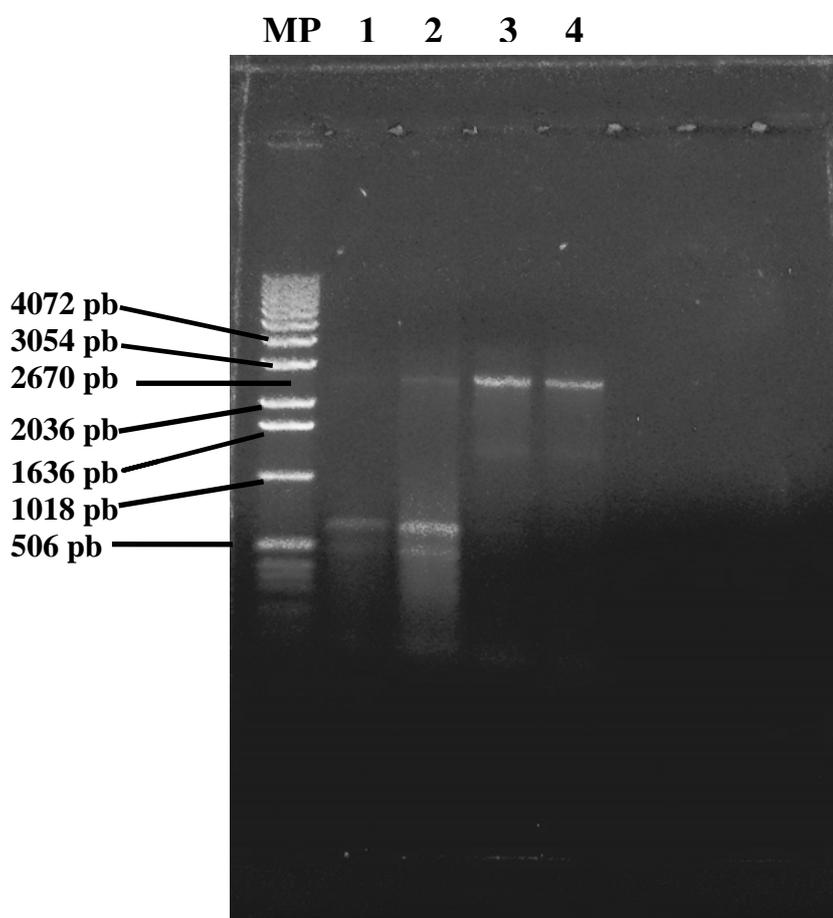
c.3718-24\_c.3873+601del781 (IVS19-24\_IVS20+601del781)  
ctatatgtcacagaagtgatcccacacttttae●●●●●●●●agagaaatageaacagttccagtttaaagtgata

**FIGURA 4.6.** La mutación IVS19-24\_IVS20+601del781 (CFTRdele20) es una deleción simple. La secuencia nativa (*wild-type*) que abarca el extremo 5' y el 3' de los puntos de interrupción (*breakpoints*) del reordenamiento CFTRdele20, la secuencia eliminada está excluida. Las repeticiones cortas directas que están presentes sólo en los puntos de interrupción (*breakpoints*) 5' y 3' están subrayadas.<sup>29</sup>

**Delección del exón 24 (CFTRdele24)**

En las 127 muestras de ADN se amplificaron únicamente los fragmentos de 2670 pb, correspondientes a alelos normales (Ver figura 4.7.), lo cual está de acuerdo con la baja frecuencia reportada para esta gran delección. Férec C y colaboradores en el 2006, la caracterizaron como una mutación compleja con inserciones cortas de 3-6 nucleótidos en, o dentro de las inmediaciones de las uniones cromosómicas aberrantes.

Es una mutación compleja en la que las secuencias adicionales han sido insertadas en las uniones cromosómicas recién formadas (Ver figura 4.8.). El único portador de esta mutación fue un paciente de origen español.<sup>29</sup>



**FIGURA 4.7.** PCR para la determinación de la mutación CFTRdele24. Gel de agarosa al 1%. Líneas 1-3: puesta a punto progresiva de la PCR hasta obtener bandas específicas. Línea 4: N-normal. Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Gibco BRL).



---

## **CONCLUSIONES**

---

---

## CONCLUSIONES

- Se detectaron tres pacientes heterocigotos para la mutación CFTRdele17a\_18 (3120+1Kbde18.6Kb), una delección de los exones 17a/17b/18 que elimina la parte terminal (10-12) del dominio trasmembrana 2 (TM2) del gen CFTR.
- La revisión de las historias clínicas permitió evidenciar que el fenotipo de los tres pacientes con la mutación CFTRdele17a\_18 (3120+1Kbde18.6Kb) es severo, incluye grave deterioro pulmonar e insuficiencia pancreática, colonización crónica con gérmenes característicos de fibrosis quística; el genotipo se completa porque esos pacientes son también portadores de una mutación de clase II.
- La mutación CFTRdele17a\_18 (3120+1Kbde18.6Kb) es una de las primeras grandes delecciones publicadas en el gen CFTR. Originalmente se describió en pacientes con ascendencia árabe Palestina y la frecuencia más alta de esta mutación es en esta población, lo que nos permite relacionar un componente de Medio Oriente en la población argentina.
- La secuenciación del fragmento mutado amplificado de 235 pb confirma que es una mutación de 159 aminoácidos.
- La frecuencia de la mutación CFTRdele17a\_18 (3120+1Kbde18.6Kb) en los 130 pacientes FQ incluidos en este estudio es del 2.30% y las tres mutaciones detectadas corresponden al 2% de los alelos sin identificar.
- Dentro del total de 15 mutaciones del gen CFTR presentes en los 105 alelos mutados, a la mutación CFTRdele17a\_18 (3120+1Kbde18.6Kb) le corresponde el cuarto lugar, y representa el 1.2% de los alelos FQ. Esta proporción de los reordenamientos del gen CFTR, se asemeja a lo publicado por Ramos M y colaboradores en el año 2010 en la población española (1.3%).

- No se detectó ningún paciente portador de las mutaciones CFTRdele20 y CFTRdele24, lo que coincide con la baja frecuencia reportada en las publicaciones de detección de grandes reordenamientos del gen CFTR en poblaciones de origen hispanico.
- Empleando secuencias específicas de cebadores publicadas en investigaciones en las que caracterizan las mutaciones por métodos modernos como QMPSF, MLPA, se pueden determinar grandes deleciones del gen CFTR de una manera sencilla y accesible para todo laboratorio de Diagnóstico Molecular.

---

---

## **ANEXOS**

---

---

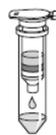
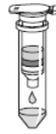
---

**ANEXO 1**  
**EXTRACCIÓN DE ADN**  
**METODO DE SOLVENTES ORGÁNICOS (FENOL – CLOROFORMO)<sup>106</sup>**

1. A 5 ml de sangre periférica anticoagulada con EDTA 5% adicionar 5 ml de RCLB y centrifugar 10 minutos a 1500 rpm. Descartar el sobrenadante y repetir el proceso hasta obtener un pellet.
2. Adicionar al pellet 600 ul de buffer PK y 12 ul de enzima proteinkinasa. Incubar en baño María para la digestión, a 62°C por 2 horas, o durante toda la noche a 37°C.
3. Al producto de la digestión adicionar 600 ul de fenol/tris clorhídrico, agitar vigorosamente por 10 minutos y centrifugar en microcentrífuga 8 minutos a 6500 rpm.
4. Separar la fase acuosa, pasarla a otro tubo y adicionar 300 ul de fenol/tris clorhídrico y 300 ul de alcohol isoamílico-cloroformo. Agitar hasta mezclar durante 10 minutos y centrifugar 8 minutos a 6500 rpm.
5. Separar la fase acuosa, pasarla a otro tubo y adicionar 600 ul de alcohol isoamílico-cloroformo. Agitar hasta mezclar durante 10 minutos y centrifugar 8 minutos a 6500 rpm.
6. Separar la fase acuosa, pasarla a otro tubo y adicionar 50 ul de cloruro de sodio 3 M y 800 ul de etanol absoluto. Agitar suavemente hasta obtener un ovillo de ADN.
7. Lavar el ovillo de ADN en etanol 45°, dejar secar hasta que se torne transparente.
8. Resuspender en solución tris EDTA (10:1) el volumen depende del tamaño del ovillo.
9. Mantener el ADN a 37°C por un mínimo de 8 horas.

## ANEXO 2

**PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN PARA SECUENCIACIÓN  
COLUMNAS NUCLEOSPIN EXTRACT II**

	PCR clean-up	Extracción del gel
<b>1 Extracción del fragmento de ADN del gel</b>  <b>Lisis del gel/ Ajustar las condiciones de unión</b>	 200 $\mu$ L NT / 100 $\mu$ L PCR	  200 $\mu$ L NT / 100 mg gel  50 °C 5–10 min
<b>2 Unión del ADN</b>	 	11,000 x <i>g</i> 1 min
<b>3 Lavar la membrana de sílica</b>	 	700 $\mu$ L NT3  11,000 x <i>g</i> 1 min
<b>4 Secar la membrana de sílica</b>		11,000 x <i>g</i> 2 min
<b>5 Eluir el ADN</b>	 	15–50 $\mu$ L NE  RT 1 min  11,000 x <i>g</i> 1 min

**FIGURA 4.1.** Esquema de trabajo para la purificación de fragmentos de ADN extraídos de geles de agarosa. Tomada del manual de usuario columnas NucleoSpin Extract II (MACHEREY-NAGEL).

---

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

---

**BIBLIOGRAFIA**

1. Welsh JJ, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR. Cystic fibrosis. En: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs, Kinzler Vogelstein, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Nueva York: Mc Graw-Hill; 2001: Págs. 5121-5188.
2. Segal E, Fernández A, Rentería T. *Fibrosis Quística*. Buenos Aires: Journal; 2004: Págs. 1-135, 159-204, 283-305, 325-350.
3. Castaños C, Rentería F. *Consenso Nacional de Fibrosis Quística*. Arch Argent Pediatr. 2008; (Supl)106: e01-52.
4. Borrajo GJC, Pistaccio LG, Gómez FR, et al. *Diez años de experiencia en la pesquisa neonatal de fibrosis quística*. Libro de resúmenes. 4to Congreso Argentino de Neumonología Pediátrica; 2005: 42.
5. D' Alessandro V, Rentería F, Fernández A, Martínez M, Segal E. *Comparación del estado clínico-funcional en niños con fibrosis quística detectados por pesquisa neonatal o por síntomas clínicos*. Arch Argent Pediatr. 2009; 107: 430-435.
6. Andersen DH. *Cystic fibrosis of the páncreas and its relation to celiac disease: clinical and pathological study*. Am J Dis Child. 1938; 56: 344-399.
7. Di Sant' Agnese PA, Darling RC, Perera GA, et al. *Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the páncreas: clinical implications and relationship to the disease*. Pediatrics. 1953; 12: 549-563.
8. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, et al. *Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA*. Science. 1989; 245: 1066-73.

9. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, et al. *Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping*. Science. 1989; 245: 1059-65.
10. Collins FS, Riordan JR, Tsui LC. *The cystic fibrosis gene: isolation and significance*. Hosp Pract. 1990; 25: 47-57.
11. Collins FS. *Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications*. Science. 1992; 256: 774-9.
12. Bienvenu T, Chertkoff L, Beldjord C, et al. *Identification of three novel mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in Argentinian CF patients*. Hum Mutat. 1996; 7: 376-377.
13. Chertkoff L, Visich A, Bienvenu T, Grenoville M, Segal E, Carniglia L, Kaplan J.C, Barreiro C. *Spectrum of CFTR mutations in Argentine cystic fibrosis patients*. Clin. Genet. 1997; 51: 43-47.
14. Visich A, Barreiro C, Chertkoff L. *Caracterización de tres microsatélites del Gen de Fibrosis Quística en familias Argentinas*. Medicina (Buenos Aires). 2001; 61: 23-27.
15. Roqué M, Godoy C.P, Castellanos M, Pusiol E, Mayorga L.S. *Population Screening of F508del ( $\Delta F508$ ), the most frequent mutation in CFTR gene associated with cystic fibrosis in Argentina*. Hum. Mut. 2001; 18: 167-170.
16. Visich A, Zielenski J, Castaños C, et al. *Complete screening of the CFTR in Argentine cystic fibrosis patients*. Clin. Genet. 2002; 61: 207-213.
17. Levy EM, Granados P, Rawe V, Olmedo SB, Luna MC, Cafferata E, Pivetta OH. *Mutation in CFTR gene and clinical correlation in Argentine patients with congenital bilateral absence of the vas deferens*. Medicina (Buenos Aires). 2004; 64: 213-218.

18. Oller Ramírez AM, Ramos MD, Jiménez J, et al. *Mutational spectrum of cystic fibrosis patients from Córdoba province and its zone of influence: implications of molecular diagnosis in Argentina*. Mol. Genet. Metab. 2006; 87: 370-375.
19. Oller 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: 310-319.
20. Orellano Laura, Palumbo Marta, Aisenberg Silvia, Segal Edgardo. Comunicación personal. *Mutaciones del gen CFTR en pacientes con fibrosis quística de la provincia de Buenos Aires*. V Jornadas de Actualizaciones en Clínica Pediátrica y Neonatología. La Plata, 2007: 35-36.
21. Morral N, Nunes V, Casals T, Cobos N, Asensio O, Dapena J, Estivill X. *Uniparental inheritance of microsatellite alleles of the cystic fibrosis gene (CFTR): identification of a 50 Kb deletion*. Hum Mol Genet. 1993; 2: 677-681.
22. Magnani C, Cremonesi L, Giunta A, Magnaghi P, Taramelli R, Ferrari M. *Short direct repeats at the breakpoints of a novel large deletion in the CFTR gene suggest a likely slipped mispairing mechanism*. Hum Genet. 1996; 98: 102-108.
23. Lerer L, Laufer-Cahana A, Rivlin R, Augarten A, Abeliovich D. *A large deletion mutation in the CFTR gene (3120+1k bdel8.6kb); a founder mutation in the Palestinian Arabs*. Mutation in brief No.231. Online. Hum Mutat. 1999; 13: 337-343.
24. Dörk T, Macek M, Mekus F, Tummler B, Tzountzouris J, Casals T, Kresova A, Koudova M, Sakmaryova L, Macek M, Vavrova V, Zemkova D, Ginter E, Petrova V, Ivaschenko T, Wagner K, Stuhmann M, Bauer I, Seydewitz H, Neumann T, Jakubiczka S. *Characterization of a novel 21-kb deletion, CFTRdele2,3(21kb), in the CFTR gene: a cystic fibrosis mutation of Slavic origin common in Central and East Europe*. Hum Genet. 2000; 106: 259-268.

- 
25. Audrézet MP, Chen JM, Raguenes O, et al. *Genomic rearrangements in the CFTR gene: extensive allelic heterogeneity and diverse mutational mechanisms.* Hum. Mutat. 2004; 23: 343-357.
  26. Niel F, Martin J, Dastot-Le Moal F et al. *Rapid detection of CFTR gene rearrangements impacts on genetic counseling in cystic fibrosis.* J Med Genet. 2004; 41: 1-7.
  27. Chevalier-Port F, Souche G, Bozon D. *Identification and characterization of three large deletions and a deletion/polymorphism in the CFTR gene.* Hum Mutat. 2005; 25: 504-510.
  28. Bombieri C, Bonizzato A, Castellani C, Assael BM, Pignatti PF. *Frequency of large CFTR gene rearrangements in Italian CF patients.* Eur J Hum Genet. 2005; 13: 687-689.
  29. Ferec C, Casals T, Chuzhanova N et al. *Gross genomic rearrangements involving deletions in the CFTR gene: characterization of six new events from a large cohort of hitherto unidentified cystic fibrosis chromosomes and meta-analysis of the underlying mechanisms.* Eur J Hum Genet. 2006; 14: 567-576.
  30. Nectoux J, Audrézet MP, Viel M, Leroy C, Raguenes O, Ferec C, Lesure J, Davy N, Renouil M, Cartault F, Bienvenu T. *A Frequent Large Rearrangement in the CFTR Gene in Cystic Fibrosis Patients from Reunion Island.* Genet Testing. 2006; 10: 208-214.
  31. Hantash FM, Redman JB, Starn K, Anderson B, et al. *Novel and recurrent rearrangements in the CFTR gene: clinical and laboratory implications for cystic fibrosis screening.* Hum Genet. 2006; 119: 126-136.
  32. Girardet A, Guittard C, Altieri J-P, et al. *Negative genetic neonatal screening for cystic fibrosis caused by compound heterozygosity for two large CFTR rearrangements.* Clin Genet. 2007; 72: 1-4.

- 
33. Ratbi I, Legendre M, Niel F, et al. *Detection of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene rearrangements enriches the mutation spectrum in congenital bilateral absence of the vas deferens and impacts on genetic counselling.* Human Reprod. 2007; 22: 1285-1291.
34. Taulan M, Girardet A, Guittard C, et al. *Large genomic rearrangements in the CFTR gene contribute to CBAVD.* BMC Med Genet. 2007; 8: 22-27.
35. Paracchini V, Seia M, Coviello D, et al. *Molecular and clinical features associated with CFTR gene rearrangements in Italian population: identification of a new duplication and recurrent deletions.* Clin Genet. 2008; 73: 346-352.
36. Des Georges M, Guittard C, Templin C, et al. *WGA Allows the Molecular Characterization of a Novel Large CFTR Rearrangement in a Black South African Cystic Fibrosis Patient.* J Mol Diag. 2008; 10: 544-548.
37. Schrijver I, Rappahahn K, Pique L, Kharrazi M, Wong Lee-Jun. *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification. Identification of Whole Exon and Single Nucleotide Deletions in the CFTR Gene of Hispanic Individuals with Cystic Fibrosis.* Journal of Molecular Diagnostics. 2008; 10: 368-375.
38. Ramos M, Masvidal L, Giménez J, et al. *CFTR Rearrangements in Spanish Cystic Fibrosis Patients: First New Duplication (35 kb) Characterised in the Mediterranean Countries.* Annals of Human Genetics. 2010; 74: 463-469.
39. Cystic Fibrosis Mutation Database [www.genet.sickkids.on.ca/cftr/](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/)
40. Tsui L-C, Buchwald M. *Biochemical and molecular genetics of cystic fibrosis.* En: Harris H, Hirschhorn K, eds. *Advances in Human Genetics.* Nueva York: Plenum. 1991; 20: 153-267.
41. Kérem B, Kérem E. *The molecular basis for disease variability in cystic fibrosis.* Eur. J Hum. Genet. 1996; 4: 65-73.

- 
42. Yoshimura K, Nakamura H, Trapnell BC, et al. *The cystic fibrosis gene has a housekeeping type promoter and is expressed at low levels in cells of epithelial origin.* J. Biol. Chem. 1991; 266: 9140-9144.
  43. Quinton PM, Bijman J. *Higher bioelectric potentials due to decreased chloride absorption in the sweat glands of patients with cystic fibrosis.* N. Engl. J. Med. 1983; 308: 1185-9.
  44. Quinton PM. *Chloride impermeability in cystic fibrosis.* Nature. 1983; 301: 421-2.
  45. Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, Smith AE, Welsh MJ. *Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity.* Science. 1991; 253: 202-5.
  46. Quinton PM, Martínez RM, Hopfer U. *Fluid and Electrolyte Abnormalities in Cystic Fibrosis.* San Francisco Press, Inc, San Francisco, 1982. Págs. 53-76.
  47. Quinton PM. *Cystic fibrosis: a disease in electrolyte transport.* FASEB J. 1990; 4: 2709-17.
  48. Bobadilla J, Macek M, Fine J, Farrel P. *Cystic Fibrosis: A Worldwide Analysis of CFTR Mutations-Correlation with Incidence Data an Application to Screening.* Hum Mutat. 2002; 19: 575-606.
  49. Lupski J, Stankiewicz P. *Genomic Disorders: Molecular Mechanisms for Rearrangements and Conveyed Phenotypes.* PLoS Genet. 2005; 1: 627-633.
  50. Stankiewicz P, Lupski J. *Genome architecture, rearrangements and genomic disorders.* Trends Genet 2002; 18: 74-82.
  51. Zielenski J, Tsui Lap-Chee. *Cystic fibrosis: Genotypic and Phenotypic Variations.* Annu. Rev. Genetics. 1995; 29: 777-807.

- 
52. Ogino S, Gulley M, et al. *Standard Mutation Nomenclature in Molecular Diagnostics*. J Mol Diagn. 2007; 9: 1-6.
53. Stern R. *The Diagnosis of Cystic Fibrosis*. New Engl J of Med. 1997; 336: 487-491.
54. Chu C-S, Trapnell B, Murtagh J, Moss J, Dalemans W, Jallat S, Mercenier A, Pavirani A, Lecocq J, Cutting G, Guggino W, Crystal R. *Variable detections of exon 9 coding sequences in Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator gene mRNA transcripts in normal bronchial epithelium*. EMBO J. 1991; 10: 1355-1363.
55. Dean M, Santis G. *Heterogeneity in the severity of cystic fibrosis and the role of CFTR gene mutations*. Hum Genet. 1994; 93: 364-368.
56. Farrell PM. *Improving the health of patients with cystic fibrosis through newborn screening*. Adv. Ped. 2000; 49: 79-115.
57. Knowles MR, Clarke LL, Boucher RC. *Activation of extracellular nucleotides of chloride secretion in the airway epithelia of patients with CF*. N Engl Med. 1999; 325-533.
58. Zielenski J, Fujiwara TM, Markiewicz D, Paradis AJ, Anacleto AI, Richards B, Schwartz RH, Klinger KW, Tsui LC, Morgan K. *Identification of the M1101K mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene and complete detection of cystic fibrosis mutations in the Hutterite population*. Am J. Hum. Genet. 2000; 52: 609-615.
59. Férec C, Audrezet MP, Mercier B, Guillermit H, Moullier P, Quere I, Verlingue C. *Detection of over 98% cystic fibrosis mutations in a Celtic population*. Nat. Genet. 1992; 1: 188-191.
60. Kérem E, Kalman Y, Yahav Y, Shoshani T, Abeliovich C, Szeinberg A, Rivlin J, Blau H, Tal A, Ben-Tur L, Spinger C, Augarten A, Godfrey S, Lerer I,

- 
- Branski D, Friendman M, Kérem B. *Highly variable incidence of cystic fibrosis and different mutation distribution among different Jewish ethnic groups in Israel*. Hum Genet. 1995; 96: 193-197.
61. Estivill X, Bancells C, Ramos C, Biomed CF Mutation Analysis Consortium. *Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations*. Hum. Mutat. 1997; 10: 135-154.
62. Solari Alberto. *Genética Humana*. 3era edición, Editorial Médica Panamericana, 2004, Argentina. Págs. 187-191.
63. Plotkowski M, Chevillard M, Pierrot D, Altemayer D, Zahm J, Colliot G, Puchelle E. *Differential adhesion of Pseudomonas to human respiratory epithelial cells in primary culture*. J Clin Invest. 1991; 87: 2018-2028.
64. Ramphal R, Pier G. *Role of Pseudomonas aeruginosa mucoid exopolysaccharide in adherence to trachea cells*. Infect Immun. 1985; 47: 1-4.
65. Demko C, Byard P, Davis P. *Gender differences in cystic fibrosis: Pseudomonas aeruginosa infection*. J Clin Epidemiol. 1994; 48: 1041-1049.
66. Ratjen F, Döring G. *Cystic fibrosis*. Seminar. Lancet. 2003; 361: 681-689.
67. Kopelman H, Durie P, Gaskin K, et al. *Pancreatic fluid secretion and protein hyperconcentration in cystic fibrosis*. N Engl J Med. 1985; 312: 329-334.
68. Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, et al. *Defective intracellular traffic and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis*. Cell 1990; 63: 827-834.
69. Shepherd R, Thompson M, Greer R, et al. *Factors affecting nutrition in early cystic fibrosis: Resting energy expenditure, pulmonary inflammatory markers, body composition and genotype in a neonatally screened population*. Pediatric Pulmonol. 1999; 28: 260-274.

- 
70. Lai H, Kosorok M, Laxova A, et al. *Nutricional status of patients with cystic fibrosis with meconium ileus. A comparison with patients without meconium ileus and diagnosed early through neonatal screening.* Pediatrics. 2000; 105: 53-61.
71. Lannig S, Thornsteinsson B, Lund-Anderen C, et al. *Diabetes mellitus in Danish cystic fibrosis patients: prevalence and late diabetic complications.* Acta Paediatr. 1994; 83: 72-77.
72. Dodge JA. *Male fertility in cystic fibrosis.* Lancet. 1995; 346: 587-88.
73. Kopito LE, Kosasky HJ, Shwachman H. *Water and electrolytes in cervical mucus from patients with cystic fibrosis.* Fertil Steril. 1973; 24: 512-16.
74. Iannucci A, Mukai K, Johnson D, et al. *Endocrine pancreas in cystic fibrosis: An immunohistochemical study.* Hum Pathol. 1984; 15: 278-284.
75. Moran A, Diem P, Klein DJ, Levitt MD, Robertson RP. *Pancreatic endocrine function in cystic fibrosis.* J Pediatr. 1991; 118: 715-23.
76. Holl RW, Wolf A, Thon A, et al. *Insulin resistance with altered secretory kinetics and reduced proinsulin in cystic fibrosis patients.* J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1997; 25: 188-193.
77. Lannig S, Thoresteinsson B, Nerup J, et al. *Influence of the development of diabetes mellitus on clinical status in patients with cystic fibrosis.* Eur J Pediatr. 1992; 151: 684-687.
78. Bhudhikanok GS, Jean Lim BA, Marcus R, et al. *Correlates of osteopenia in cystic fibrosi.* Pediatrics. 1996; 97: 103-110.
79. *Consensus Development Conference Prophylaxis and treatment of osteoporosis.* Osteoporosis International 1991; 1: 114-117.

- 
80. Pertuiset E, Menkes CJ, Lenoir G, et al. *Cystic fibrosis arthritis. A report of five cases*. Br J Rheumatol. 1992; 31: 535-538.
81. Turner MA, Baildam E, Pate L, et al. *Joint disorders in cystic fibrosis*. J R Soc Med. 1997; 90: 13-20.
82. Wulffraat NM, de Graeff-Mender ER, Rijkers GT, et al. *Prevalence of circulating immune complexes in patients with cystic fibrosis and arthritis*. J Pediatr. 1994; 125: 374-8.
83. Noone PG, Bresnihan B. *Rheumatic Disease in Cystic fibrosis*. In: Yankaskas JR, Knowles MR editors. Cystic Fibrosis in Adults. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 1999; 439-447.
84. Cohen AM, Yulish BS, Wasser KB, et al. *Evaluation of pulmonary hypertrophic osteoarthropathy in cystic fibrosis. A comprehensive study*. Am J Dis Chest. 1986; 140: 74-77.
85. Crawford AM, Rabin HR, Fritzler MJ. *Hypertrrophic pulmonary osteoarthropathy cystic fibrosis*. Rheumatol Int. 1985; 5: 283-284.
86. Lawrence JM, Moore TL, Madson KL, et al. *Arthropathies of cystic fibrosis: case reports and review of the literature*. J Rheumatol Suppl. 1993; 38: 12-15.
87. Dixey JJ, Reddington AN, Butter RC, et al. *The arthropathy of cystic fibrosis*. Ann Rheum Dis. 1988; 47: 218-23.
88. Finnegan MJ, Hunchcliffle J, Russell-Jones D, et al. *Vasculitis complicating cystic fibrosis*. Q J Med. 1989; 72: 609-21.
89. Rosenstien B, Cutting G. *The diagnosis of cystic fibrosis: A consensus statement*. J Pediatr. 1998; 132: 589-95.

- 
90. Highsmith WE, Burch LH, Zhou Z, Olsen JC, Boat TE, Spock S, et al. *A novel mutation in the cystic fibrosis gene in patients with pulmonary disease but normal sweat chloride concentrations*. N Engl J Med. 1994; 31: 974-80.
91. Scotet V, Braekeleer M de, Roussey M, et al. *Neonatal screening for cystic fibrosis in Brittany, France: assessment of 10 years' experience and impact on prenatal diagnosis*. Lancet. 2000; 356: 789-94.
92. Farrell PM, Kosorok MR, Rock MJ, et al. *Early diagnosis of cystic fibrosis through neonatal screening prevents severe malnutrition and improves long-term growth*. Pediatrics. 2001; 107: 1-13.
93. Farrell PM, Sheng G, Splaingard M, et al. *Acquisition of Pseudomonas aeruginosa in children with cystic fibrosis*. Pediatrics. 1997; 100: 1-9.
94. National Committee for Clinical Laboratory Standard. *Sweat testing: simple collection and quantitative analysis-approved guideline (Document C34-A)*. Wayne PA: The committee; 1994.
95. Knowles M, Gauzy J, Boucher RC. *Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis*. N Engl J Med. 1981; 305: 1489-95.
96. Delmarco A, Pradal U, Gabrini G, Bonizzato A, Mastella G. *Nasal potential difference in cystic fibrosis patients with borderline sweat test*. Isr J Med Sci. 1996; 32: Suppl 32:S183.
97. Dequeker E, Stuhmann M, Morris M, et al. *Best practice guidelines for molecular genetics diagnosis of cystic fibrosis ad CFTR-related disorders-updated European recommendations*. Euro J of Human Genet. 2009; 17: 51-65.
98. Steinkamp G, Tümmler H, Gappa M, et al. *Long-term tobramycin inhalation in cystic fibrosis*. Pediatr Pulmonol. 1989; 6: 91-98.

- 
99. Jensen T, Pedersen SS, Garne S, et al. *Colistin inhalation therapy in cystic fibrosis patients with chronic P aeruginosa infection*. J Antimicrob Chemother. 1987; 19: 831-38.
100. Kudoh S, Azuma A, Yamamoto M, et al. *Improvement of survival in patients with diffuse panbronchiolitis treated with low-dose erythromycin*. Am J Respir Crit Care Med. 1998; 157: 1829-32.
101. Fuchs HJ, Borowitz DS, Christiansen DH, et al. *Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis*. N Engl J Med. 1994; 331: 637-42.
102. Suri R, Metcalfe C, Less B, et al. *Comparison of hypertonic saline and alternative-day or daily recombinant human deoxyribonuclease in children with cystic fibrosis: a randomised trial*. Lancet. 2001; 358: 1316-21.
103. Vasconcellos C, Allen P, Wohl M, Drazen J, Janmey P, Stossel T. *Reduction in viscosity of cystic fibrosis sputum in vitro by gelsolin*. Science. 1994; 263: 969-71.
104. Hamilton JW. *Gentamicin in pharmacogenetic approach to treatment of cystic fibrosis*. Lancet. 2001; 358: 2014-16.
105. Flotte TR, Laube BL. *Gene therapy in cystic fibrosis*. Chest. 2001; 120: 124S-31S.
106. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Second edition, United States of America, 1989. Págs. 5.1-6.12.
107. Bartlett JM, Stirling D. *A short history of the polymerase chain reaction*. Methods Mol Biol. 2003; 226: 3-6.

- 
108. Boyer R. *Conceptos de Bioquímica*. International Thomson Editors, México, 2001. Págs. 396-398.
  109. Eshaque B, Dixon B. *Technology platforms for molecular diagnosis of cystic fibrosis*. *Biotech Adv.* 2006; 24: 86-93.
  110. Tomaiuolo R, Spina M, Castaldo G. *Molecular diagnosis of cystic fibrosis: comparison of four analytical procedures*. *Clin Chem Lab Med.* 2003; 41: 26-32.
  111. Sanger F, Coulson AR. *A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase*. *J Mol Biol.* 1975; 94: 441-448.
  112. Hantash FM, Milunsky A, Wang Z, Anderson B, Sun W, Anguiano A and Strom CM. *A large deletion in the CFTR gene in CBAVD*. *Genet Med.* 2006; 8: 93-95.