

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

E. A. P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**Mutaciones más frecuentes en el gen CFTR de
pacientes diagnosticados con fibrosis quística del
Instituto Especializado de Salud del Niño**

Tesis

para optar el título profesional de Químico Farmacéutico

AUTORA

Cinthy Anabhela Silva Acuña

Asesor

Amparo Iris Zavaleta Pesantes

Lima – Perú

2008

*“Cuando una persona desea realmente algo, el
Universo entero conspira para que pueda
realizar su sueño. Basta con aprender a
escuchar los dictados del corazón y a descifrar
un lenguaje que esta más allá de las palabras, el
que muestra aquello que los ojos no pueden
ver.”*

Paulo Coelho

Este trabajo de tesis esta dedicado:

*A mis padres Oscar y Olga
con mucho amor y gratitud
por su paciencia y apoyo incondicional
durante todas las etapas de mi vida.*

*A mi hermano Oscar
a quien quiero mucho y agradezco
por sus ánimos constantes.*

A mí querida familia por su cariño y confianza.

*A la memoria de mi Abuelita Heroína por el amor brindado
y los consejos recibidos durante mi niñez*

*A mi gran amor Luis Alfredo R.
a quien admiro y quiero mucho por su paciencia,
comprensión en todo momento
y por acompañarme en los momentos más
difíciles.*

*A la memoria de Bryan Valenzuela Cuestas,
Por dejarnos conocer su historia
y motivar este trabajo de investigación.*

Agradecimientos

*A Dios por ser mi motivación, por darme la vida,
salud y fuerzas necesarias para hacer realidad los objetivos
trazados en mí vida, además de ser mi mejor amigo.*

A mis padres, hermano y familia

A los miembros del jurado examinador y calificador:

Presidenta: Dra. María Elizabeth González Loayza

Miembros: Mg. Elena Benavides Rivera

Q.F. Antonio Almonacid Moscoso

Q.F. María Elena Salazar Salvatierra

Por sus sugerencias y consejos que han permitido enriquecer este trabajo.

Un agradecimiento muy especial a:

Dra. Amparo I. Zavaleta Pesantes

Porque con su experiencia y el tiempo invertido en la dirección de este trabajo han permitido la ejecución y el término de esta Tesis.

*Un agradecimiento sincero a los padres y niños de
la Asociación Nacional Contra la Fibrosis Quística,
gracias a su aporte valioso en el presente estudio de investigación*

*A mi promoción de la
Facultad de Farmacia y Bioquímica por la
amistad entregada con quienes compartí las aulas
de estudio y momentos agradables*

INDICE

RESUMEN

SUMMARY

ABREVIATURAS

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Objetivos	3
---------------------	---

II. ANTECEDENTES

2.1. Fibrosis Quística.....	4
2.1.1. Fisiopatología de la fibrosis quística	5
2.1.2. Manifestaciones clínicas	5
2.1.1.1 Manifestaciones clínicas respiratorias.....	6
2.1.1.2 Manifestaciones nutricionales y gastrointestinales.....	6
2.1.3. Gen <i>cftr</i>	8
2.1.4. Proteína CFTR	8
2.1.4.1 Formación y estructura de la CFTR	8
2.1.4.2 Función de la CFTR.....	10
2.1.5. Mutaciones de la FQ.....	12
2.1.6. Clasificación de las mutaciones de la CFTR.....	12
A. Clase I : Defecto en la síntesis de la CFTR.....	13
B. Clase II : Defecto en el procesamiento.....	14
C. Clase III : Defecto en la regulación.....	15
D. Clase IV: Defecto en la conductancia.....	15

E. Clase V : Defecto parcial en la producción o en el procesamiento.....	16
F. Clase VI: Defecto en la regulación de otros canales.....	17
2.1.7. Mutaciones más frecuentes de la fibrosis quística	18
2.1.7.1 Mutación $\Delta F508$	20
2.1.7.2 Mutación G542X.....	21
2.1.7.3 Mutación G551D.....	22
2.1.7.4 Mutación R553X.....	22
2.2. Técnicas biomoleculares	23
2.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa	23
2.2.2. PCR-RFLP	24
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. Diseño del estudio	25
3.2. Universo.....	25
3.3. POBLACIÓN DE ESTUDIO	25
3.3.1. Población piloto	25
3.3.2. Criterios de inclusión.....	25
3.3.3. Criterios de exclusión	26
3.3.4. Técnica de muestreo	26
3.4. Muestra biológica	27
3.5. Lugar de ejecución del estudio	27
3.6. Soluciones	27

3.7.METODOS.....	29
3.7.1. Genotipificación de las mutaciones Δ F508, G542X, G551D y R553X.....	29
3.7.1.1. Extracción y purificación del ADN genómico	29
3.7.1.2. Amplificación de los exones 10 y 11 del gen <i>cftr</i>	30
3.7.1.3. Restricción de los productos amplificados	31
IV. RESULTADOS	
4.1. Pacientes	33
4.2. Extracción de ADN genómico	33
4.3. Reacción en cadena de la polimerasa	34
4.3.1. Productos de PCR y digestión de los productos	34
4.4. Análisis de las secuencias nucleotídicas	38
4.4.1 Análisis de la secuencia nucleotídica de la mutación Δ F508.....	38
4.4.2 Análisis de la secuencia nucleotídica de las mutaciones G542X, G551D y R553X.....	39
V. DISCUSIÓN	41
VI. CONCLUSIONES	43
VII. RECOMENDACIONES	44
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICA	45
IX. INDICE DE FIGURAS	51
X. INDICE DE TABLAS	52
XI. INDICE DE ANEXOS	53

ABREVIATURAS

FQ	:	Fibrosis Quística
CFTR	:	Proteína Reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística
ADN	:	Acido desoxirribonucleico
ARN	:	Acido ribonucleico
dNTP	:	Desoxinucleótidos trifosfato
EDTA	:	Etilen diamino tetra acético
NADH	:	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
pb	:	Pares de bases
PCR	:	Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la Polimerasa)
RFLP	:	Restriction fragment length polymorphism (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción)
STE	:	Sodio tris EDTA
TAE	:	Tris acetato EDTA
TBE	:	Tris borato EDTA
U	:	Unidades
v	:	Volumen
Mbo I	:	<i>Moraxella bovis</i>
Bst O I	:	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
Hinc II	:	<i>Haemophilus influenzae</i>

RESUMEN

En este trabajo se determinó la frecuencia de las mutaciones $\Delta F508$, G542X, G551D y R553X, en el gen *cftr* de pacientes diagnosticados con fibrosis quística (FQ) del Instituto Especializado de Salud del Niño. Participaron doce niños del servicio de neumología diagnosticados con FQ, en cada caso los padres de los pacientes firmaron un consentimiento informado, previo a su inclusión en el estudio. Se tomaron muestras de leucocitos de sangre venosa para extraer ADN genómico y se amplificaron regiones específicas del gen *cftr* por la reacción en cadena de la polimerasa con cebadores específicos diseñados para detectar las mutaciones: $\Delta F508$ en el exón 10; y G542X, G551D y R553X en el exón 11. Los productos amplificados fueron cortados con las enzimas *MboI*, *Bst O1*, *Hinc II* y *MboI* respectivamente. Se identificaron: un paciente homocigoto para la $\Delta F508$, cuatro pacientes heterocigotos $\Delta F508$ /OTRA, un paciente homocigoto para la G542X, y seis pacientes OTRA/OTRA. Las mutaciones G551D y R553X no fueron detectadas en este trabajo. Las frecuencias alélica para las mutaciones $\Delta F508$ y G542X fueron 25% y 8.3% respectivamente.

Palabras Clave: Fibrosis Quística, gen *cftr*, Mutación $\Delta F508$, Mutación G542X, RFLP-PCR.

SUMMARY

In this study we determined the frequency of the mutations $\Delta F508$, G542X, G551D and R553X, in the CFTR gene of patient diagnosed with cystic Fibrosis (CF) of the “Instituto Especializado de Salud del Niño”. Study the DNA of twelve individuals diagnosed with CF, all of them taken care of in the Pneumology Service of the “Instituto Especializado de Salud del Niño”. In each case the parents of the patients signed an informed consent, previous to their include in the study. Genomic DNA was extracted from leukocytes that it was isolated of a sample of blood, then were amplified by PCR by specific primers for the exon 10 (Mutation $\Delta F508$) and exon 11 (Mutations G542X, G551D and R553X). The products of amplification were analyzed by restriction enzymes *MboI*, *BstOI* and *Hind II* respectively. We identify a patient homozygote for it $\Delta F508$, four patients heterozygote $\Delta F508$ /OTHER, one patient homozygote for the G542X, and six patients OTHER / OTHER. The mutations G551D and R553X were not found. The mutation $\Delta F508$ presented a allelic frequency of 25 %, whereas the mutation G542X was found in 8.3 %

Key words: Cystic fibrosis, *cftr* gene, $\Delta F508$ mutation, G542X mutation, RFLP –PCR.

I. INTRODUCCIÓN

La Fibrosis Quística (FQ) es una enfermedad multisistémica originada por defectos genéticos que alteran el flujo de iones y por tanto del agua causando secreciones viscosas y está frecuentemente asociada a poblaciones de origen caucásico. A nivel mundial, la incidencia de FQ es de 1 en 2 500 a 1 en 4 000 recién nacidos vivos y tiene una frecuencia de portadores variable que dependen de la constitución étnica de cada país así se ha descrito uno en cada 20 ó 25 nacidos vivos^{1,2}.

La proteína transportadora de cloro denominada CFTR que significa reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística es codificada por el gen *cftr*³ en el cual se han descrito aproximadamente 1593 mutaciones, siendo las más frecuentes: Δ F508, G542X, G551D y R553X; las cuales representan el 70.0, 2.4, 1.6 y 0.7 % de los casos de FQ respectivamente⁴.

La FQ afecta principalmente las vías respiratorias, gastrointestinales y las glándulas sudoríparas de la piel, siendo sus manifestaciones clínicas más importantes: infecciones respiratorias recurrentes, síndrome de malabsorción intestinal, alteración del contenido de electrolitos en el sudor, íleo meconial al nacer, deficiencia en el crecimiento, ocasionalmente cirrosis u otras formas de disfunción hepática o insuficiencia pancreática, infertilidad masculina debido a azoospermia, infecciones por *Staphylococcus aureus* o *Pseudomonas aeruginosa* en el tracto respiratorio, etc.⁸.

En el Perú, según el censo del 2007 se registro una población de 28 220 764 habitantes y se estimó una tasa bruta de natalidad de 20 por cada 1000 habitantes⁶, tomando como

incidencia 1 en 9000 de los recién nacidos vivos hijos de hispanos en los Estados Unidos^{7,8}, se estima que nacerán anualmente 71 niños con FQ en Perú.

En este estudio se busca determinar la frecuencia de las mutaciones Δ F508, G542X, R553X y G551D en el gen *cftr* de pacientes diagnosticados con FQ del Instituto Especializado de Salud del Niño, con el fin de contribuir en el diagnóstico, tratamiento y en una mejor calidad de vida del paciente.

1.1 OBJETIVOS

Objetivo General:

Determinar las mutaciones $\Delta F508$, G542X, G551D y R553X en el gen *cftr* de pacientes diagnosticados con FQ del Instituto Especializado de Salud del Niño.

Objetivos Específicos:

1. Estandarizar la reacción en cadena de la polimerasa y el polimorfismo en longitud de los fragmentos de restricción.
2. Analizar e interpretar los perfiles de restricción de los productos amplificados.

II. ANTECEDENTES

2.1 Fibrosis Quística

La Fibrosis Quística (FQ) es una enfermedad de prevalencia desconocida en el Perú, sin embargo se han realizado algunos trabajos de investigación relacionados con esta enfermedad. En 1966, Tori describió 3 casos de FQ, los cuales fueron diagnosticados clínicamente y con pruebas de sudor no estandarizadas⁹.

En 1994, Aguirre I y col. reportaron 9 casos de pacientes con diagnóstico altamente sugerente de fibrosis quística, la edad promedio de diagnóstico de la enfermedad fue desde los 10 meses a los 12 años¹⁰.

En 1998, Escalante R. reporta 10 casos de pacientes con diagnóstico sugerente de FQ atendidos en el Instituto Especializado de Salud del Niño (IESN), los datos fueron recolectados en el periodo de 1991 a 1996¹¹.

En el 2001, Torres V. describe 13 casos, con diagnóstico de FQ en pacientes cuyas edades fluctuaron desde un mes hasta los 9 años con 8 meses, todos ellos registrados desde enero de 1991 hasta abril del 2001. En este estudio se enfatiza que en los últimos años se ha incrementado el número de diagnósticos con FQ aproximadamente 13% con relación al año anterior⁸.

Actualmente, en los países desarrollados los individuos diagnosticados con FQ son sometidos a tratamientos terapéuticos avanzados, por lo que éstos tienen una esperanza de vida superior de 30 años; en cambio, en el Perú la esperanza

de vida sería menor. En Latinoamérica se calcula que más del 95 % de FQ no se diagnostican debido a la falta de sospecha clínica y de elementos adecuados para el diagnóstico¹².

2.1.1. Fisiopatología de la Fibrosis Quística

La FQ es una enfermedad multisistémica de evolución crónica, progresiva y letal originada por un defecto genético que altera el flujo de iones y por lo tanto del agua, lo cual produce secreciones densas y secas, las cuales son el origen de los signos y síntomas de la enfermedad. La obstrucción de las mucosas en las glándulas exocrinas es la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con FQ^{13,15}.

2.1.2. Manifestaciones Clínicas

Según Shwachman “La FQ se enmascara de diversas formas, lo que es causa de numerosos errores”. Las manifestaciones clínicas de la FQ dependen esencialmente de la edad del paciente, pues es una enfermedad progresiva y con predominio del órgano más afectado, lo que frecuentemente, pero no siempre, se correlaciona con el genotipo¹⁴.

Las manifestaciones clínicas de la FQ al ser muy variadas, se pueden clasificar de la siguiente manera:

- A. Manifestaciones clínicas respiratorias**
- B. Manifestaciones nutricionales y gastrointestinales**

A. Manifestaciones clínicas respiratorias

El transporte de electrolitos es parcialmente responsable de la cantidad y de la composición del fluido en la superficie de la vía aérea. El esputo espeso que se ve típicamente en los pacientes FQ puede ser el resultado de una baja hidratación del fluido que recubre la superficie de la vía aérea secundaria a una secreción anormal de cloro y a una hiperabsorción del sodio. Los tapones mucosos resultantes, impiden la limpieza ciliar normal y por lo tanto la sobrecolonización con bacterias, las cuales inducen una respuesta inflamatoria responsable de la destrucción final del tejido pulmonar.

La pérdida de agua incrementa la viscosidad del moco y dificulta el *clearance* mucociliar y el reflejo de la tos. Las bacterias que invaden el pulmón son atrapadas en este moco espeso en el borde apical de la célula en donde encuentran un medio microaerófilo con condiciones favorables para crecer. En los últimos años, diversos estudios han facilitado el mejor entendimiento de los patógenos que frecuentemente habitan la vía aérea de los niños con FQ, éstos son: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenza*, etc.^{15, 16.}

B. Manifestaciones nutricionales y gastrointestinales

El compromiso pancreático comienza en la vida prenatal. La insuficiencia pancreática exocrina está presente en 80-85% de los pacientes con FQ. De aquellos con suficiencia pancreática, una proporción variable evoluciona hacia la insuficiencia, en especial los individuos que tienen la mutación $\Delta F508$. La actividad de lipasa es la más comprometida, pero también hay disminución de colipasa,

fosfolipasa A, tripsina, amilasa y de la secreción ductal de agua y bicarbonato, lo que lleva a una mala digestión de grasas y en menor grado de proteínas. La mantención de un pH ácido en segmentos altos del intestino facilita la inactivación de la lipasa, contribuyendo a la mala digestión de grasas. Clínicamente puede evidenciarse esteatorrea, pero en ocasiones se presentan deposiciones semilíquidas, e incluso estas pueden tener aspecto normal ¹⁶.

El retraso de crecimiento, la desnutrición y algunas carencias específicas son manifestaciones clínicas frecuentes en los pacientes con FQ, e incluso pueden constituir la forma de presentación en lactantes. Este es el caso de la tríada de anemia, hipoalbuminemia y edema en niños con lactancia materna exclusiva, y también la presentación con alteraciones cutáneas derivadas de la carencia de ácidos grasos esenciales que suele ser confundida inicialmente con dermatitis seborreica.¹⁷

De acuerdo a datos recientes de la Fundación Internacional de FQ, un 20% de los niños afectados presentan peso y/o talla por debajo del percentil 5 para la edad. El estado nutricional es un importante marcador de sobrevida en pacientes con FQ, ya que existe correlación entre el deterioro nutricional y el grado de compromiso de la función pulmonar. La malnutrición tiene un efecto deletéreo en los mecanismos de defensa, en la estructura pulmonar, en el control de la respiración y en la fuerza muscular, lo que se traduce en mayor fatigabilidad y menor calidad de vida; de aquí la importancia de un manejo nutricional adecuado, asociado a vigilancia nutricional periódica ^{15,18}.

2.1.3. Gen *cftr*

El gen *cftr* responsable de la FQ fue identificado mediante técnicas de clonación en 1989, se localiza en el brazo largo del cromosoma 7 en el sector denominado q31-q32^{19, 20}. Este gen mide aproximadamente 250 kilobases, 27 exones y transcribe un ARN mensajero de 6,500 bases, se expresa en las células secretorias, senos paranasales, pulmones, páncreas, hígado y tracto reproductivo. El producto del gen es una proteína de membrana que contiene 1 480 aminoácidos, esta proteína es denominada reguladora de la conductancia transmembrana de la FQ (CFTR, Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) y esta ubicada en la porción apical de la membrana de las células epiteliales²⁰.

2.1.4. Proteína CFTR

A) Formación y Estructura de la CFTR

La proteína CFTR es sintetizada en la membrana del retículo endoplásmico, luego pasa al aparato de Golgi donde es glicosilada y sufre un plegamiento sobre si misma para posteriormente pasar a través del citoplasma, acompañada por proteínas chaperonas, y finalmente localizarse en la membrana apical de los epitelios secretores de las glándulas exocrinas²⁰.

Estructuralmente es una proteína simétrica, compuesta de dos unidades estructurales homólogas, cada una de ellas contienen los dominios MSD1y MSD2 que se extienden a través de la membrana celular y contribuyen a la formación del poro del canal, dos dominios de hidrólisis de ATP también llamados

dominios de unión con nucleótidos (NBD1, NBD2), unidos por un dominio regulador central (R) rico en sitios de fosforilación. La estructura hipotética de la CFTR se ubicó dentro de la súper familia de transportadores “*ATP-binding cassette*” (ABC) reguladas por AMP cíclico, debido a que presenta la característica de esta familia de moléculas transportadoras de solutos a través de las membranas localizándose tanto en membranas celulares de células eucariotas como de procariontes; sin embargo, el dominio R es único del CFTR^{18,21-24}

Los dominios transmembrana MSD1 y MSD2 están constituidos por seis regiones dispuestas en línea y están separados por un citoplasma que contiene el primer dominio de unión a nucleótido (NBD1) y el dominio regulador (R). El segundo dominio de unión a nucleótido (NBD2) está presente en la porción carboxilo terminal de la proteína²³.

Una vez codificada la CFTR es integrada en la membrana del retículo endoplásmico, es N-glicosilada por la adición de dos grupos glicosilados incrementando su peso de 130 a 150 kDa^{21, 26}. Con la ayuda de moléculas chaperonas, como la calnexina y la Hsp70, la proteína es plegada, siendo resistente a las proteasas, y transportada al complejo de Golgi. Este proceso es aparentemente muy ineficiente ya que sólo el 25% de la proteína plegada adquiere una forma resistente a las proteasas y de esta manera puede ser transportada al complejo de Golgi²⁵. En este lugar, los grupos glicosilados son modificados dando como resultado una proteína madura de 170 kDa^{21, 26} (Figura 1).

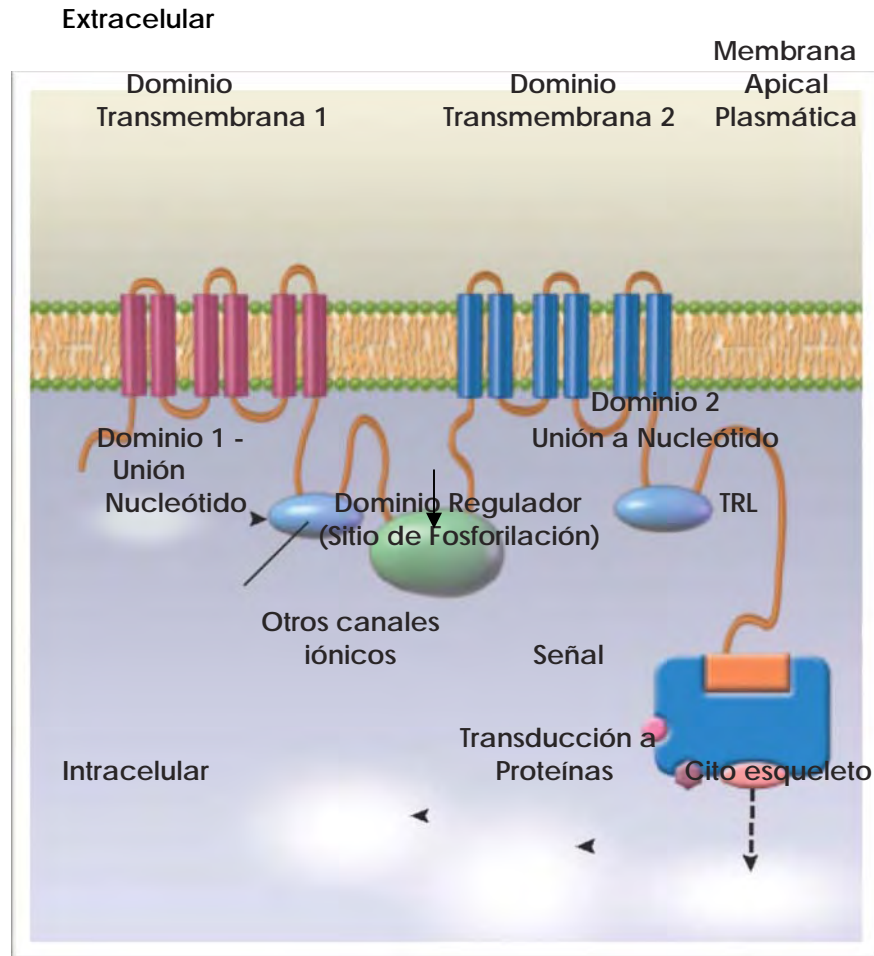


Figura N° 1: Estructura Hipotética de la CFTR¹⁸.

Tomado y modificado de Ratjen F, Doring G. Cystic fibrosis. Lancet 2003; 361:681-9

B) Función de la CFTR

Diferentes estudios han demostrado que el transporte de cloro a través de la membrana celular es regulado por la fosforilación de la Protein Kinasa A (PKA) dependiente de AMPc²⁴.

La activación del canal requiere de una preparación que es dada por la fosforilación del dominio R y posteriormente, necesita de una interacción con los dominios NBF

y con otras partes de la proteína. La activación del NBF1 es necesaria para la apertura del canal y determina el tiempo de cierre mientras que la función del NFB2 regula el tiempo de apertura y no es necesaria para iniciar la apertura del canal²⁶.

La CFTR se denominó inicialmente como un canal de cloro; sin embargo, la presencia de puntos de fosforilación y la capacidad de hidrólisis del ATP indican que la proteína requiere energía para realizar su función, lo que sugiere que actúa principalmente como un transportador de cloro²⁷. Existe controversia sobre si el CFTR actúa como un canal de cloro individual o como unidades de conducción compuestas por la unión de dos o más proteínas CFTR²⁸.

Recientemente ha llamado la atención la presencia de una cadena de cuatro aminoácidos localizada en la porción COOH terminal llamada dominio de unión PDZ. Los dominios PDZ están presentes en proteínas de señal intracelular y en otras proteínas asociadas a la membrana plasmática. Estudios experimentales han demostrado que estos dominios PDZ pueden funcionar como sitios de unión entre dos proteínas CFTR; así, los canales CFTR podrían formar de manera transitoria dímeros con alta actividad conductora de cloro²⁹. Sin embargo, estos hallazgos están aún por confirmar.

La función de la CFTR parece ir más allá de su papel como transportador de cloro. En humanos con FQ así como en ratones con deleciones inducidas del gen de la *cftr*, la ausencia de la CFTR influye en la expresión de otros productos del gen como la de proteínas importantes en la respuesta inflamatoria, en los

procesos de maduración, en el transporte de otros iones y de señales intracelulares²⁴.

2.1.5. Mutaciones de la FQ

A la fecha se encuentran registradas 1593 mutaciones en el *gen cfr*⁴ que figuran en la base de datos para mutaciones del Consorcio de Análisis Genético de la Fibrosis Quística (www.genet.sickkids.on.ca/cfr), que en su mayoría son mutaciones puntuales o microdeleciones y existen aproximadamente 200 polimorfismos que no causan enfermedad³¹. Diversas mutaciones causan defectos en la producción y en la función de la proteína CFTR por diversos mecanismos moleculares.

Según el consenso de 1998 de la Fundación de la Fibrosis Quística^{32,33}, para ser consideradas mutaciones deben cumplir con los siguientes criterios: causar cambios en la secuencia aminoacídica que afecte severamente la síntesis y/o función de la proteína, introducir una señal de término prematura, alterar los nucleótidos de los sitios intrónicos de maduración del ARNm, generar una secuencia aminoacídica nueva que no ocurra en los genes normales de al menos 100 portadores de mutaciones para la FQ del mismo grupo étnico⁴.

2.1.6. Clasificación de las mutaciones de la CFTR

Las mutaciones se han clasificado en 6 clases de acuerdo a la consecuencia que estas cumplen sobre la proteína y su función. (Figura 2)

A. Clase I. Defecto en la síntesis de la CFTR:

Las mutaciones de esta clase producen la síntesis defectuosa de la proteína por contener señales de terminación prematura y por ello generan un ARNm inestable o la producción truncada de una proteína. El mecanismo por el cual se termina la traducción, es altamente conservada entre la mayoría de los organismos y es casi siempre señalado por los codones de terminación o parada UAG, UAA o UGA. En el caso de estas mutaciones, existe la presencia de un codon de parada prematuro que dirigen la producción de un ARNm inestable, trayendo como consecuencia la ausencia de la síntesis de la proteína CFTR o la síntesis de una proteína anormal, la cual tiende a ser inestable y a degradarse relativamente rápido en el citoplasma o que se desprende fácilmente de la membrana celular²⁹. Cerca del 5 al 10% de las mutaciones del gen *cftr* son debidas a este defecto de transcripción y se denominan con una X como la G542X. La mutación G542X es la mutación más frecuentemente encontrada en España después de la $\Delta F508^4$. El efecto neto de las mutaciones de esta clase es el de ausencia de la proteína CFTR en la membrana apical de las células.

Cuando se produce esta clase de mutación se espera que se produzcan pocos canales de cloro o ninguno. Por ello, en los pacientes portadores de mutaciones pertenecientes a esta clase no se espera que la proteína CFTR sea perceptible en la membrana apical de las células epiteliales respiratorias²⁹.

B. Clase II. Defecto en el procesamiento

Después de ser traducido en un péptido en los ribosomas, la proteína CFTR experimenta una serie de procesos de glicosilación y plegamiento, en el Retículo Endoplasmático (RE) y el Aparato de Golgi. Las mutaciones de la clase II causan la debilitación de este proceso debido a que se produce la síntesis de una proteína CFTR que no puede plegarse correctamente y asumir su configuración terciaria apropiada. Por lo tanto la proteína es retenida en el RE y es reconocida para la degradación. Los mecanismos de control de calidad en el RE reconocen un error en el plegamiento o pueden ser también cuando la proteína es colocada parcialmente en la membrana; por ello las proteínas secretoras bloquean la salida de esta hacia otro compartimiento distal, esperando así la señal para ser degradada por proteosomas citoplasmáticos²⁹.

A esta clase pertenece la mutación $\Delta F508$ que es la mutación con una prevalencia mayor en todos los grupos étnicos. Otras mutaciones clínicamente importantes como la N1303K, I507del, R1066C o la G85E pertenecen a esta clase⁴.

Las mutaciones de la clase II están distribuidas a lo largo de todo el gen del CFTR. El defecto en la maduración de la proteína está relacionado, con mayor frecuencia, con mutaciones que afectan la síntesis del dominio NBD1. Esto sugiere que el patrón de plegamiento del NBD1 o de las secuencias contiguas es muy sensible a los cambios debidos a las mutaciones. El efecto neto en este grupo es el de ausencia de la proteína CFTR en la membrana apical de las células²⁹.

C. Clase III. Defecto en la regulación

La fosforilación de la proteína CFTR por una proteína kinasa y la defosforilación por la proteína fosfatasa son considerados los principales caminos por los cuales la actividad de la CFTR o canal de cloro es regulada fisiológicamente. En esta clase de mutación la proteína se produce y procesa en el citoplasma, se transporta e inserta en la membrana apical de la célula, sin embargo es resistente a la fosforilación y a la unión con el ATP, esto quiere decir que se produce un defecto en la actividad reguladora de la proteína CFTR o canal de cloro²⁹.

Estas mutaciones afectan el proceso de regulación al impedir la unión del ATP y la hidrólisis de los dominios NBD1 y NBD2 requeridos para la activación del canal. Las alteraciones en el dominio NBD1 pueden afectar también la regulación de otros canales como el ORCC o el canal de potasio ROMK²⁺. El efecto neto de la CFTR es una cantidad normal no funcional en la membrana apical de las células²⁹. La mutación sin sentido G551D es un ejemplo de mutaciones de la clase III⁴.

D. Clase IV. Defecto en la conductancia

La mayoría de las mutaciones diagnosticadas hasta la fecha se localizan en la región del dominio MSD1, el cual está implicado en la formación del poro del canal. En esta clase de mutación la proteína CFTR también puede ser producida, procesada, e insertada en la membrana apical, sin embargo, la

conductancia a través del canal esta alterada, pero la proteína mantiene cierta función residual²⁹.

Entre las mutaciones más frecuentes de la clase IV se encuentran la R117H, R347P y la R334W. El efecto neto es la presencia de una cantidad normal del CFTR en la membrana apical pero presentan una reducción en el transporte de cloro en este canal³³.

E. Clase V. Defecto parcial en la producción o en el procesamiento

En esta clase de mutación se presenta una reducida síntesis de CFTR. Por ello se origina una disminución de la cantidad de proteína CFTR activa presente en la membrana apical; y pueden asociarse a mutaciones del promotor o a un tráfico ineficaz²⁹.

Por esta razón, solamente se afectan los órganos altamente sensibles a la disfunción del CFTR. Estas mutaciones no se asocian únicamente a pacientes con cuadros clásicos de fibrosis quística sino también a pacientes con enfermedades mono sintomáticas. Algunas mutaciones encontradas con una frecuencia relativa alta como la 2789+5G→A o la 3849+10kbC→T, pertenecen a esta clase. El efecto neto es una cantidad funcional reducida de la CFTR en la membrana apical³³.

F. Clase VI. Defecto en la regulación de otros canales.

En esta clase se agrupan mutaciones que afectan las propiedades reguladoras del CFTR sobre otros canales de iones como el ORCC o el ENAC³³.

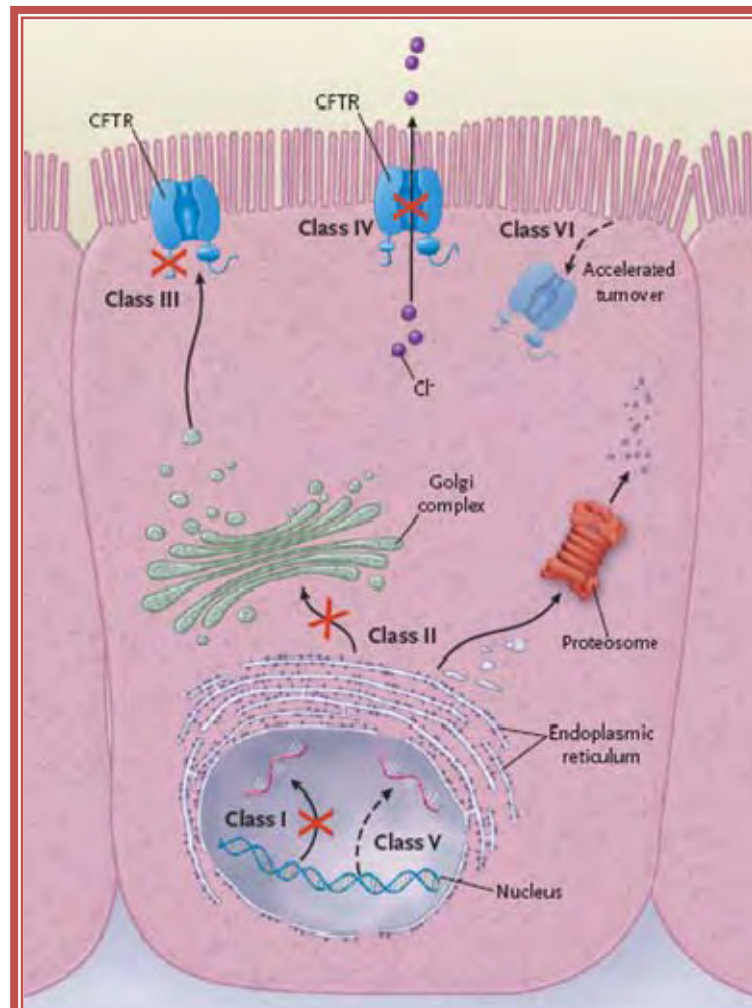


Figura N° 2. Clases de Mutaciones en el gen *cfr*

Clase de defectos en el gen *cfr* incluye la ausencia de síntesis (clase I); defecto de la maduración de la proteína y degradación prematura (clase II); desorden en la regulación, como la disminución de la unión a ATP e Hidrólisis (clase III); defecto en la conductancia del cloro (clase IV); reducida síntesis de CFTR (clase V); y una acelerada expulsión de la proteína de la superficie celular (clase VI)¹⁸.

Tomado de Ratjen F, Doring G. *Cystic fibrosis. Lancet* 2003; 361:681-9

2.1.7. Mutaciones más frecuentes de la Fibrosis Quística

Se ha observado una gran variedad en el espectro de las mutaciones del gen *cftr*, particularmente en el Sur de Europa y América Latina. Al parecer este fenómeno está relacionado con la composición étnica de cada región, por ejemplo, la distribución de la mutación más común, la $\Delta F508$, varía de un máximo del 100% en Dinamarca hasta 24.5% en Turquía⁴.

Sin embargo en poblaciones con predominancia de la raza caucásica, la mutación $\Delta F508$ es muy frecuente, por ello la búsqueda de las cuatro mutaciones más frecuentes en el gen *cftr* $\Delta F508$, G542X, R553X y G551D logra la detección del 85 a 90% de los alelos asociados a la FQ⁴.

Las otras mutaciones en el *gen cftr* son poco comunes y aunque algunas son frecuentes en ciertas poblaciones, la mayoría se presentan en menos de 1% de los cromosomas FQ. Inclusive, la segunda mutación más común (G542X), se detecta sólo en 2.4% de los alelos *cftr* afectados en todo el mundo, exceptuando en España y las Islas Canarias, que se ha detectado en una proporción más alta¹ (Tabla N° 1).

Tabla N° 1. Mutaciones más frecuentes en el gen *cfr* y poblaciones con alta prevalencia.

Mutación	Frecuencia	(%)	Poblaciones con mutaciones específicas de alta prevalencia
ΔF508	28,948	(66.0)	
G542X	1,062	(2.4)	Española
G551D	717	(1.6)	Inglesa
N1303K	589	(1.3)	Italiana
W1282X	536	(1.2)	Judía-Asquenazi
R553X	322	(0.7)	Alemana
621+1G->T	315	(0.7)	Francesa- Canadiense
1717-1G->A	284	(0.6)	Italiana
R117H	133	(0.3)	
R1162X	125	(0.3)	Italiana
R347P	106	(0.2)	
3849+10kbC->T	104	(0.2)	
ΔI507	93	(0.2)	
394delTT	78	10-30	Nórdico, Finlandia
G85E	67		
R560T	67		
A455E	62		
1078delT	57		
2789+5G->A	54		Española
3659delC	54		
R334W	53		
1898+1G->T	53		
711+1G->T	49		Franco-Canadiense
2183AA->G	40		Italiana
3905insT	38	6-17	Suiza
S549N	30		
2184delA	29		
Q359K/T360K		87.5	Judío – Georgiano
M1101K		69	
Y122X		48	Francesa
1898+5G->T		30	China – Taiwanés
3120+1G->A		11	Áfrico Americano
I148T		9.1	Franco- Canadiense

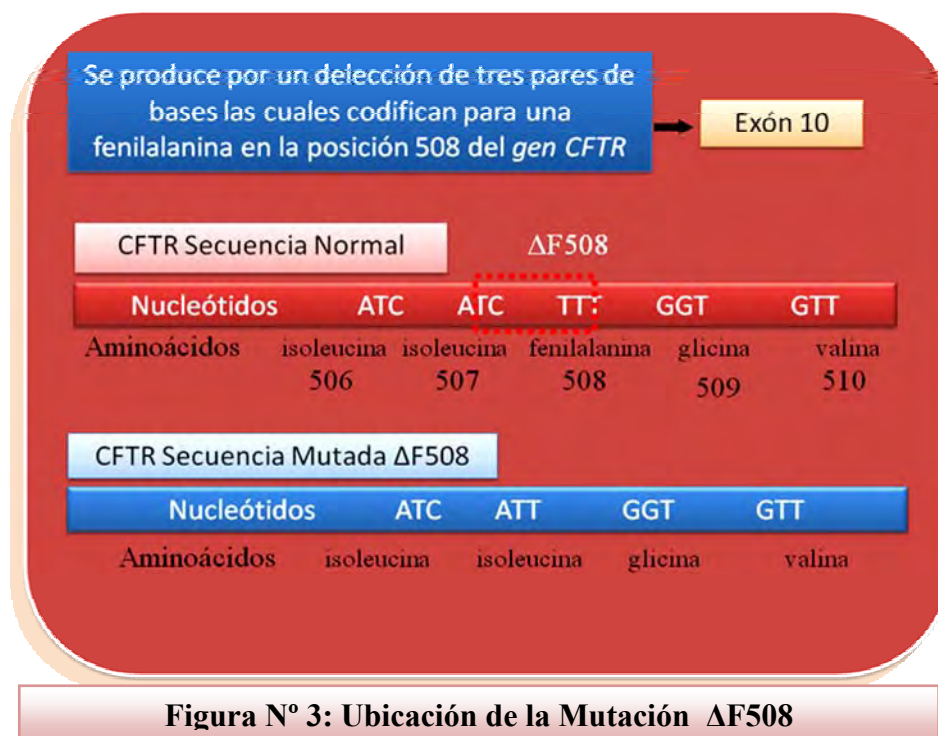
Datos obtenidos del consorcio de Análisis Genético de la FQ (1994). La frecuencia esta basada en el screening de 43849 cromosomas FQ, aunque no todos ellos han sido analizados para las mutaciones identificadas. En pacientes de origen caucásico a excepción de observaciones que indiquen lo contrario⁴.

A. Mutación $\Delta F508$

La $\Delta F508$ fue clasificada como un tipo de mutación de clase II en base a estudios que demostraron que la proteína CFTR mutada era sintetizada pero no maduraba de manera adecuada.

Esta mutación consiste en la delección de tres pares de bases del exón 10 del *gen cfr* esta delección produce la pérdida del aminoácido fenilalanina en la posición 508 la cual afecta la síntesis del primer dominio de unión a nucleótido (NBD1), lo que resulta en un defecto en el plegamiento, y con ello una destrucción prematura de la proteína⁴.

En la **figura N° 3** se muestra parte del exón 10, y se señala la ubicación de la mutación $\Delta F508$.



La $\Delta F508$ con frecuencia representa el 70% de la población total de pacientes con FQ, aunque la proporción de este alelo varía considerablemente en función a la composición étnica de las poblaciones, así encontramos que en España se han publicado valores promedio de frecuencias del 50%³², mientras que en Latinoamérica la frecuencia oscila entre valores relativamente bajos, aunque es de notarse que existe una variación entre los diferentes países: Argentina 57.0%³⁵, Brasil 48.0%³⁶, México 40.7%³⁷, Colombia 41.8%³⁸, Venezuela 29.6%³⁹ y Chile 22.0%⁴⁰. Es posible que aunque estas poblaciones están formadas por nativos, blancos, negros y las mezclas de las diferentes razas, estas variaciones se deban a que existen diferencias significativas en las proporciones de los subgrupos de cada país.

B. Mutación G542X

La Mutación G542X se encuentra en el exón número once del gen *cftr* y pertenece a la Clase de mutaciones 1 también llamada mutación de la edición. Esta mutación se produce por el cambio puntual de una guanina por una timina en la posición 542 del aminoácido glicina en el gen *cftr*, lo cual lleva a la formación del codón TGA (codón de parada), este cambio produce por error que se finalice la formación de la proteína. El efecto neto de la mutación de esta clase es la ausencia de la proteína CFTR en la membrana apical de las células. La mutación G542X es la mutación más frecuentemente encontrada en España después de la $\Delta F508$ ⁴.

C. Mutación G511D

La mutación G551D se produce por un cambio entre la glicina y el ácido aspártico en la posición del codón 551 en el exón número 11 del *gen cfr*. La mutación G551D se localiza en el primer dominio NBD por ello interfiere con la hidrólisis del ATP. Esta mutación produce una proteína sintetizada, procesada, transportada e insertada en la membrana apical correctamente; sin embargo presenta una fuerte reducción de la actividad de este canal.

Esta es la tercera mutación más común, con una frecuencia mundial del 3,1% entre los pacientes con FQ⁴. Aunque las poblaciones de la pendiente celtica muestran frecuencias de esta mutación de hasta el 8%. El fenotipo de los pacientes que son heterocigotos para las mutaciones $\Delta F508/ G551D$ son caracterizados por un cuadro clínico tan severo como el que se presenta en los pacientes homocigotos para la mutación $\Delta F508$, pero con un riesgo reducido de la presencia del íleo meconial en estos pacientes¹.

Para su identificación se emplea un código de letras individuales que identifican los aminoácidos y las bases. De esta manera, G551D es lo mismo que decir que el aminoácido glicina (G) en la posición 551 ha sido reemplazado por el ácido aspártico (D)¹.

D. Mutación R533X

La mutación R553X se encuentra en el exón número once del *gen cfr* y pertenece a la clase de mutaciones 1 al igual que la mutación G542X, es producto del cambio de una citocina por una timina que genera un codón de parada (TGA) en la posición 553 del *gen cfr*⁴.

2.2. Técnicas Biomoleculares

2.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue desarrollada por Kary B. Mullis, y descrita por primera vez en 1985, una manera más simple de sintetizar grandes cantidades de ADN *in vitro* basándose en el procedimiento que la célula emplea *in vivo*.

Por lo general, la PCR es una técnica común y normalmente indispensable en laboratorios de investigación médica y biológica para una gran variedad de aplicaciones. Entre ellas se incluyen la clonación de ADN para la secuenciación, la filogenia basada en ADN, el análisis funcional de genes, el diagnóstico de trastornos hereditarios, la caracterización de huellas genéticas (usada en técnicas forenses y tests de paternidad) y la detección y diagnóstico de enfermedades infecciosas.⁴¹

La PCR es un método enzimático que utiliza dos oligonucleótidos sintéticos complementarios de los extremos 3' del molde y con sus terminales 3'OH enfrentados como cebadores y que sintetiza numerosas copias del fragmento de ADN comprendido entre ambos oligos. La sucesión de una serie de ciclos en las que tiene lugar la desnaturalización del molde; hibridación con los cebadores y extensión de la síntesis por acción de la ADN polimerasa, origina una acumulación exponencial de fragmentos específicos cuyos extremos estarán definidos por los extremos 5' de los cebadores. Al poder ser utilizados los productos de un ciclo como moldes del ciclo siguiente, el número de copias de ADN, se duplica en cada ciclo. Así pues, 30 ciclos de PCR producen una amplificación de un millón de copias aproximadamente.⁴¹

2.2.2. PCR-RFLP

El "Polimorfismo en Longitud de los Fragmentos de Restricción" (RFLP *Restriction Fragment Length Polimorphisms*) representan la primera metodología de genotipaje basada en el ADN. El primer ejemplo de RFLP fue descrito en 1976 para los loci de la globina humana β y γ , Esta técnica fue posible gracias al uso de herramientas auxiliares de biología molecular previamente descritas. Así, en 1970 se había identificado la primera enzima de restricción específica, que podía cortar largas cadenas de ácidos nucleicos en fragmentos discretos menores. También se demostró que la electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida podía usarse para separar dichos fragmentos por tamaño. Todo ello era complementado con la transferencia, de ácidos nucleicos a membranas y su posterior detección. Básicamente un RFLP consiste en fragmentar específicamente el ADN genómico, separar los fragmentos transferirlos a un soporte rígido e identificar el tamaño de alguna secuencia específica⁴¹.

En primer lugar se aísla el ADN genómico del material biológico a estudiar. Es importante que dicho ADN tenga un elevado grado de pureza y particularmente, esté libre de polisacáridos y otros inhibidores de las enzimas de restricción. El paso siguiente es precisamente la digestión de dicho ADN mediante enzimas de restricción. Los fragmentos discretos generados se someten a electroforesis en gel de agarosa para de esta forma separarlos por tamaños.

Las características resaltantes de esta técnica son: no requiere conocimiento previo de la secuencia, es una huella del ADN (*fingerprinting*) laborioso y costoso, brinda información parcial de la información y presenta una genérica de segregación codominante⁴¹.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño del Estudio

Es un estudio Descriptivo - Serie de casos.

3.2. Universo

Pacientes con FQ que acudan al Instituto Especializado de Salud del Niño en los Servicios de Medicina, Gastroenterología y Neumología.

3.3. POBLACIÓN DE ESTUDIO

3.3.1. Población

Se seleccionaron 12 pacientes con diagnóstico de FQ del Instituto Especializado de Salud del Niño y que cumplían con los criterios de inclusión del estudio; los cuales fueron reunidos junto con sus familiares o apoderados en el servicio de Neumología. De los 12 pacientes que aceptaron participar voluntariamente 6 fueron varones y 6 mujeres. Las edades de los participantes comprendieron desde los 3 años hasta los 14 años. A todos los pacientes y apoderados se les hizo conocer el estudio, se les explicó los detalles de éste, y se les hizo firmar una carta de consentimiento informado.

3.3.2. Criterios de Inclusión

- a) Pacientes de 3 a 14 años de ambos sexos, diagnosticados con FQ según el consenso americano de FQ que se basa en el diagnóstico de la enfermedad tomando criterios clínicos como enfermedades pulmonar crónica y sinusal

crónica, alteraciones gastrointestinales y nutricionales, síndrome de pérdida de sal y métodos de laboratorio como dos pruebas de sudor positivo o diferencia del potencial transnasal transepitelial anormal, que asistan a los servicios de Medicina, Gastroenterología y Neumología del Instituto Especializado de Salud del Niño.

- b) Aceptación de sus padres o apoderados mediante la firma del Consentimiento Informado.

3.3.3. Criterios de Exclusión

- a) Pacientes que se encuentren severamente afectados por la enfermedad para evitar la posible afección psicoafectiva del paciente y sus familiares. Se considerará paciente severamente afectado, aquel que según el puntaje clínico de Shwachman modificado (Anexo N° 1), se encuentre en la categoría severa.

3.3.4. Técnica de Muestreo

- Se enumeró correlativamente a los participantes del estudio que cumplían con las características de inclusión establecidas.
- Se seleccionaron 18 pacientes a través de la técnica de muestreo aleatorio simple, la cual consistió en utilizar una tabla de números aleatorios, y se procedió a escoger en forma aleatoria una columna y una fila, el número que se encontró en la intersección corresponde al número del paciente, que fue considerado en el estudio.

3.4. Muestra Biológica

De cada paciente se extrajo 2.5 ml de sangre venosa (vena cefálica media), en tubos vacutainer con EDTA; las muestras fueron transportadas en refrigeración al laboratorio.

3.5. Lugar de ejecución del estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.6. Soluciones

Se utilizaron las soluciones STE y TE para la extracción de ácidos nucleídos mientras que para la electroforesis en gel de agarosa se utilizaron las soluciones Gel loading buffer y los buffer de corrida TAE y TBE.

Sodio - Tris - EDTA (STE)

- Cloruro de sodio	100 mM
- Tris	50 mM
- EDTA	10 mM

Se ajustó el pH a 8,0 y se repartió en alícuotas de 10 mL.

Tris - EDTA (TE)

- Tris	10 mM
- EDTA	1 mM

Se ajustó el pH a 8,0 y se repartió en alícuotas de 10 mL.

Buffer de cargado o "Gel loading buffer"

- Glicerol estéril	5,0 mL
- 10X TAE buffer	1,0 mL
- Azul de bromofenol al 10%	1,0 mL
- Xileno cianol al 10%	1,0 mL
- H ₂ O bidestilada	2,0 mL

Se repartió en alícuotas de 1 mL y se conservó a -20 °C.

Buffer de corrida TAE (solución stock 50X)

-Tris base	242,0 g
- Ácido acético	57,1 mL
- EDTA 0,5 M (pH 8.0)	100,0 mL

Se ajustó a pH 8,4; se adicionó agua bidestilada c.s.p. 1000 mL y se esterilizó en autoclave a 121 °C, 15 PSI por 15 min. Se conservó a temperatura ambiente.

Buffer de corrida TBE (solución stock 5X)

- Tris base	54,4 g
- Ácido bórico	27,5 g
- EDTA 0,5 M (pH 8.0)	20,0mL

Se ajustó a pH 8,4; se adicionó agua bidestilada c.s.p. 1000 mL y se esterilizó en autoclave a 121 °C, 15 PSI por 15 min. Se conservó a temperatura ambiente.

3.7 MÉTODOS

3.7.1. Genotipificación de las mutaciones $\Delta F508$, G542X, G551D y R553X

3.7.1.1 Extracción y purificación del ADN genómico

- **Principio.** El ADN genómico es liberado de la célula mediante lisis de la membrana celular y nuclear con un agente tensoactivo. El componente proteico es precipitado con fenol y los componentes orgánicos solubles son removidos con cloroformo. Después el ADN es purificado con isopropanol y etanol; finalmente es disuelto en agua o un buffer que permita una mejor conservación.

- **Procedimiento.** Se procedió a extraer el ADN genómico de sangre total con anticoagulante EDTA por el método de solventes orgánicos que se describe a continuación. En un tubo de microcentrifuga de 2mL, se adiciono 100 μ L de sangre, 600 μ L de buffer STE, dodecilsulfato de sodio y proteinasa K 0.33 μ g/ml se incubó a 50 °C por 12 horas. El ADN se purificó añadiendo 600 μ l de fenol, seguido de igual volumen de cloroformo, luego la fase acuosa fue removida. La fase acuosa se precipito con acetato de sodio 3M e igual volumen de isopropanol. El precipitado se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 30 μ l de buffer tris 10 mM y EDTA 1mM.

3.7.1.2 Amplificación de los exones 10 y 11 del gen *cftr*

Las regiones del *gen cftr* correspondientes a los exones 10 y 11 fueron amplificadas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polimerasa Chain Reaction, PCR) con condiciones uniformes para todas las mutaciones estudiadas. Se agregó 100 ng de ADN a unos 25 μ l de mezcla de amplificación conteniendo 0.5 μ M de los cebadores forward y reverse específicos⁴² (Tabla N° 2), *Taq* ADN polimerasa 1 U, desoxinucleotido trifosfato 200 μ M, MgCl₂ 1.5 mM, buffer de enzima. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización a 94 °C 30 seg, hibridación a 52 °C por 30 seg, polimerización a 72 °C por 45 seg, las mismas condiciones se repitieron

por 35 ciclos. Finalmente se realizó una polimerización a 72 °C durante 7 min.

Tabla N° 2. Secuencia nucleotídica de los cebadores utilizados según la mutación a identificar

Mutación	Secuencia nucleotídica de los cebadores
Δ F508	(f) GCACCATTAAAGAAAATATGAT (r) CATTACAGTAGCTTACCCA
G542X	(f) GCAGAGAAAGACAATATAGTTCCT (r) ATTATGGTTACTCAGAATCTGTGC
G551D	(f) CAACTGTGGTTAAAGCAATAGTGT (r) GCACAGATTCTGAGTAACCATAAT
R553X	(f) CAACTGTGGTTAAAGCAATAGTGT (r) GCACAGATTCTGAGTAACCATAAT

3.7.1.3 Restricción de los productos amplificados

Los productos de PCR amplificados fueron cortados con enzimas específicas descritas en la tabla 3, para ello se colocó 1 µg de ADN amplificado en 25 µL de volumen final de reacción según las especificaciones técnicas descritas por los fabricantes y se incubó en baño de agua durante 8 horas. Luego de la digestión los fragmentos cortados fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa SFR (Súper Fina Resolución) al 2 y 4% con buffer tris borato EDTA 0.5X utilizando marcadores de peso molecular apropiados según el tamaño. Los ADNs se colorearon con bromuro de etidio y se fotografiaron bajo luz ultravioleta.

Tabla 3. Tamaños de los ADN cortados según mutación analizada y enzima de restricción utilizada

Mutación	Tamaño del fragmento amplificado (pb)	Enzima de restricción	Tamaño digerido de la secuencia		
			Alelo Mutado		Alelo Sano
			Heterocigoto	Homocigoto	
Δ F508	219 ó 216 *	<i>MboI</i>	216pb * 202pb 17pb (a)	216pb *	202pb 17pb(a)
G542X	295	<i>BstOI</i>	194pb 171pb 101pb(b) 23pb(a)	194pb 101pb(b)	171pb 101pb(b) 23pb(a)
G551D	425	<i>MboI</i>	425pb 242pb 183pb	242pb 183pb	425pb
R553X	425	<i>Hinc II</i>	425pb 239pb 186pb	425pb	239pb 186pb

*Debido a la mutación, hay una delección de tres nucleótidos
^(a)Debido a su bajo peso molecular estos fragmentos son imperceptibles en la electroforesis
^(b)Consecuencia de un sitio de restricción constitutiva.

IV. RESULTADOS

4.1. Pacientes

El estudio fue revisado y aprobado por el comité de ética del Instituto Especializado de Salud del Niño, y en cada caso sus padres firmaron un consentimiento informado, previo a su inclusión en el estudio. Se estudiaron 12 pacientes, con un rango de edad de 3 a 14 años. Todos ellos tenían un diagnóstico clínico concluyente o altamente sugerente de FQ y una concentración elevada de cloro en el sudor.

4.2. Extracción de ADN genómico

La concentración y pureza de la extracción y purificación del ADN por el método fenol/cloroformo se muestra en la figura 4, se observa que en todas las extracciones se obtuvo una sola banda. Esta etapa constituye un punto crítico ya que la integridad, concentración y pureza del ADN van a constituir un requisito indispensable para realizar todas las pruebas moleculares de identificación de las mutaciones en estudio.

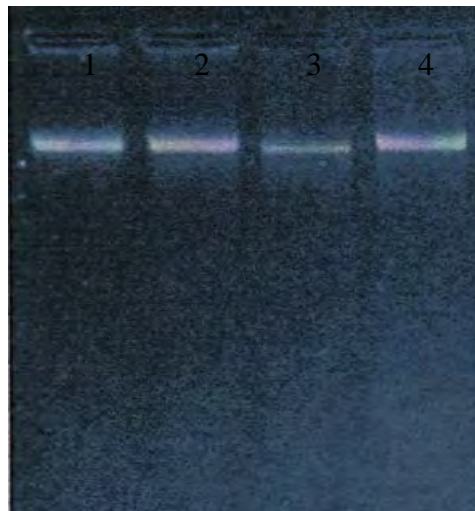


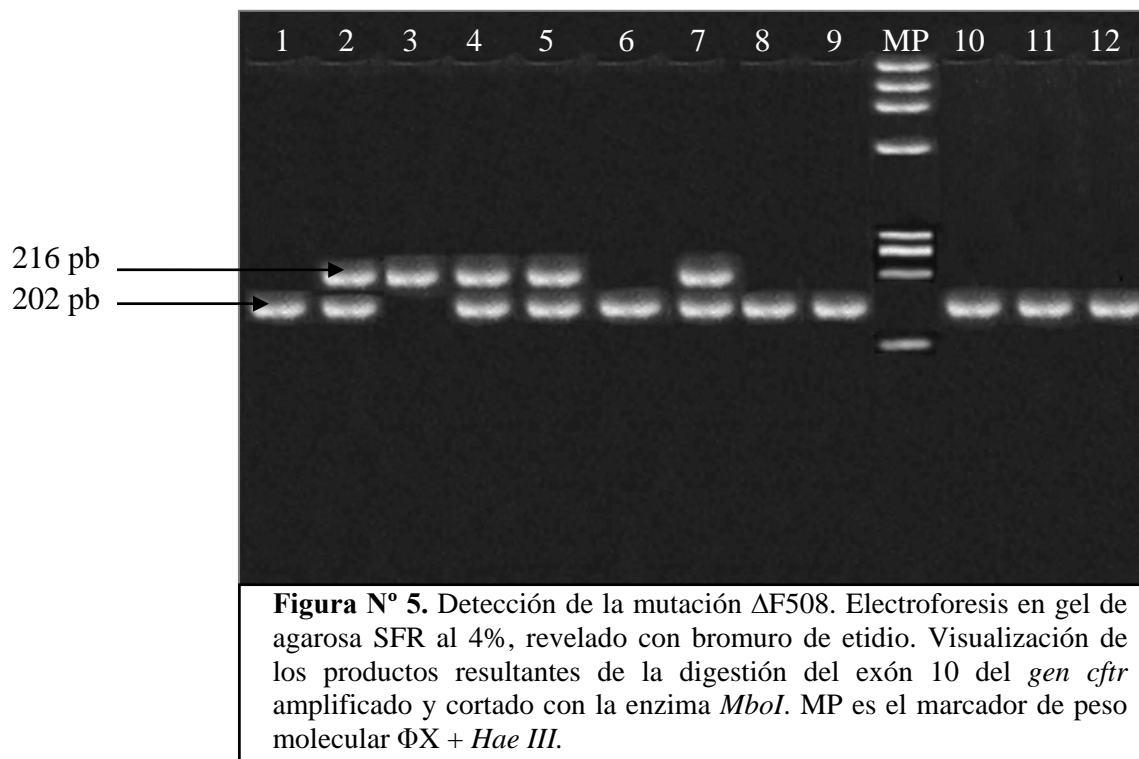
Figura N° 4. Gel de Agarosa al 1% conteniendo el ADN genómico

4.3. Reacción en cadena de la Polimerasa

4.3.1 Productos de PCR y digestión

Después de evaluar la especificidad respectiva de los cebadores para cada mutación (Tabla N° 2), se detectó la mutación $\Delta F508$ en 6 cromosomas, y la mutación G542X en 2 cromosomas, mientras que las mutaciones R553X y G551D no fueron detectadas en los pacientes estudiados.

En la figura 5, se presenta la electroforesis de la digestión enzimática en gel de agarosa SFR al 4%, para un grupo integrado por doce pacientes, en la que se investiga la presencia de la mutación $\Delta F508$ en cada cromosoma de dichos pacientes. En las líneas 1, 6, 8, 9, 10-12 no se observa corte de la enzima (aparentemente homocigotos), las líneas 2, 4, 5, 7 son heterocigotos para la $\Delta F508$, la línea 3 es homocigoto para la $\Delta F508$.



Se puede observar en las líneas 2, 4, 5 y 7, dos bandas. La banda superior tiene un tamaño de 216 pb e identifica al producto amplificado del cromosoma que presenta la mutación $\Delta F508$. En este alelo amplificado, el sitio de restricción para la enzima *Mbo I* está ausente y debido a que posee una delección de 3pb, presenta un tamaño menor al amplificado del control normal no digerido de 219pb. La banda inferior, de 202pb, corresponde al cromosoma que tiene otra mutación. En las líneas 1, 6, 8, 9, 10, 11 y 12 la presencia del sitio de restricción en ambos cromosomas, produce dos fragmentos, el mayor tiene 202 pb y el otro 17 pb que es imperceptible, esta situación se presenta en aquellos pacientes que aún padeciendo de FQ, no tienen la mutación $\Delta F508$.

En el carril 3 se puede observar una sola banda de aproximadamente 216 pb, la cual según lo especificado en la Tabla 3 corresponde a un homocigoto para la mutación $\Delta F508$.

En la figura 6 se presenta la electroforesis de la digestión enzimática en gel de agarosa SFR al 4%, para un grupo integrado por doce pacientes, en la que se muestra la presencia de la mutación G542X.

Se amplificó un fragmento de 295 pares de bases seguido por una digestión con la enzima de restricción *BstO I*, se originó una banda constante de 101pb en todas las muestras amplificadas como consecuencia de un sitio de restricción constitutiva; el cual no está implicado en la fibrosis quística. El fragmento de 194pb restante, se mantuvo sin cortar en las muestras que contenían la mutación G542X, y se separó en dos fragmentos de 171 y 23pb

en aquellas muestras donde no se presentó la mutación G542X, como se visualiza en el esquema de análisis de la mutación G542X (Anexo 5). Se puede observar en las líneas 1-5, 6, 8-12 de la figura 6, la ausencia de la mutación G542X ya que se forman tres bandas de 171, 101 y 23pb, siendo la última imperceptible por el bajo peso molecular. En la línea 7 se observa un homocigoto para la mutación G542X, el cual en correspondencia con la Tabla 3 presenta dos fragmentos, uno de 101 y otro de 194pb.

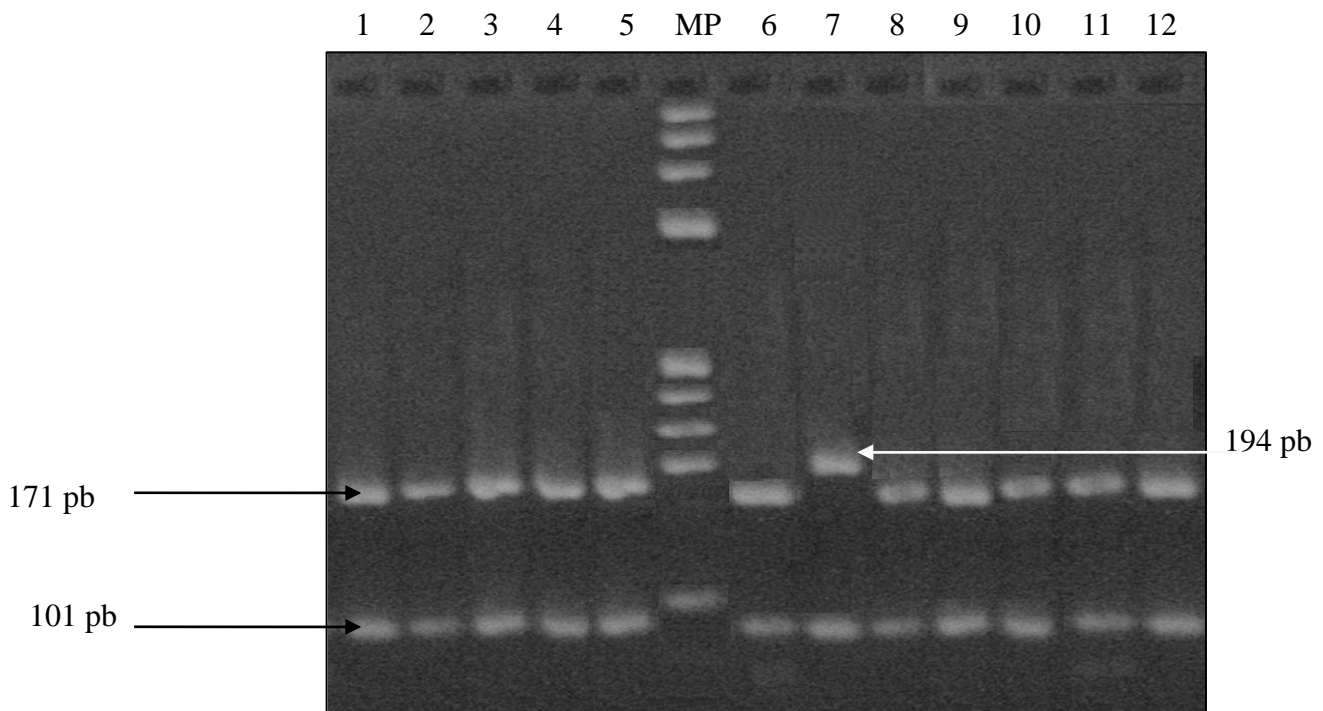


Figura N° 6. Detección de la mutación G542X. Electroforesis en gel de agarosa SFR al 4%, revelado con bromuro de etidio. Visualización de los productos resultantes de la digestión con la enzima de restricción *Bst* *O1* de los amplificadores del exón 11 del *gen cftr*. MP es el marcador de peso molecular $\Phi X + Hae III$.

La mutación $\Delta F508$ fue encontrada en 6 cromosomas del un total de 24 cromosomas correspondientes a los 12 pacientes y la mutación G542X fue encontrada en 2 cromosomas del un total de 24 cromosomas correspondientes a los 12 pacientes, mientras que las mutaciones G551D y R553X no fueron encontradas, todo ello en un total de 24 cromosomas correspondientes a 12 pacientes con FQ. Las otras mutaciones no detectadas corresponden a las 1593 mutaciones descritas hasta la fecha; este análisis permitió estimar la frecuencia que se presenta en la Tabla N° 4.

Los diversos genotipos de CFTR se demuestran en la Tabla 5, se formó un grupo denominado OTROS, con la finalidad de contabilizar a aquellos individuos cuyos genotipos no fueron asignables a ninguno de los estudiados. El más frecuente fue el genotipo OTRO/OTRO presente en seis de doce pacientes. Siendo el otro genotipo más frecuente el $\Delta F508$ / OTRO, encontrado en 4 pacientes.

Tabla N° 4: Frecuencia alélica relativa de las mutaciones $\Delta F508$ y G542X en pacientes diagnosticados con FQ del Instituto Especializado de Salud del Niño.

Mutación	Alelos totales	Número de alelos mutados	Frecuencia relativa de la mutación (%)
$\Delta F508$	24	6	25.0
G542X	24	2	8.3
R553X	24	0	0.0
G551D	24	0	0.0
OTROS	24	16	66.7

Tabla N° 5: Frecuencia genotípica relativa de las mutaciones $\Delta F508$ y G542X en pacientes con FQ del Instituto Especializado de Salud del Niño.

Genotipos encontrados	Número de pacientes	Frecuencia relativa (%)
$\Delta F508/\Delta F508$	1	8.3
$\Delta F508/OTRO$	4	33.4
G542X/G542X	1	8.3
OTRO/OTRO	6	50.0

4.4. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS

4.4.1 Análisis de la secuencia nucleotídica que contiene la mutación $\Delta F508$

En la figura 7A se muestra parte de la secuencias nucleotídicas, que corresponden al exón 10 y a su respectivo intrón del gen *cftr*. La ubicación de la mutación $\Delta F508$ esta en el exón 10, en el análisis realizado se observa que las secuencias de los cebadores F y R marcados con una línea, están ubicados en el exón e intrón 10 respectivamente. Seguido a la secuencia (F) del cebador se encuentran los tres nucleótidos CTT, cuando están ausentes originan la mutación $\Delta F508$; que se visualiza porque crea un punto de corte en la secuencia para la enzima *Mbo I*.

4.4.2 Análisis de la secuencia nucleotídica que contiene las mutaciones G542X, G551D y R553X

En la figura 7B se muestra parte de las secuencias nucleotídicas del ADN genómico del *gen cfr*, que corresponden al exón e intrón 11. La ubicación de las mutaciones G542X, G551D y R553X están en el exón 11 indicadas con un asterisco. En el análisis realizado se observa la secuencia del cebador (F). Así mismo, se señala la ubicación del sitio de acción para las enzimas *BstOI*, *Mbo I*, *Hinc II* utilizadas para determinar los cambios nucleotídicos para la mutación. Se observa la secuencia aminoacídica y se señala la ubicación de las mutaciones G542X, G551D y R553X respectivamente.

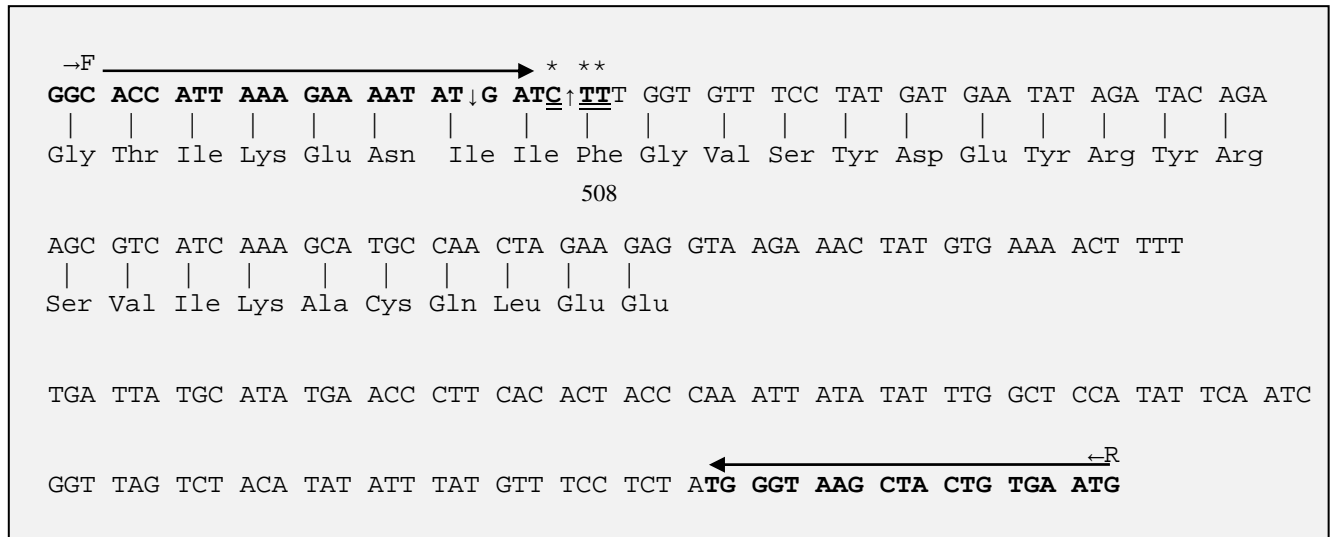


Figura N° 7A. Análisis de la secuencias nucleotídicas del ADN genómico para la mutación ΔF508 en el exón 10 del *gen cfr*, los nucleótidos marcados con * se pierden y dan origen a la mutación ΔF508. Las secuencias de los cebadores F y R están marcadas por una flecha.

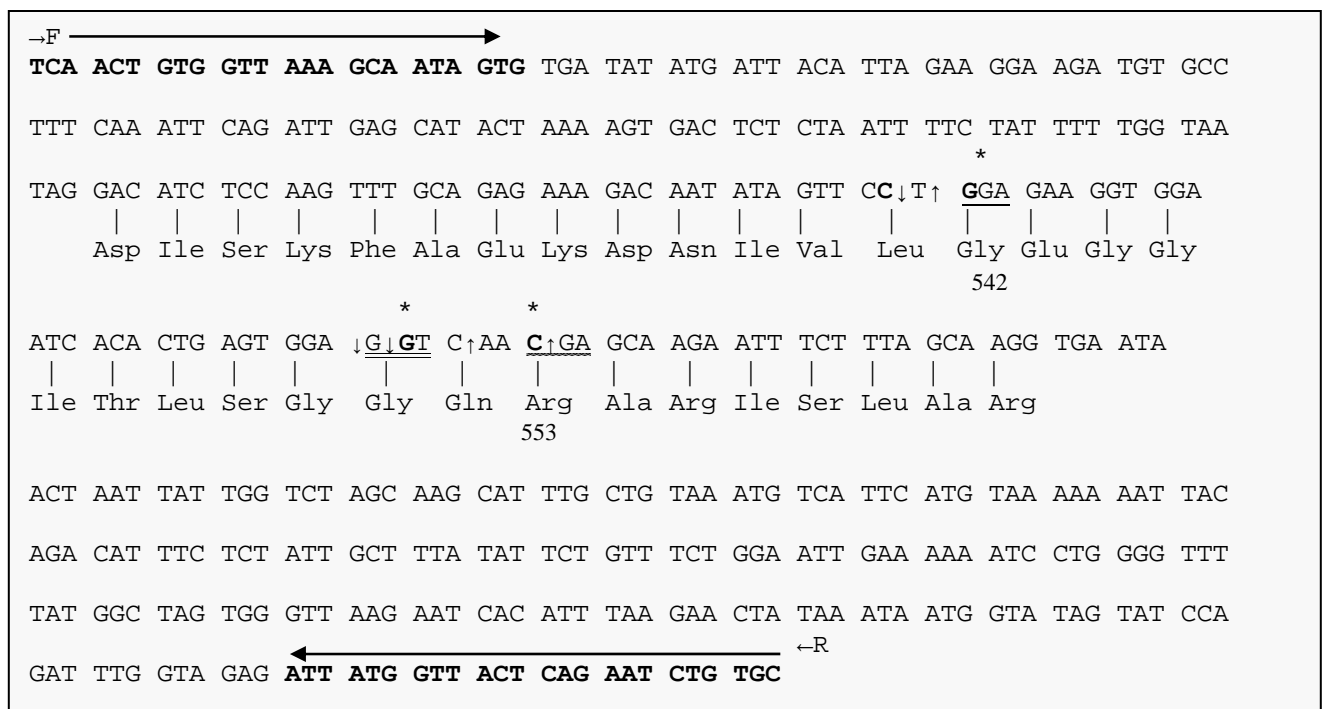


Figura N° 7B. Análisis de la secuencias nucleotídicas para las mutaciones G542X, G551D y R553X en el exón 11 del *gen cfr*, los nucleótidos marcados con * son cambiados y dan origen a las mutaciones G542X, G551D y R553X respectivamente. Las secuencias de los cebadores F y R están marcadas por una flecha.

V. DISCUSIÓN

Se ha planteado que la FQ está distribuida debido a las distintas migraciones suscitadas en los siglos pasados⁴³. La población peruana es producto de un mestizaje entre españoles, africanos, asiáticos y amerindios; existiendo variaciones de una región a otras en relación al componente étnico que predomina en cada zona.

La frecuencia relativa de la mutación $\Delta F508$ observada en este estudio es de 25% diferente a las descritas para otros países de Latinoamérica como se muestra en la Tabla 6 (Anexo 9).

Esta diferencia entre las frecuencias de la mutación $\Delta F508$ se puede explicar parcialmente por la heterogeneidad étnica y la distribución focal de los genes de FQ de los individuos de cada país o región. Así se ha encontrado variabilidad regional en cuanto a la frecuencia de la mutación $\Delta F508$ en países sudamericanos, como en Brasil, donde se reporta una frecuencia de 36,4% en Santa Catarina y 60% en Sao Paulo⁵⁰ y en el caso de Chile, en un trabajo realizado por Repetto y col.⁴⁸, en pacientes atendidos en varios hospitales de Santiago de Chile, se observa una frecuencia de 45% para la mutación $\Delta F508$, mientras que en Valparaíso, esta mutación se presenta con una frecuencia de 32,4%⁵¹.

Tal como se ha descrito en la mayoría de las poblaciones estudiadas, la mutación $\Delta F508$ fue la más frecuente y el resto de las mutaciones se encontraron con frecuencias individuales. Los hallazgos descritos enfatizan la observación de que, para poblaciones heterogéneas, la proporción de mutaciones "comunes" identificadas es proporcional a la frecuencia relativa de la mutación $\Delta F508$, ya que la proporción contribuida por otros alelos es en general baja. La mutación G542X es de origen español⁴ y eso explicaría su presencia

relativa en Perú y Latinoamérica, comparada con los datos globales como se muestra en la Tabla 7 (Anexo 10).

En este estudio empleando la técnica Polimorfismo de Longitud de los Productos Amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa no se detectó mutaciones en el 66.7% de los alelos totales de la población sujeta a estudio, sugiriendo que existe alguna otra mutación predominante tal vez propia de la población peruana u otras mutaciones de frecuencias individuales bajas. Otra explicación es que algunos de estos pacientes tengan otras patologías. Según Welsh y cols⁵³, describieron que el 40% de los pacientes derivados a centros de FQ recibieron diagnósticos erróneos debido a resultados falsos positivos o falsos negativos a la prueba de sudor. Sin duda, existen casos en que es difícil comprobar o descartar en forma definitiva la sospecha de FQ, y hay pacientes con esta enfermedad con concentraciones de Cl⁻ en sudor menores de 60 mEq/L. La baja frecuencia de la mutación $\Delta F508$ requiere mayores investigaciones para diseñar nuevos métodos que sean utilizados para el diagnóstico o descarte de FQ.

La posibilidad actual de detectar alrededor de un tercio de las mutaciones mediante RFLP-PCR permite sugerir que el análisis molecular sea incluido en la evaluación clínica de los pacientes con FQ, tanto para el diagnóstico y pronóstico como utilidad para el consejo genético, y con los avances de la farmacogenética, para el tratamiento de los pacientes en el futuro.

La técnica RFLP-PCR estandarizada en el laboratorio puede ayudar o detectar portadores de las mutaciones $\Delta F508$, G542X, G551D y R553X, con mayor prevalencia a nivel mundial. Además, sería el primer paso para la caracterización genética de los pacientes diagnosticados con FQ.

VI. CONCLUSIONES

- La mutación más frecuente en la población estudiada de pacientes diagnosticados con FQ del Instituto especializado de salud del Niño fue la $\Delta F508$.

- Las frecuencias de las mutaciones $\Delta F508$ y $G542X$ en pacientes diagnosticados con FQ del Instituto especializado de salud del Niño estudiados fueron de 25% y 8.3% respectivamente.

- En los pacientes diagnosticados con FQ del Instituto especializado de salud del Niño estudiados no se encontraron las mutaciones $G551D$ y $R553X$.

VII. RECOMENDACION

- Continuar con los estudios a nivel molecular en mayor número de pacientes diagnosticados con FQ así como en poblaciones aparentemente sanas para identificar otras mutaciones que puedan ser prevalentes en Perú. Estos estudios poblacionales permitirán obtener la real frecuencia de enfermos y portadores, diagnosticar con anticipación, y utilizar como criterio dentro de programas de tamizaje neonatal, cuyos beneficios en los aspectos nutricionales son evidentes.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1) Rosenstein B, Cutting G. The diagnosis of cystic fibrosis: A consensus statement. *J Pediatr* **1998**; 132: 589-95.
- 2) Dodge JA, Morison S, Lewis PA, Coles EC, Geddes D, Littlewood JM, Scott MT. Incidence, population and survival of cystic fibrosis in the UK, 1968-95. *Arch Dis Child* **1997**; 77:493-6.
- 3) Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem BS, Drumm ML, Melmer G, Dean M, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* **1989**; 245:1059-65.
- 4) Genexct stick: Investigación mundial de la fibrosis quística [<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>] (Revisado en julio del 2008)
- 5) Franchi L. Fibrosis Quística. *Rev Med Hered* **1994**; 5: 91-6.
- 6) Instituto Nacional de Estadística e Informática; Censos nacionales 2007: XI de población y VI de vivienda; Segunda edición; Agosto 2008, Lima-Perú [<http://censos.inei.gob.pe/Anexos/Libro.pdf>] (Revisado en setiembre del 2008)
- 7) Scott D. Grosse, Coleen A. Boyle, Jeffrey R. Botkin, Anne Marie Comeau, et al. Newborn screening for cystic fibrosis, evaluation of benefits and risks and recommendations for state newborn screening programs. *National center on birth defects and developmental disabilities* **2004**; 53(RR13): 1-36
- 8) Torres D. Estudio clínico epidemiológico de la fibrosis quística en el instituto de salud del niño, *Pediátrica* **2002**; 4(3): 7-15
- 9) Tori CA. Enfermedad fibroquística del páncreas (mucoviscidosis) [Tesis de Bachiller]. Universidad Peruana Cayetano Heredia; Lima, 1966.

- 10) Aguirre I, Chiarella P, Hernandez H, Chaparro E, Accinelli R, Zegarra O. Fibrosis quística: Reporte de casos en un hospital de Lima, Perú. *Rev Méd Hered* **1994**; 5 (4): 204-8.
- 11) Escalante R. Diagnostico y tratamiento de fibrosis quística en el Instituto de Salud del Niño 1991-1996 [Tesis de Bachiller]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; Lima, 1998.
- 12) Collazo T, Cuétara E, Bofill A, Hernández Y, Gómez M, Zulueta Y, et al. Detección de las mutaciones 3120 +1g→A Y 3120g→A en pacientes cubanos con fibrosis quística. *Rev Cub Genet Hum* **2004**; 2(5)
- 13) Grupo de trabajo para el estudio de la enfermedad asmática en el niño. Fibrosis quística: Síndrome de obstrucción bronquial en la infancia. *Anales Españoles de Pediatría* **2002**; 56(7).
- 14) Koch C, Hoiby N. Diagnosis and treatment of cystic fibrosis. *Respiration* **2000**; 67: 239-47.
- 15) Dinwiddie R. Pathogenesis of lung disease in cystic fibrosis. *Respiration* **2000**; 67:3-8.
- 16) Segal E, Grenoville M, Macri CN, Fernandez A. Consenso de fibrosis quística. *Arch Argent Pediatr* **1999**; 97(3): 188-224
- 17) Riedel B. Gastrointestinal manifestations of cystic fibrosis. *Pediatric Ann* **1997**; 26:235-41.
- 18) Ratjen F, Doring G. Cystic fibrosis. *Lancet* **2003**; 361:681-9.
- 19) Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **1989**; 245:1066-73.

- 20) Tsui LC. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Am J Respir Crit Care Med* **1995**; 151:47–53.
- 21) Steven M. Rowe, M.D.; Stacey Miller, B.S., and Eric J. Sorscher, M.D. Mechanisms of disease Cistic Fibrosis. *N Ertl J Med* **2005**; 352: 1992-2001.
- 22) Tsui LC, Buchwald M. Biochemical and molecular genetics of cystic fibrosis. In: *Advances in Human Genetics*. Harris H, Hirschhorn K (Eds). *New York: Plenum Press* **1991**; 20:153-267
- 23) Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem B, Grzelczak Z, Riordan JR, et al. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics* **1991**; 10(1):214–28.
- 24) Jentsch T, Stein V, Weinreich F, Zdebik A. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* **2002**; 82: 503-68
- 25) Nilius B, Droogmans G. Amazing chloride channels: an overview. *Acta Physiol Scand* **2003**; 177:119-47.
- 26) Vankeerberghen A, Cuppens H, Casiman J. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cystic Fibrosis* **2002**; 1:13-29.
- 27) Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso FJ, Cutting GR. Cystic fibrosis. In: *The metabolic and molecular base of inherited disease*. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Eds). *New York: McGraw-Hill* **2001**; 8:5121-88.
- 28) Tsui LC, Durie P. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Hosp Pract* **1997**; 32: 115-34.
- 29) Sheppard DN, Welsh MJ. Structure and function of CFTR chloride channel. *Physiol Rev* **1999**; 79:145-66.

- 30) Wang S, Yue H, Derin RB, Guggino WB, Li M. Accessori protein facilitated CFTR-CFTR interaction, a molecular mechanism to potentiate the chloride channel activity. *Cell* **2000**; 103:169-79.
- 31) Knowles M, Gatzky J, Boucher R. Relative ion permeability of normal and cystic fibrosis nasal epithelium. *J Clin Invest* **1983**; 71:1410-17.
- 32) Mata F. Fibrosis Quística del Adulto. Correlación genotipo-fenotipo pulmonar [Tesis doctoral]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona; 2006.
- 33) Casals T, Ramos MD, Gimenez J. High heterogeneity for cystic fibrosis in spanish families: 75 mutations account for 90% of chromosomes. *Hum Genet* **1997**; 101:365-70.
- 34) Sheppard DN, Rich DP, Ostedgaard LS, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ. Mutations in CFTR associated with mild-disease form Cl⁻ channels with altered pore properties. *Nature* **1993**; 362:160-64.
- 35) Visich A, Zielenski J, Castaños C, Diez G, Grenoville M, Segal E, et al. Complete screening of the CFTR gene in Argentine cystic fibrosis patients. *Clin Genet* **2002**; 61: 207-13.
- 36) Martins VC, Araújo FG, Novaes FC, dos Santos NP. Prevalence of Δ F508, G551D, G542X and R553X mutations among cysticfibrosis patients in the North of Brazil. *J Med Biol Res Braz* **2005**; 38(1): 11-15
- 37) Orozco L, Velásquez R, Zielenski J, Tsui LC, Chávez M, Lezana J, et al. Spectrum of CFTR mutations in mexican cystic fibrosis patients: identification of five novel mutations (W1098C, 846delT, P750L, 4160insGGGG and 297-1G A). *Hum Genet* **2000**; 106: 360-65.

- 38) Genoveva K, Clemencia R, Thierry B, Pilar G, Vidaud D, Sanchez D, et al. CFTR; Mutations in patients from Colombia: Implications for local and regional molecular diagnosis programs. *Human Mutation in Brief* [Online Version] **2003**; 20(3).
- 39) Restrepo C, Pineda L, Rojas A, Gutiérrez C, Morales A, Gómez Y, et al. CFTR Mutations in three latin american countries. *Am J Med Genet* **2000**; 91: 277-79.
- 40) Molina G, González F, Cave R, Deglin M, Milinarsky A, Carvallo P. Estudio clínico-genético molecular de la fibrosis quística en la V región, Chile. *Rev Chil Pediatr* **2000**; 71: 527.
- 41) Mendoza Alfredo; Diseño de una técnica biomolecular para la identificación de *Haemophilus paragallinarum* aislados de aves comerciales; [Tesis para optar el titulo profesional de químico farmaceutico]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2004.
- 42) Friedman KJ, Highsmith E, Silverman LM. Detecting multiple cystic fibrosis mutations by polymerase chain reaction-mediated site-directed mutagenesis. *Clin Chem* **1991**; 37: 753-55.
- 43) Mateu E, Calafell F, Ramos Md, Casals T, Bertranpetit J. Can a place of origin of the main cystic fibrosis mutations be identified. *Am J Hum Genet* **2002**; 70: 257-64.
- 44) Torres E. Indagación de la mutación F508 en pacientes con fibrosis quística, atendidos en el Servicio de Neumonología Pediátrica de la Ciudad Hospitalaria “Dr. Enrique Tejera” (Valencia, Venezuela). *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo* **2004**; 8:3.
- 45) Alvarado J, Acosta L, Carrasquel B, Lugo Z. Fibrosis quística: Estudio de 41 pacientes. Hospital de Niños J.M. de los Ríos. *Acta Otorrinolaringológica*. **2000**; Vol 12. No 1.

- 46) Luna M, Granados P, Olek K, Pivetta O. Cystic fibrosis in Argentina: the frequency of the DF508 mutation. *Hum Genet* **1996**; 97: 314.
- 47) Rios J, Orellana O, Aspillaga M, Avendano I, Largo I, Riveros N. CFTR mutations in Chilean cystic fibrosis patients. *Hum Genet* **1994**; 94: 291-94.
- 48) Repetto G, Poggi H, Harris P, Navarro H, Sánchez I, Guiraldes E, et al. Identificación de mutaciones en el gen CFTR en pacientes chilenos con fibrosis quística. *Rev Med Chil* **2001**; 129: 841-47.
- 49) Luzardo G, Aznarez I, Crispino B, Mimbacas A, Martínez L, Poggio R, et al. Cystic fibrosis in Uruguay. *Genet Mol Res* **2002**; 1: 32-38.
- 50) Raskin S, Phillips JA, Krishnamani MR, Vnencak-Jones C, Parker RA, Rozov T, et al. Cystic Fibrosis in the Brazilian population: DF508 mutation and KM-19/XV-2C haplotype distribution. *Hum Biol* **1997**; 69: 499-508.
- 51) Molina G, González F, Cave R, Cornejo M, Navarro S, Deglin M, et al. Estudio clínico-genético molecular de la fibrosis quística en la V Región, Chile. *Rev Med Chil* **2002**; 130: 850-58.
- 52) Grebe TA, Seltzer WK, Demarchi TJ, Dinithi K. Genetic Analysis of hispanic individuals with cystic fibrosis. *Am J Hum Genet* **1994**; 54:443-46.
- 53) Welsh MJ, Tsui LC, Boat TF, Beaudet AL. Cystic fibrosis. In: The metabolic and molecular basis of inherited disease. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Eds). *Nueva York: McGraw-Hill* **1995**; 7:3799-878.

IX. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1. Estructura hipotética de la CFTR.....	10
Figura N° 2. Clases de mutaciones en el gen CFTR.....	17
Figura N°3. Ubicación de la mutación Δ F508.....	20
Figura N° 4. Gel de agarosa al 1% conteniendo el ADN genómico.....	33
Figura N° 5. Detección de la mutación Δ F508.....	34
Figura N° 6. Detección de la mutación G542X.....	36
Figura N° 7A. Análisis de la secuencias nucleotídicas para la mutación Δ F508 en el exón diez del <i>gen cfr</i> , los nucleótidos.....	40
Figura N° 7B. Análisis de la secuencias para las mutaciones G542X, G551D y R553X en el exón once de <i>gen cfr</i>	40

IX. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1. Datos obtenidos del consorcio de análisis genético de la FQ (1994).....	19
Tabla N° 2. Secuencia nucleotídica de los cebadores utilizados según la mutación a identificar.....	31
Tabla N° 3. Tamaños de los ADN cortados según mutación analizada y enzima de restricción utilizada	32
Tabla N° 4. Frecuencia alelica relativa de las mutaciones Δ F508 y G542X en pacientes con FQ del Instituto Especializado de Salud del Niño.....	37
Tabla N° 5. Frecuencia genotípica relativa de las mutaciones Δ F508 y G542X en pacientes con FQ del Instituto Especializado de Salud del Niño.....	38
Tabla N° 6. Frecuencia de la mutación Δ F508 detectada en estudios llevados a cabo en Latinoamérica	66
Tabla N° 7. Frecuencia relativa de las mutaciones estudiadas.....	67

IX. ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Puntaje clínico de shwachman modificado.....	54
ANEXO 2: Ficha de recolección de datos de los pacientes.....	55
ANEXO 3: Carta de consentimiento informado para la participación en estudio de investigación	56
ANEXO 4: Esquema de análisis para la mutación $\Delta F508$	60
ANEXO 5: Esquema de análisis para la mutación G542X.....	61
ANEXO 6: Esquema de análisis para la mutación G551D.....	62
ANEXO 7: Esquema de análisis para la mutación R553X.....	63
ANEXO 8: Secuencia del gen <i>cfr</i>	64
ANEXO 9: Frecuencia de la mutación $\Delta F508$ detectada en estudios llevados a cabo en Latinoamérica	66
ANEXO 10: Frecuencia relativa de las mutaciones estudiadas.....	67

ANEXO 1
PUNTAJE CLÍNICO DE SHWACHMAN MODIFICADO¹⁴

Categoría	Puntos	Actividad general	Examen físico	Nutrición
Excelente (64 – 75)	25	Normal completa. Juega a la pelota. Va a la escuela regularmente, etc.	Normal. Sin tos. FC y FR normales. Pulmones limpios. Postura correcta.	Peso y talla arriba del percentilo 25. Deposiciones formadas prácticamente normales. Buen tono y masa muscular.
Bueno (53 – 63)	20	Falta de resistencia y cansancio al final del día. Buena asistencia al colegio.	Tos rara vez. FC y FR normales en reposo. Ausencia de hipocratismo digital. Auscultación sin ruidos agregados.	Peso y talla entre el percentilo 15 – 25. Deposiciones levemente anormales. Tono y masa muscular regulares.
Leve (41 – 52)	15	Descanso voluntario durante el día. Cansancio fácil durante el ejercicio físico. Regular concurrencia a la escuela.	Tos ocasional, al levantarse. FR ligeramente elevada comienzo e hipocratismo digital. Respiración ruda y algunos rales.	Peso y talla arriba del percentilo 3. Deposiciones anormales y escasamente formadas. Distensión abdominal mínima. Tono y masa muscular disminuida
Moderado (30 – 40)	10	Disneico luego de paseos cortos. Descansa gran parte del día. Maestra domiciliaria.	Tos frecuente, usualmente productiva. Retracciones intercostales. Deformidad torácica. Rales usualmente presentes. Hipocratismo digital 2 a 3 +. Enfisema moderado.	Peso y talla debajo del percentilo 3. Deposiciones desligadas y malolientes. Distensión abdominal leve a moderada. Músculos flácidos y masa muscular reducida.
Severo (< 29)	5	Ortopneico generalmente en silla de ruedas o cama	Tos severa. Taquipnea y taquicardia. Semiología pulmonar muy anormal. Insuficiencia cardiaca derecha. Hipocratismo digital 3 a 4 +.	Desnutrición marcada. Abdomen protuberante. Prolapso rectal. Deposiciones voluminosas, malolientes, frecuentes y grasosas.

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS DE LOS PACIENTES

Ficha N°: Fecha:

DATOS DEL APODERADO

Nombre Y Apellido:

Ocupación: Edad: Sexo:

Dirección Actual:

Distrito:

DATOS DEL MENOR

Nombre Y Apellido:

Edad: Sexo:

Lugar de nacimiento:

CON RESPECTO AL MENOR***ESTADO DE SALUD ACTUAL***

Estable ()

Regular ()

Malo ()

En caso de marcar regular o malo especificar:

.....

Edad a la cual se le diagnosticó la enfermedad:

Parientes con FQ: SI () NO ()

Servicio de IESN al que asiste:

Impresión Diagnóstica:

FIBROSIS QUÍSTICA:	Una o más (Tabla 2)o Historia de FQ en hnos.o screening neonatal (+)
	Aumento del Cl. En sudor en 2 o más ocasioneso 2 mutaciones FQo anormal Tr. iónico nasal

ANEXO 3

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

MUTACIONES MÁS FRECUENTES EN EL *GEN CFTR* DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON FIBROSIS QUÍSTICA DEL INSTITUTO DE SALUD DEL NIÑO

INTRODUCCIÓN

Deseamos invitarlo a un estudio de investigación que será realizado por el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia Y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor San Marcos en conjunto con el Instituto Especializado de Salud del Niño.

Deseamos que usted sepa que:

- El Participar en el presente estudio de investigación es algo totalmente voluntario.
- La investigación puede proporcionarnos conocimientos que ayuden a otras personas en el futuro incluido sus propios familiares (hijos, nietos, etc.).

EXPLICACIÓN DEL ESTUDIO

¿Por qué se esta llevando a cabo este estudio?

El propósito del estudio es reconocer a las causas más comunes de la enfermedad Fibrosis Quística, las cuales son las mutaciones llamada científicamente $\Delta F508$, G542X, G551D y R553X, ya que esta es la responsable de dicho mal.

¿Quiénes pueden participar en este estudio?

Estamos invitando a un grupo de niño(a)s, cuyas edades estén entre los 3 y 14 años diagnosticados clínicamente con Fibrosis Quística que asistan al Instituto Especializado de Salud del Niño. Pueden existir razones por las que su hijo(a) no pueda participar en el estudio, por lo que el personal del estudio le hará algunas preguntas.

¿Qué se me pedirá que haga si mi hijo(a) participa en este estudio?

Si Ud. acepta que su hijo(a) participe, los encargados del estudio obtendrá una historia clínica. Se tomará en un tubo una muestra de sangre venosa de 2.5mL equivalente a una cucharita.

¿Cuánto tiempo participará mi hijo(a) en este estudio?

La participación de su hijo (a) sólo durará el tiempo que demore la toma de la muestra de sangre.

¿Cuáles son los riesgos del estudio?

Los riesgos físicos que existen son solamente los causados por la toma de la muestra de sangre; estos son mínimos, así que el riesgo es muy pequeño. Si se le causara algún daño en la toma de muestra se le brindara el tratamiento adecuado. Los gastos que no se deriven directamente del procedimiento no serán reembolsados.

¿Recibiré algún beneficio por participar en este estudio?

Esperamos que la información que se obtenga como resultado de este estudio beneficie en un futuro a pacientes con Fibrosis Quística mediante la detección temprana de esta enfermedad para así lograr una mejor calidad de vida en dichos pacientes.

¿Se mantendrá confidencia del estudio?

Para proteger su privacidad, a las muestras de sangre se le asignara un código o un número en lugar de su nombre; de esta manera solo usted y los investigadores tendrán acceso a sus datos.

¿Cuáles son los costos?

El participar en este estudio no le costará nada. Los investigadores subvencionarán los equipos y los análisis necesarios. Usted no recibirá ninguna remuneración por participar en el estudio.

¿Cuáles son mis derechos como participantes?

La participación en el estudio es voluntaria.

El comité de Ética del Instituto de Salud del Niño revisará la información de esta investigación a lo largo de este estudio.

Usted tiene derecho a recibir información acerca de los datos evaluados por dicho comité.

Usted tiene derecho a recibir una copia de este formulario.

Usted tiene derecho a un Taller informativo en el cual se le brindará información acerca de la enfermedad junto con material didáctico que facilitará su entendimiento.

¿A quién debo de llamar si tengo alguna pregunta o algún problema?

Para preguntas acerca del estudio, comuníquese con los investigadores y responsables del estudio Cinthya Anabhela Silva Acuña (7938692); Dra. Amparo Zavaleta Pesantes (4620824); Dr. Hernán Del Castillo Barrientos (99639938 / 97890554).

Si Ud. tiene algunas dudas acerca de los derechos de su niño(a) como participante en un estudio de investigación, comuníquese al Dr. Melitón Arce, Presidente del Comité de Ética del IESN al teléfono 9941-9096, o al 423-9904.

DECLARACIÓN VOLUNTARIA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Si usted acepta participar en el estudio, lo hace en forma voluntaria, luego de haber leído y entendido el contenido de este documento.

Se me ha informado de la investigación y he tenido la oportunidad de hacer preguntas. Estoy de acuerdo de que mi niño forme parte de esta investigación. Comprendo que tengo derecho de rechazar el ingreso de mi hijo(a) al estudio y de retirarlo(a) del mismo en cualquier momento y por cualquier motivo, sin que esto traiga ningún perjuicio a mí o a mi hijo(a) en su actual o futura atención médica que reciba del Ministerio de Salud o de la institución que normalmente lo atiende. Me han informado de mi derecho a acceder y solicitar correcciones de los datos personales de mi hijo(a) / tutelado(a). Reconozco haber recibido una copia del presente formulario para una referencia futura.

Nombre y apellidos del niño / niña participante: _____

Firma del padre/madre o tutor

Nombre (en imprenta)

Fecha

Firma del testigo

Nombre (en imprenta)

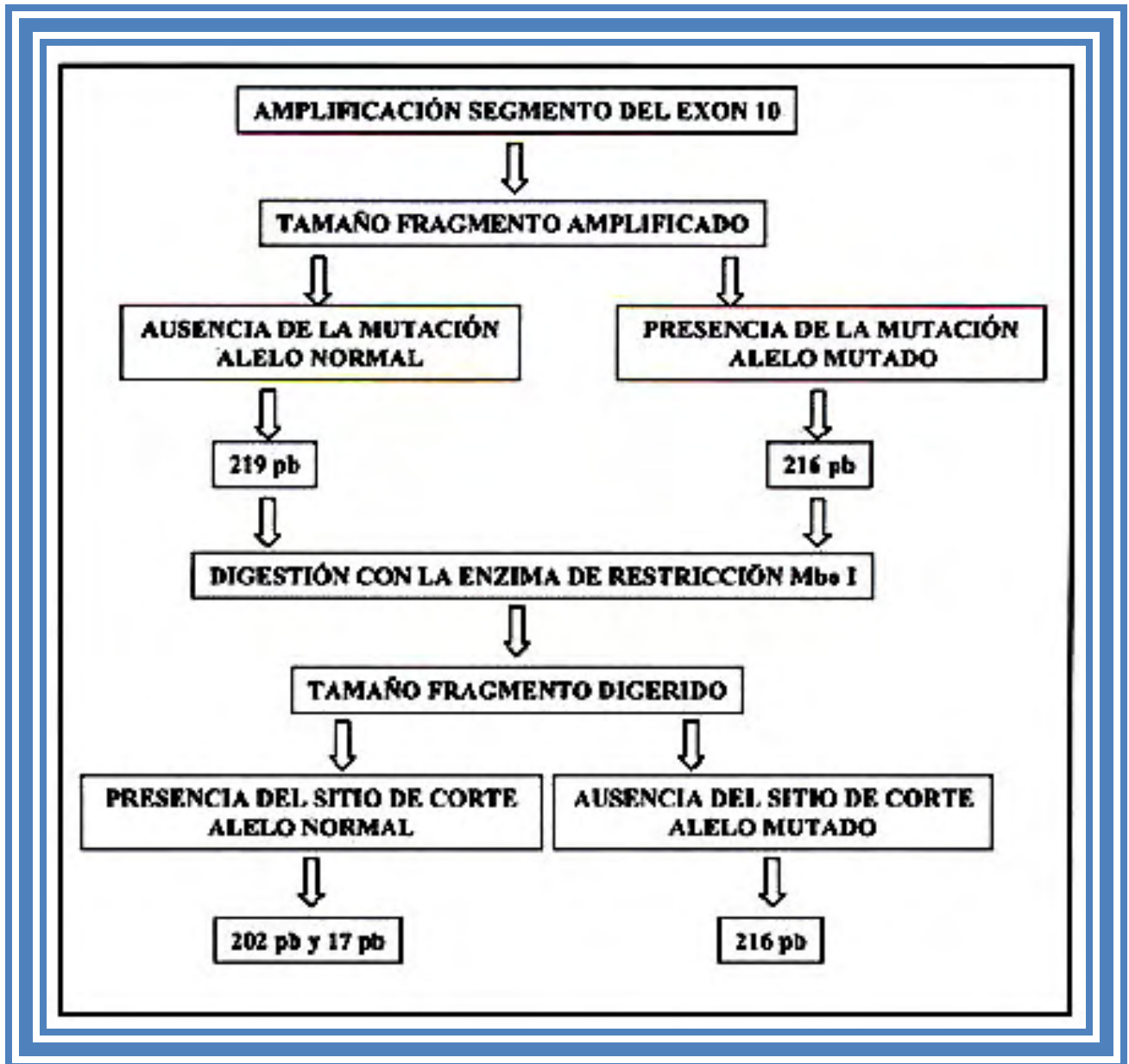
Fecha

Firma de la persona que obtiene
el consentimiento

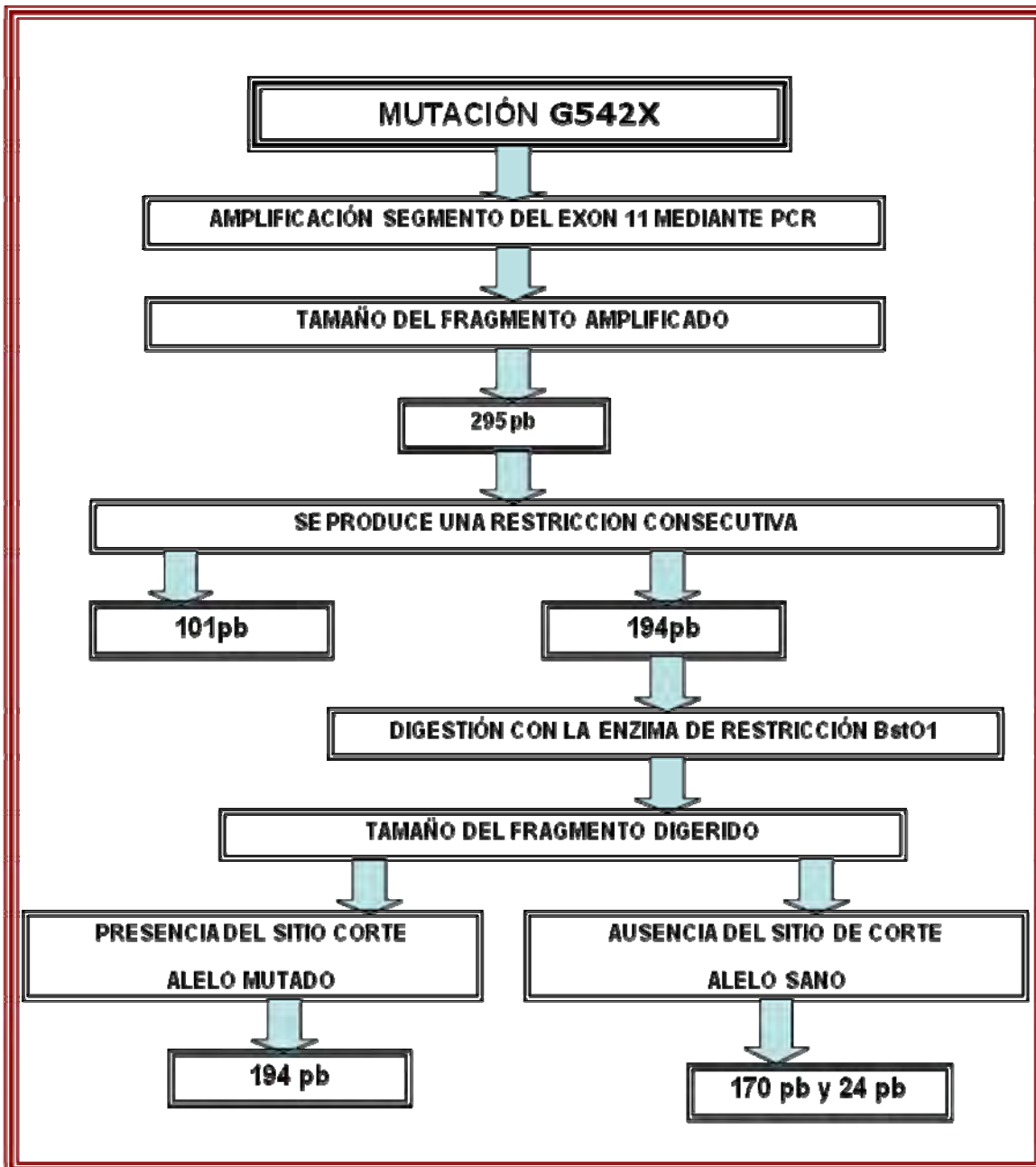
Nombre (en imprenta)

Fecha

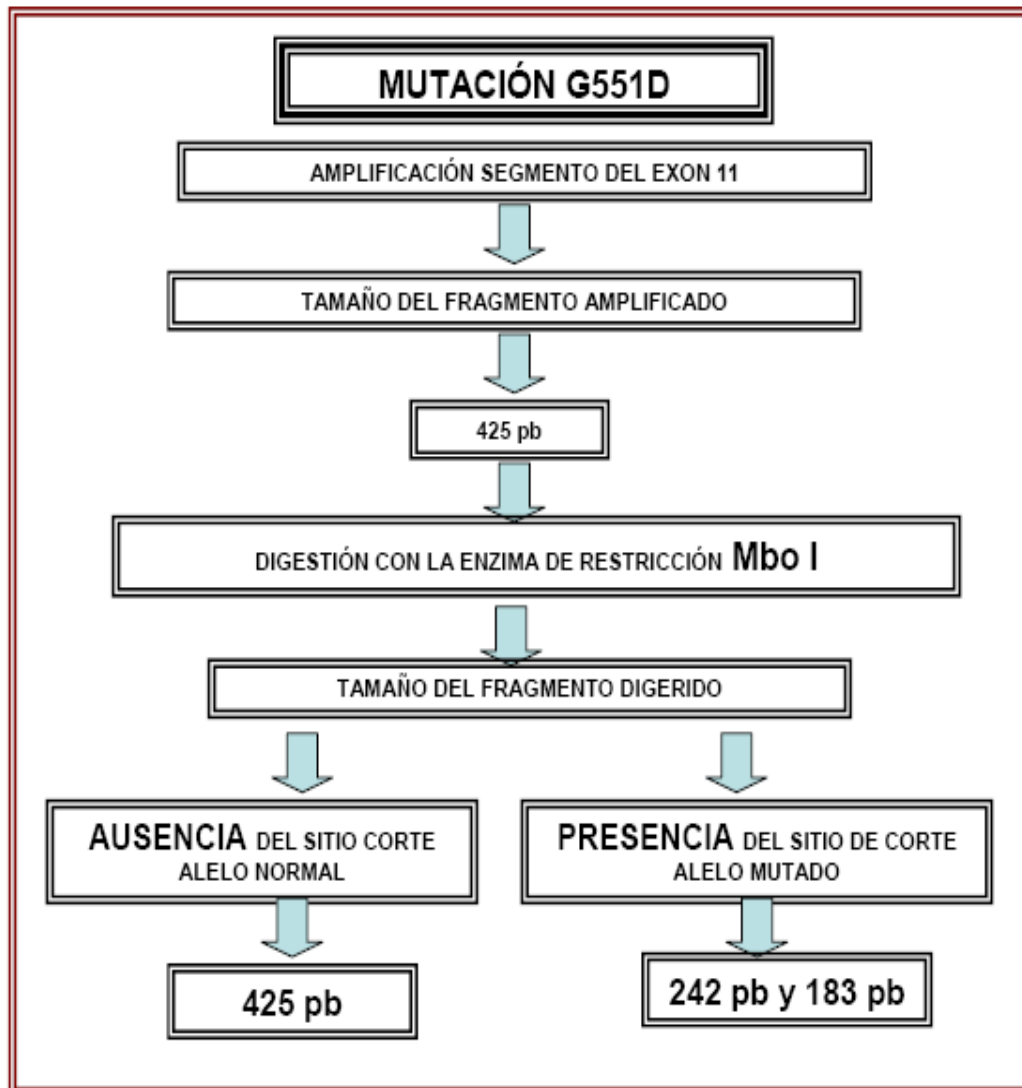
ANEXO 4
ESQUEMA DE ANALISIS PARA LA MUTACION Δ F508



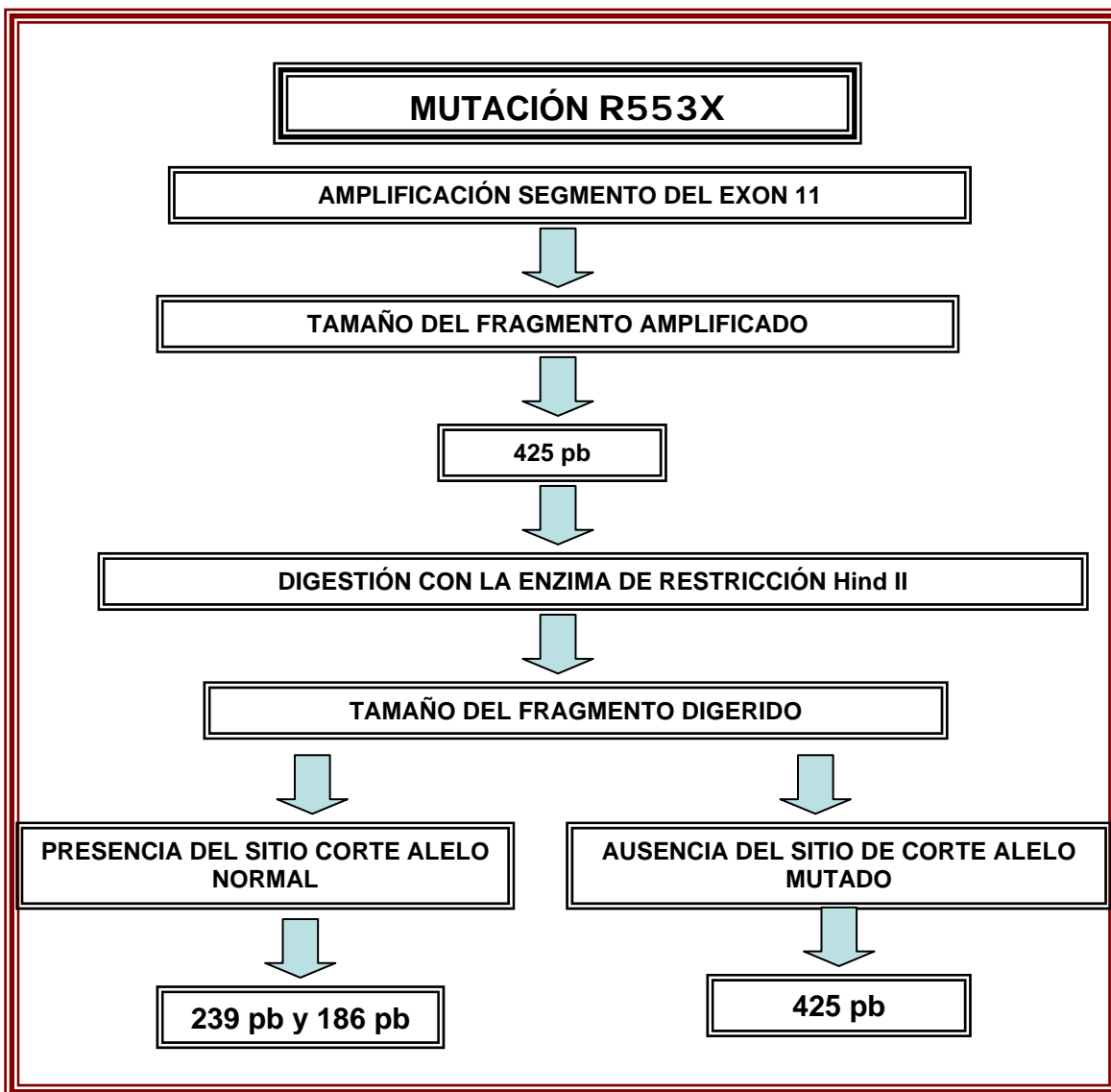
ANEXO 5
ESQUEMA DE ANALISIS PARA LA MUTACION G542X



ANEXO 6
ESQUEMA DE ANALISIS PARA LA MUTACION G551D



ANEXO 7
ESQUEMA DE ANALISIS PARA LA MUTACION R553X



ANEXO 8

SECUENCIA DEL gen *cftr*

CFTR cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (ATP-binding cassette sub-family C, member 7) [Homo sapiens]

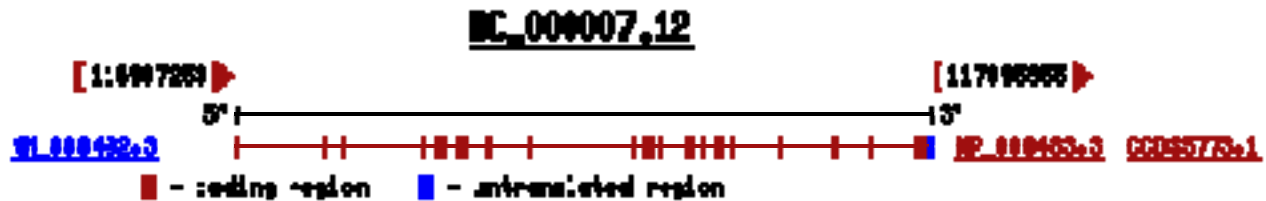
OFFICIAL SYMBOL: CFTR

OFFICIAL FULL NAME: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (ATP-binding cassette sub-family C, member 7)

PRIMARY SOURCE: HGNC: 1884

ORGANISM: Homo sapiens

GENOMIC REGIONS, TRANSCRIPTS, AND PRODUCTS:



GENOMIC CONTEXT: chromosome: 7; Location: 7q31.2



ATGCAGAGGTCGCCT	CTGGAAGAGGCCAGC	GTTGTCTCCAACTT	TTTTTCAGCTGGACC
AGACCAATTTTGAGG	AAAGGATACAGACAG	CGCCTGGAATTGTCA	GACATATACCAAATC
CCTTCTGTTGATTCT	GCTGACAATCTATCT	GAAAAATTTGGAAAGA	GAATGGGATAGAGAG
CTGGCTTCAAAGAAA	AATCCTAAACTCATT	AATGCCCTTCGGCGA	TGTTTTTCTGGAGA
TTTATGTTCTATGGA	ATCTTTTTTATATTTA	GGGGAAGTCACCAA	GCAGTACAGCCTCTC
TTACTGGGAAGAATC	ATAGCTTCCTATGAC	CCGATAACAAGGAG	GAACGCTCTATCGCG
ATTTATCTAGGCATA	GGCTTATGCCTTCTC	TTTATTTGTGAGGACA	CTGCTCCTACACCCA
GCCATTTTTTGGCCTT	CATCACATTGGAATG	CAGATGAGAATAGCT	ATGTTTTAGTTTTGATT
TATAAGAAGACTTTA	AAGCTGTCAAGCCGT	GTTCTAGATAAAAATA	AGTATTGGACAACCTT
GTTAGTCTCCTTTCC	AACAACCTGAACAAA	TTTGATGAAGGACTT	GCATTGGCACATTTT
GTGTGGATCGCTCCT	TTGCAAGTGGCACTC	CTCATGGGGCTAATC	TGGGAGTTGTTACAG
GCGTCTGCCTTCTGT	GGACTTGGTTTCTCTG	ATAGTCTTGGCCCTT	TTTCAGGCTGGGCTA
GGGAGAATGATGATG	AAGTACAGAGATCAG	AGAGCTGGGAAGATC	AGTGAAAGACTTGTG
ATTACCTCAGAAATG	ATTGAAAATATCCAA	TCTGTTAAGGCATAC	TGCTGGGAAGAAGCA
ATGGAAAAATGATT	GAAAACCTAAGACAA	ACAGAACTGAAACTG	ACTCGGAAGGCAGCC
TATGTGAGATACTTC	AATAGCTCAGCCTTC	TTCTTCTCAGGGTTC	TTTGTGGTGTTTTTTA
TCTGTGCTTCCCTAT	GCACTAATCAAAGGA	ATCATCCTCCGGAAA	ATATTACCACCACATC
TCATTCGCATTGTT	CTGCGCATGGCGGTC	ACTCGGCAATTTCCC	TGGGCTGTACAAACA

TGGTATGACTCTCTTT GGAGCAATAAACAAA ATACAGGATTTCTTA CAAAAGCAAGAATAT
 AAGACATTGGAATAT AACTTAAACGACTACA GAAGTAGTGATGGAG AATGTAACAGCCTTC
 TGGGAGGAGGGATTT GGGGAATTAATTTGAG AAAGCAAAACAAAAC AATAACAATAGAAAA
 ACTTCTAATGGTGAT GACAGCCTCTTCTTC AGTAATTTCTCACTT CTTGGTACTCCTGTG
 CTGAAAGATATTAAT TTCAAGATAGAAAAGA GGACAGTTGTTGGCG GTTGC'TGGATCCACT
 GGAGCAGGCAAGACT TCAC'TTCTAATGATG A'TTATGGGAGAACTG GAGCCTTCAGAGGGT
 AAAATTAAGCACAGT GGAAGAATTTTCATTC TGTTCCTCAGTTTTCC TGGATTATGCC'TGGC
 ACCATTAAAGAAAA ATC'ATC'TT'TGGTGT'T TCCTATGATGAATAT AGATA'CA'GAAGCGTC
 ATCAAAGCATGCCAA CTAGAAGAGGACATC TCCAAGTTTGCAGAG AAAGACAATATAGTT
 C'TTGGAGAAGGTGGA ATCACACTGAGTGGG GTTCAACGAGCAAGA ATTTCTTTTAGCAAGA
 GCAGTATACAAAGAT GCTGATTTGTATTTA TTAGACTCTCCTTTT GGATACCTAGATGTT
 TTAACAGAAAAAGAA ATATTTGAAAGCTGT GTCTGTAAACTGATG GCTAACAAAACTAGG
 ATTTTGGTCACTTCT AAAATGGAACATTTA AAGAAAGCTGACAAA ATATTAATTTTGCAT
 GAAGGTAGCAGCTAT TTTTATGGGACATTT TCAGAACTCCAAAAT CTACAGCCAGACTTT
 AGCTCAAACTCATG GGATGTGATTTCTTTC GACCAATTTAGTGCA GAAAGAAGAAATTC
 ATCCTAACTGAGACC TTACACCGTTTCTCA TTAGAAGGAGATGCT CCTGTCTCCTGGACA
 GAAACAAAAAACAA TC'TTTTAAACAGACT GGAGAGTTTGGGGAA AAAAGGAAGAAATTC
 ATTCTCAATCCAATC AACTCTATACGAAAA CCTTTTAGAGAGAAG CGCATCAGCGTGATC
 ATGAATGGCATCGAA GAGGATTC'TGATGAG AACCTGATGACACAC ACACGAAAAGTGTC
 GATTC'TGAGCAGGGA GAGGCGATAC'TGCC'T AACC'TGATGACACAC AGGTTATCTCAAGAA
 C'TTCAGGCACGAAGG AGGCAGTCTGTCC'TG ACACGAAAAGTGTC GAGTGC'TTTTTGAT
 CAGAACATTCACCGA GATATATAT'TCAAGA GAAGAAGACTTAAAG CGATATAT'TACTGTC
 AACTTGACTGAACTG AGTGAAGAAATTAAC TGGAACACATACCTT CTGGCAGAGGTGGCT
 AGTGAAGAAATTAAC CCAGCAGTGACTACA TTTGTGCTAATTTGG AACACTCCTCTTCAA
 CCAGCAGTGACTACA TTTGTGCTAATTTGG AACACTCCTCTTCAA GACAAAGGGAATAGT
 TTTGTGCTAATTTGG AACACTCCTCTTCAA AGTTCGTAT'TATGTG AGTTCGTAT'TATGTG
 CACAGCTATCCAGTG GGAGTAGCCGACTT TTGCTTGCTATGGGA TTCTTCAGAGGTC'TA
 CTAATCACAGTGTCCG AAAATTTTACACCAC AAAATGTTACAT'TCT GGGATTCTTAATAGA
 ATGTC'AACCC'TCAAC ACCTTGAAAGCAGGT CTTCTGCCTCTTACC ATATTTGACTTCATC
 GCAATTTTGGATGAC CTTCTGCCTCTTACC GCAGTTGTGCGAGTT TTACAACCCTACATC
 GTGATTTGGAGCTATA TTTAT'TATGTTGAGA GCATATTTCC'TCCAA ATTTTCACTCATCTT
 CCAGTGATAGTGGCT TTTAT'TATGTTGAGA GAAGGCAGGAGTCCA CAGCCTTACTTTGAA
 AAACAAC'TGGAATCT CGTGCC'TTCGGACGG TTGTACCTGTCAACA TTCATTGCTGTTACC
 GGACTATGGACACTT ACTGCCAACTGGTTC ATTTTGTGTCATCTT ATTTATCCTGACTTTA
 GCTCTGAATTTACAT ATTTTGTGTCATCTT GAAGGAAGAGTTGGT A'TAGATGTGGATAGC
 ATGAGAATAGAAATG ACAACAGGAGAAGGA GCTGTAAACTCCAGC ATAGATGTGGATAGC
 ACAACAGGAGAAGGA AGTACATTGCAGTGG TTCAATGACATGCCA ACAGAAGGTAAACCT
 AGTACATTGCAGTGG AGCCGAGTCTTTAAG T'TCAATGACATGCCA ATGATTA'TTGAGAAT
 AGCCGAGTCTTTAAG CCATACAAGAATGGC TCAGGGGGCCAAATG ACTGTCAAAGATCTC
 CCATACAAGAATGGC GATGACATCTGGCCC ATAT'TAGAGAACAT TCC'TTCTCAATAAGT
 GATGACATCTGGCCC GAAGTGGAAAATGCC ACTGGATCAGGGAAG AGTACTTTGTTATCA
 GAAGTGGAAAATGCC GGCC'TCTTGGGAAGA GAAATCCAGATCGAT GGTGTGCTTGGGAT
 GGCCTCTTGGGAAGA C'TGAACACTGAAGGA TTTGGAGTGATACCA CAGAAAGTATTTATT
 CTGAACACTGAAGGA CAGTGGAGGAAAGCC CCC'TATGAACAGTGG AGTGATCAAGAAATA
 CAGTGGAGGAAAGCC AGAAAAAC'TTGGAT TCTGTGATAGAACAG TTTCC'TGGGAAGCTT
 AGAAAAAC'TTGGAT GAGGTTGGGCTCAGA TCTAAGCCATGGCCAC AAGCAGTTGATGTGC
 GAGGTTGGGCTCAGA GATGGGGGCTGTGTC ATCTTGCTGCTTGAT GAACCCAGTGCTCAT
 GATGGGGGCTGTGTC CTCAGTAAGGCGAAG AGAACTCTAAAACAA GCATTTGCTGAT'TGC
 CTCAGTAAGGCGAAG TACCAAATAAT'TAGA GCAATGCTGGAATGC CAACAATTTTGTGTC
 TACCAAATAAT'TAGA GAACACAGGATAGAA GTGCGGCAGTACGAT CTGAACGAGAGGAGC
 GAACACAGGATAGAA GTGCGGCAGTACGAT ATCAGCCCC'TCCGAC CCCACCGGAAC'TCA
 GTGCGGCAGTACGAT ATCAGCCCC'TCCGAC GCTCTGAAAGAGGAG ACAGAAGAAGAGGTG
 AAGCCCCAGATTGCT GCTCTGAAAGAGGAG ACAGAAGAAGAGGTG CAAGATACAAGGCTT

ANEXO 9

Tabla N° 6. Frecuencia de la mutación $\Delta F508$ detectada en estudios llevados a cabo en Latinoamérica

Población	Número de cromosomas	Cromosomas con $\Delta F508$	Frecuencia $\Delta F508$ (%)
Perú (presente estudio)	24	6	25.0
Venezuela ³⁸	24	10	41.6
Venezuela ⁴⁵	82	41	50.0
Venezuela ⁴⁴	54	16	29.6
Argentina ³⁴	158	96	60.8
Argentina ⁴⁶	440	258	58.6
Brasil ⁵⁰	88	27	30.7
Colombia ³⁸	48	17	35.4
Chile ⁴⁷	72	21	29.2
Chile ⁴⁸	100	45	45.0
México ³⁸	194	79	40.7
México ⁴²	90	43	47.8
Uruguay ⁴⁹	104	42	40.3

ANEXO 10

Tabla N° 7. Frecuencia relativa de las mutaciones estudiadas

Mutación	Frecuencia mundial (%)	Frecuencia en poblaciones hispanas (%)								Frecuencia relativa encontrada (%)
		A	B	C	Ch	M	U	USA	V	
ΔF508	70.0	57.0	48.0	41.8	22.0	40.7	40.3	46.0	29.6	25.0
G542X	2.4	3.9	6.7	3.8	14	6.2	ND	5.4	3.7	8.3
G551D	1.6	ND	0.9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R553X	0.7	ND	0.6	ND	ND	ND	ND	0.8	ND	ND
OTROS	25.3	ND	43.8	ND	ND	ND	ND	47.8	ND	66.7

ND, no descrito; A, Argentina³⁵; B, Brazil³⁶; C, Colombia³⁹; Ch, Chile⁵¹; M, México³⁸; U, Uruguay⁴⁹; USA, Hispanos en USA⁵²; V, Venezuela⁴⁴.