



# ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

## DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

### TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

Identificación de mutaciones en el gen CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) en pacientes ecuatorianos con fibrosis quística mediante secuenciación de Sanger.

AUTOR: ORTIZ SANTANDER, SOFÍA CAROLINA

DIRECTOR: JIMÉNEZ ARIAS, ANA PATRICIA

Sangolquí

2015



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**CERTIFICACIÓN**

Certifico que el trabajo de titulación, "IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) EN PACIENTES ECUATORIANOS CON FIBROSIS QUÍSTICA MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE SANGER." realizado por la señorita **SOFÍA CAROLINA ORTIZ SANTANDER**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar a la señorita **SOFÍA CAROLINA ORTIZ SANTANDER** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 30 de noviembre de 2015

ANA PATRICIA JIMÉNEZ ARIAS

DIRECTORA



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD**

Yo, **SOFÍA CAROLINA ORTIZ SANTANDER**, con cédula de identidad N° 1725595530, declaro que este trabajo de titulación "**IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) EN PACIENTES ECUATORIANOS CON FIBROSIS QUÍSTICA MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE SANGER.**" ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas. Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, 30 de noviembre de 2015

SOFÍA CAROLINA ORTIZ SANTANDER

C.C 1725595530



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **SOFÍA CAROLINA ORTIZ SANTANDER**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación "**IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) EN PACIENTES ECUATORIANOS CON FIBROSIS QUÍSTICA MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE SANGER.**" cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 30 de noviembre de 2015

-----  
SOFÍA CAROLINA ORTIZ SANTANDER

C.C. 1725595530

## **DEDICATORIA**

..... A los niños que padecen fibrosis quística en Ecuador y a sus familias, esperando que esta investigación sea un aporte importante para mejorar su calidad de vida a través del diagnóstico adecuado y pronto tratamiento por parte del Estado.

## AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios y a la Virgen por acompañarme y bendecirme en cada paso de mi vida. A mis padres Alexis Ortiz y Dorys Santander por su apoyo y respeto en las decisiones que he tomado, por enseñarme con su ejemplo a ser una persona humilde, y a alcanzar mis metas con esfuerzo y dedicación.

A mis hermanos David y María José por su cariño, alegría y admiración en cada logro mi vida. A mi familia: mis abuelitos, tíos y primos por todo el cariño y preocupación.

A mi novio Ricardo Manzano, por ser mi luz, por su apoyo y cariño en toda esta etapa de la universidad, por ser mi compañero y darme fuerzas para seguir adelante.

A mis amigos: Leslie, David, Fabricio y Daniela por brindarme su amistad sincera, alegría y apoyo incondicional.

A mis profesores: pilar básico en mi formación académica, en especial a la Dra. Patricia Jiménez, por confiar en mí y en este proyecto, por su apoyo y consejos.

Al equipo de Biología Molecular de NETLAB, por confiarme este proyecto tan importante, y a la Fundación Ecuatoriana de Fibrosis Quística por apoyarnos en el contacto con los pacientes para que este proyecto sea posible.

## ÍNDICE

	DEDICATORIA .....	v
	AGRADECIMIENTO .....	vi
	ÍNDICE.....	vii
	INDICE DE TABLAS.....	ix
	ÍNDICE DE FIGURAS .....	x
	RESUMEN .....	xi
	ABSTRACT .....	xii
	CAPÍTULO 1 .....	1
	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Formulación del problema .....	1
1.2	Justificación .....	2
1.3	Objetivos .....	4
1.3.1	General .....	4
1.3.2	Específicos .....	4
1.4	Marco teórico.....	5
1.4.1	El gen y la proteína CFTR .....	5
1.4.1.1	Gen CFTR.....	5
1.4.1.2	Proteína CFTR .....	6
1.4.1.2.1	Actividad de la proteína CFTR.....	8
1.4.1.3	Funcionamiento anormal de la proteína CFTR.....	9
1.4.2	Mutaciones del gen CFTR .....	10
1.4.2.1	Mutaciones más comunes en Latinoamérica.....	13
1.4.2.2	Mutaciones en Ecuador .....	13
1.4.3	Fibrosis Quística.....	14
1.4.3.1	Métodos de diagnóstico de la Fibrosis Quística.....	16
1.4.3.1.1	Pruebas moleculares.....	16
1.4.3.1.2	Estrategia de diagnóstico.....	17
1.4.4	Secuenciación .....	20
1.4.4.1	Método de secuenciación por ciclos térmicos.....	21
1.4.4.2	Secuenciación automatizada .....	22
1.4.4.3	Electroforesis capilar.....	22

1.5	Sistema de hipótesis .....	23
	CAPÍTULO 2 .....	24
	MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
2.1	Participantes .....	24
2.2	Zona de estudio .....	24
2.4	Procedimientos .....	25
2.4.1	Muestras clínicas .....	25
2.4.3	Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa de los exones del gen CFTR .....	25
2.4.4	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR .....	26
2.4.5	Purificación de los productos de PCR .....	27
2.4.6	Reacción de secuenciación .....	32
2.4.8	Electroforesis capilar .....	34
	CAPÍTULO 3 .....	36
	RESULTADOS .....	36
3.1	Muestras clínicas .....	36
3.2	Extracción y cuantificación de ADN de las muestras de sangre periférica ....	36
3.3	Amplificación de exones por Reacción en Cadena de la Polimerasa y electroforesis en gel de agarosa .....	36
3.4	Reacción de secuenciación y electroforesis capilar .....	39
3.5	Análisis de secuencias .....	40
3.6	Análisis estadístico de resultados .....	43
3.6.1	Población .....	43
3.6.2	Frecuencias alélicas de las mutaciones del gen CFTR .....	46
3.6.3	Selección de pacientes para la determinación de frecuencias alélicas .....	46
3.6.4	Cálculo de frecuencias alélicas de mutaciones patogénicas .....	50
3.6.5	Panel de mutaciones del gen CFTR para la población ecuatoriana y comparación de las mutaciones con reportes en otras poblaciones. ....	51
	CAPÍTULO 4 .....	53
	DISCUSIÓN .....	53
	CAPÍTULO 5 .....	58
	CONCLUSIONES .....	58
	CAPÍTULO 6 .....	59



RECOMENDACIONES .....	59
CAPÍTULO 7 .....	60
BIBLIOGRAFÍA .....	60
Anexos .....	65

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Funciones de la proteína CFTR .....	8
Tabla 2. Ejemplos de mutaciones del gen CFTR.....	11
Tabla 3. Protocolo de PCR.....	26
Tabla 4. Protocolos de purificación. ....	27
Tabla 5. Ensayos de purificación de PCR.....	30
Tabla 6. Protocolos de purificación de productos de secuenciación.....	32
Tabla 7. Mutaciones sin significado clínico, en 7 pacientes con doble positivo para el test del sudor .....	48
Tabla 8. Datos clínicos de pacientes homocigotos para la p.H609R. ....	49
Tabla 9. Alelos para las mutaciones patogénicas de este estudio.. ....	50
Tabla 10. Frecuencias alélicas de mutaciones patogénicas encontradas en este estudio	51
Tabla 11. Prueba de hipótesis para la diferencia de proporciones de las mutaciones patogénicas en Ecuador y otros países.....	52
Tabla 12. Ensayos de protocolos de purificación.....	65
Tabla 13. Datos de los pacientes analizados en este estudio.....	65
Tabla 14. Concentraciones y radios de muestras de ADN genómico .....	68
Tabla 15. Variaciones de secuencia encontradas en este estudio para los 27 exones del gen CFTR.....	70
Tabla 16. Técnicas de diagnóstico molecular de la FQ. ....	74
Tabla 17. Tamaños del producto amplificado de los 27 exones del gen CFTR.....	77
Tabla 18. Secuencias de referencia de los 27 exones del gen CFTR.....	78
Tabla 19. Valores del test del sudor para los 48 pacientes de este estudio .....	79

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Exones del gen CFTR.....	5
Figura 2. El gen y la proteína CFTR.....	6
Figura 3. Estructura de la proteína CFTR.....	7
Figura 4. Mutaciones del gen CFTR.....	12
Figura 5. Algoritmo de diagnóstico para pacientes con cuadro típico de FQ.....	19
Figura 6. Algoritmo de diagnóstico para pacientes con cuadro atípico de FQ.....	19
Figura 7. Algoritmo de diagnóstico para portadores de FQ.....	20
Figura 8. Secuenciación de Sanger.....	21
Figura 9. Secuenciación automatizada.....	23
Figura10. Electroforesis en gel de agarosa Exón 1(146pb).....	37
Figura11. Electroforesis en gel de agarosa Exón 14b (212pb). .....	37
Figura12. Electroforesis en gel de agarosa Exón 10 (277pb). .....	38
Figura13. Electroforesis en gel de agarosa Exón 17a (250pb).....	38
Figura14. Electroferograma de la muestra 7. ....	39
Figura15. Electroferograma de la muestra 7. ....	39
Figura16. Muestra 38, Muestra 34 para la mutación p.F508del. ....	40
Figura17. Muestra 25 , Muestra 22 para la mutación p.G85E. ....	41
Figura18. Muestra 16 , Muestra 7 para la mutación p.H609R.....	41
Figura19. Variante NG_016465.3:g.19395G>A exón 1.....	42
Figura20. Variante c.204099A>C exón 22.....	42
Figura21. Árbol de distancias de países de Latinoamérica de acuerdo a las mutaciones patogénicas del gen CFTR. ....	83

## RESUMEN

La fibrosis quística es una enfermedad autosómica recesiva causada por mutaciones del gen CFTR. Esta enfermedad involucra el daño pulmonar progresivo, insuficiencia pancreática, dificultad en la motilidad intestinal, y altas concentraciones de electrolitos en el sudor. Más de 1900 variaciones del gen CFTR han sido reportadas, la alta heterogeneidad de mutaciones y su prevalencia se observan principalmente en América Latina dificultando el diagnóstico de la fibrosis quística en esta región. A diferencia de países de Norteamérica y Europa donde la esperanza de vida para pacientes con fibrosis quística es de 38 años, en Ecuador es de 9.5 años. El diagnóstico molecular de esta enfermedad en pacientes ecuatorianos se realiza en el exterior donde se evalúan paneles de mutaciones comunes a nivel mundial en su mayoría de la población caucásica. Debido a la alta variabilidad en el genotipo de mutaciones del gen CFTR entre países, estas no necesariamente coinciden con las mutaciones del gen de la fibrosis quística en nuestro país. Esta investigación tuvo como objetivo determinar las mutaciones en pacientes ecuatorianos con fibrosis quística a través de la secuenciación de los 27 exones del gen CFTR, con el fin de establecer un panel de mutaciones comunes en nuestra población que facilite el diagnóstico de la enfermedad. El panel de mutaciones sugerido por este estudio como screening inicial para pacientes con esta enfermedad en Ecuador corresponde a las mutaciones p.F508del, p.G85E, p.W1098X, p.R1162X, p.N1303K y adicionalmente la mutación p. H609R que constituye el segundo reporte a nivel mundial en la población ecuatoriana.

### **Palabras clave:**

- **CFTR**
- **SECUENCIACIÓN**
- **MUTACIÓN**
- **HETEROGENEIDAD**
- **DIAGNÓSTICO MOLECULAR**

## ABSTRACT

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disease caused by mutations in the CFTR gene. CF involves the lung damage, exocrine pancreatic insufficiency, liver disease, intestinal motility disorder and high concentrations of sweat chlorides due a mucus hyperviscosity. To date, more than 1900 sequence variations in the CFTR gene have been reported, the high heterogeneity of the mutation spectrum in CFTR gene has been observed particularly in countries from Latin America, this disturbs the molecular diagnosis of cystic fibrosis in this region. Developed countries from North America and Europe provide timely diagnosis and management of the disease so life expectancy for patients with cystic fibrosis is 38 years while in Ecuador is 9.5 years. Molecular diagnosis of Ecuadorian patients with cystic fibrosis is made abroad, with panels of common mutations worldwide that are predominantly Caucasian. Due to the high variability of genotype CFTR gene mutations among countries, these do not necessarily match with the mutations of this gene in our country. This research aimed to determine mutations in patients with cystic fibrosis Ecuador through the sequencing of the 27 exons of the CFTR gene, in order to establish a panel of common mutations in our population that helps the diagnosis of the cystic fibrosis in Ecuador. The panel of mutations suggested by this study as an initial screening for patients with this disease in Ecuador includes: p.F508del, p.G85E, p.W1098X, p.R1162X, p.N1303K mutations and p. H609R mutation which is the second global report on the Ecuadorian population.

### **Keywords:**

- **CFTR**
- **SECUENCYNG**
- **MUTATION**
- **HETEROGENEITY**
- **MOLECULAR DIAGNOSIS**

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Formulación del problema

La fibrosis quística es una enfermedad autosómica recesiva causada por mutaciones en el gen que codifica la proteína CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*), corresponde a un deterioro multisistémico que como resultado de la generación de moco hiperviscoso produce daño progresivo en los pulmones e hígado, insuficiencia pancreática exocrina, dificultad en la motilidad intestinal, infertilidad en hombres y concentraciones altas de electrolitos en el sudor (Kan, Roth, Piltcher, & Oliveira, 2015).

Se han identificado más de 1900 mutaciones del gen CFTR las cuales varían de acuerdo al origen geográfico y/o étnico (Derichs, 2013). El diagnóstico molecular de la fibrosis quística se dificulta principalmente en América Latina debido a la alta variabilidad de mutaciones del gen CFTR entre países (Luna, Pivettaa, Keyeuxb, & Perez, 2007).

El promedio de vida de los pacientes con fibrosis quística de países desarrollados de Norteamérica y Europa alcanza los 38 años con la ayuda de un diagnóstico oportuno y programas de manejo de la enfermedad, mientras que en Latinoamérica está dentro de la segunda década de vida, y en Ecuador es de 9.5 años (Hernández & González, 2013).

El estudio del gen CFTR en pacientes ecuatorianos con fibrosis quística utilizando un panel de 29 mutaciones reportadas en Europa, encontró que la incidencia de la mutación p.F508del y p.G542X en Ecuador es diferente a la registrada en España, incluso a la de Colombia, lo que demuestra una composición genética diferente de la población española, ecuatoriana y colombiana, además el 50% de pacientes analizados

en este estudio tienen mutaciones sin identificar (Valle, Burgos, Valle, Egas, & Ruiz, 2007).

En 1999, Paz y Miño & otros, estudió en 14 sujetos ecuatorianos con fibrosis quística la mutación  $\Delta F508$  considerada la más común a nivel mundial mediante PCR y en 6 de ellos analizó siete mutaciones frecuentes en la población europea (G542X, N1303K, 1717-1, W1282X, G551D, R553X,  $\Delta 1507$ ). La frecuencia de la mutación  $\Delta F508$  fue 26.92% y ninguna de las otras 7 fue detectada. Este estudio sugirió que al menos el 46.15% de las mutaciones en la población estudiada son diferentes a las más comunes de Europa (Paz y Miño, Pérez, Burgos, Dávalos, & Leone, 1999).

## 1.2 Justificación

En Ecuador se han investigado de 1 (H609R,  $\Delta F508$ ) a 29 mutaciones en más de 80 pacientes de diferentes ciudades del Ecuador, pero las herramientas de diagnóstico son limitadas, siendo necesario realizarse pruebas diagnósticas en el exterior, lo que ha incrementado los costos para al paciente, haciéndolas a veces inaccesibles.

Luna *et. al* (2007) indicó que en primera instancia debería someterse a los pacientes con fibrosis quística a un panel básico de las 6 mutaciones más comunes en América Latina (p.F508del, p.G542X, p.R1162X, p.N1303K, p.R334W, p.G85E) y posteriormente a un panel de mutaciones particulares seleccionadas geográficamente para los pacientes con genotipo desconocido (Luna, Pivetta, Keyeuxb, & Perez, 2007).

La diversidad de mutaciones del gen CFTR a escala mundial y regional, genera la necesidad de incrementar la investigación de este gen en la población ecuatoriana con el fin de establecer paneles con mutaciones propias que permitan mejorar el diagnóstico de la enfermedad, y mucho más en Ecuador donde la investigación en esta área es aún incipiente.

El estudio molecular del gen CFTR de Valle y otros en 2007 (Valle, Burgos, Valle, Egas, & Ruiz, 2007) en pacientes ecuatorianos con fibrosis quística, sugiere el uso de métodos como la secuenciación y el test de deleciones para identificar mutaciones características de la población, así como lo han hecho otros países hispanos.

La secuenciación directa de los genes y la búsqueda de reordenamientos genómicos del gen CFTR puede detectar otras posibles mutaciones prevalentes a nivel regional, esto mejoraría la confirmación del diagnóstico molecular, análisis portador y el consejo genético, además de aportar en el desarrollo del cribado neonatal y la generación de pruebas rentables (Lay, Puga, Astudillo, & Repetto, 2011)

Este proyecto de investigación por lo tanto, está enfocado a determinar las mutaciones del gen CFTR en la población ecuatoriana utilizando el método de secuenciación, y con ello establecer un panel de mutaciones más comunes para nuestra población.

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1 General**

Determinar las mutaciones del gen CFTR en pacientes ecuatorianos con fibrosis quística mediante secuenciación de Sanger.

### **1.3.2 Específicos**

- Determinar si la prevalencia de la mutación delF508 para este estudio es similar a la reportada en otros países de Latinoamérica.
- Determinar las frecuencias de las mutaciones más comunes: p.G85E, p.G542X, p.G551D, p.R334W, p.N1303K reportadas en la población ecuatoriana y compararlas con estudios previos.
- Identificar la presencia de la mutación H609R reportada en un solo estudio previo en Ecuador, en los individuos de este estudio y otras mutaciones no reportadas.
- Definir un panel de mutaciones más frecuentes en la población ecuatoriana.

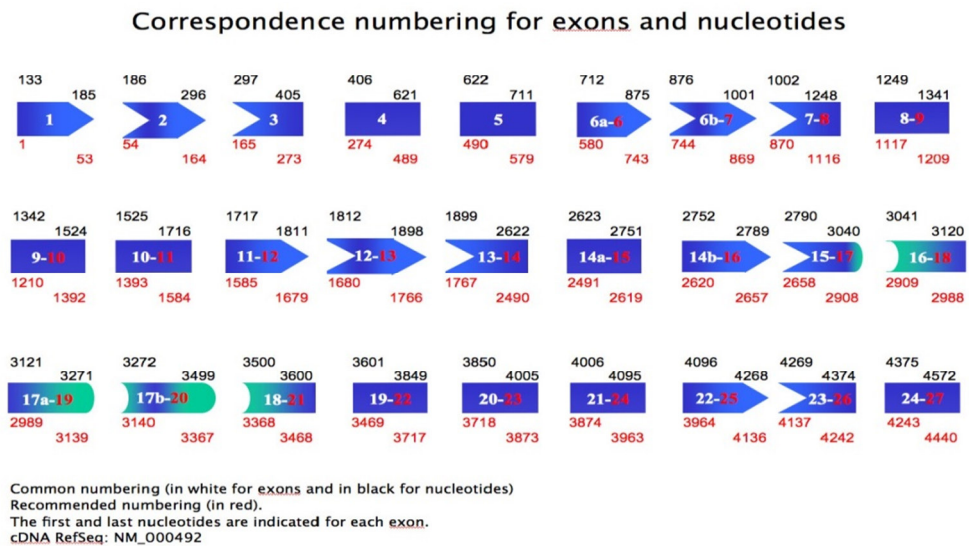


## 1.4 Marco teórico

### 1.4.1 El gen y la proteína CFTR

#### 1.4.1.1 Gen CFTR

El gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) se encuentra ubicado en brazo largo del cromosoma 7 en la posición q31.2, y pertenece a la familia de los genes ABC (Genetics Home Reference, 2008), tiene alrededor de 250 kilobases por lo tanto presenta un blanco mutacional grande (Lay & Repetto, 2010), y codifica un mRNA de 6.5kb (Fanen & Hasnain, 2004). Está formado por 27 exones que en principio eran enumerados del 1 al 24, pero existen subdivisiones a y b en los exones 6, 14 y 17 (Universal Mutation Database, 2005) **Figura 1.**

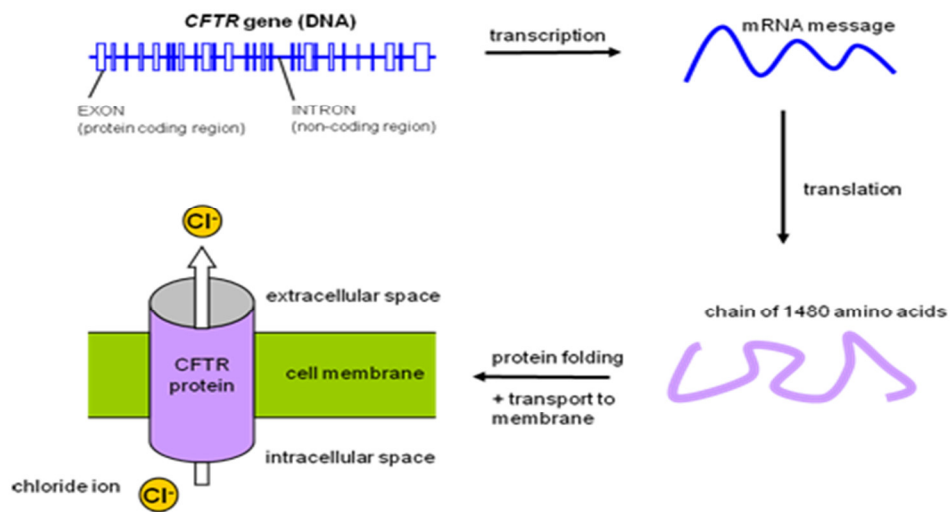


**Figura 1. Exones del gen CFTR**  
Fuente: Universal Mutation Database (2005)

Los genes de la familia casete de unión a ATP (ABC) contienen la información para formar proteínas de membrana celular transportadoras de varios tipos de moléculas como grasas, azúcares, aminoácidos y drogas. Estas proteínas se ubican en varios tejidos del organismo y utilizan energía a partir de moléculas de ATP para

mover sustancias a través de las membranas celulares. Se encuentran agrupadas en esta familia porque tienen dominios comunes que se unen al ATP (Genetics Home Reference, 2008)

El gen CFTR contiene las instrucciones para producir la proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística, presente en la membrana de las células que producen secreciones (Genetics Home Reference, 2008). Esta proteína actúa como un canal que transporta iones de cloro dentro y fuera de la células (CFTR Science, 2015), también es reguladora de otros canales iónicos como los que transportan el  $\text{Na}^+$  y  $\text{HCO}_3^-$  (Ntimbane, y otros, 2008) **Figura 2.**

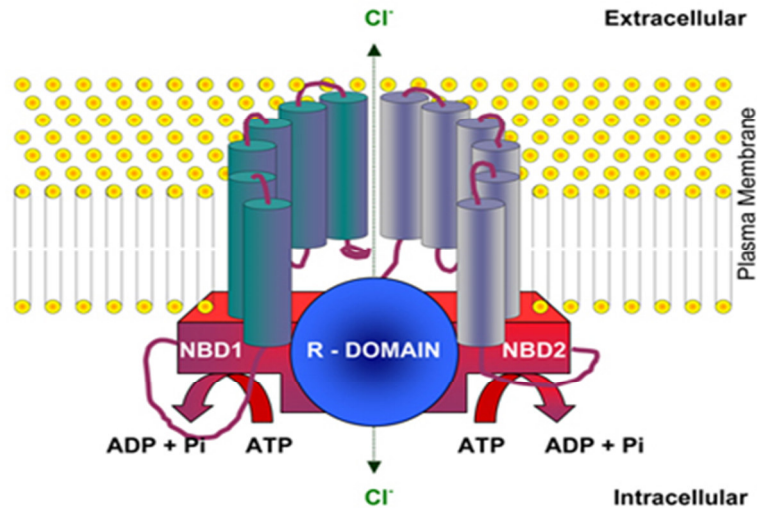


**Figura 2. El gen y la proteína CFTR**  
Fuente: Nchpeg (sin año)

#### 1.4.1.2 *Proteína CFTR*

Es una glicoproteína de membrana de 1480 aminoácidos con un peso molecular de 180 kDa. Funciona como un canal transportador de cloruro, regulado por AMPc (Ntimbane, y otros, 2008).

Su estructura se basa en cinco dominios: dos transmembranales TMD1 y TMD2 que forman el poro del canal, un dominio regulatorio R, y dos dominios de unión de nucleótidos: NBD1 y NBD2 (Derichs, 2013) **Figura 3.**



**Figura 3. Estructura de la proteína CFTR**

Fuente: Gene Medicine (2012)

Los dominios NBDs contienen una serie de motivos conservados que atrapan e hidrolizan ATP, lo cual controla el transporte del canal (Gene Medicine, 2012).

La apertura del canal ocurre por la fosforilación del dominio R por la proteína quinasa A y la unión de ATP a los dominios NBD1 y NBD2 (Derichs, 2013).

El aumento de los niveles de c-AMP dentro de una célula epitelial secretora genera la activación de la proteína quinasa A, que se une al sitio de fosforilación en el dominio R de la proteína CFTR, abriendo el canal. El canal de cloruro CFTR básicamente es un atrayente electrostático de los aniones de cloro en el medio intracelular y extracelular, debido a los dominios cargados positivamente dentro del canal (Schwarz, Gardner, Renwick, & Robinson, 2009)

#### 1.4.1.2.1 *Actividad de la proteína CFTR*

La actividad total de la proteína corresponde al transporte total de iones mediado por canales CFTR en la superficie celular y se encuentra determinada por (CFTR Science, 2015):

- La cantidad de CFTR: el número de canales de CFTR en la superficie celular
- La función del CFTR: la capacidad funcional de cada canal para abrir y transportar de iones

La cantidad de proteína depende de la síntesis, transcripción génica, empalme adecuado, y la traducción del ARNm a la proteína CFTR, su posterior procesamiento, maduración y llegada a la superficie celular. Otro factor importante es la estabilidad de la proteína en la superficie, es decir, el tiempo que un canal CFTR permanece en la superficie de la célula antes de ser eliminado y reciclado. La función del CFTR se determina por la probabilidad de que el canal esté abierto, y la conductancia del mismo. (CFTR Science, 2015)

#### 1.4.1.2.2 *Funciones de la proteína CFTR*

La función de la proteína CFTR en los diferentes órganos, se resume en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.**  
**Funciones de la proteína CFTR**

<b>Órgano</b>	<b>Función de la proteína CFTR</b>
<b>Estructura nasal</b>	Regular el equilibrio de sal y agua para la hidratación normal del mucus y su adecuado transporte en los conductos seno nasales.
<b>Pulmones</b>	Ayuda a regular el equilibrio de sal y agua, permitiendo la hidratación normal de las vías respiratorias y el aclaramiento mucociliar normal.
<b>Conductos del sudor</b>	El cloro atraviesa los canales de la proteína CFTR, generando una absorción de sodio para mantener normales los niveles de cloro en el sudor.
<b>Órganos</b>	Regula el transporte de cloruro y bicarbonato <i>CONTINÚA</i> →

<b>reproductores</b>	lo cual promueve el desarrollo normal del conducto deferente en los varones. El balance de sal y agua ayuda a hidratar la mucosa cervical en mujeres.
<b>Tracto gastrointestinal</b>	Regula el balance de electrolitos y fluidos, permitiendo la hidratación y el pH intestinal adecuado, así como la composición normal de las secreciones intestinales.
<b>Páncreas</b>	Regula el transporte de cloruro y bicarbonato para mantener el volumen y pH normal de las secreciones pancreáticas.

Fuente: CFTR Science (2015).

#### 1.4.1.3 *Funcionamiento anormal de la proteína CFTR*

Las mutaciones en el gen CFTR, y la posterior afectación a la proteína que codifica causa una serie de patologías, entre ellas están (Genetics Home Reference, 2008):

- ***Ausencia congénita bilateral de los conductos deferentes***

La mucosidad espesa generada por el defecto de la proteína CFTR y el consecuente flujo anormal de iones cloruro y de agua, hace que los conductos deferentes que transportan los espermatozoides a los testículos se taponen , evitando que lleguen a convertirse parte del semen, generando infertilidad.

- ***Fibrosis quística***

Como resultado de un transporte anormal de iones de cloruro y agua, las células que recubren los conductos de los pulmones, el páncreas y otros órganos producen moco anormalmente espeso y pegajoso. El moco anormal obstruye las vías respiratorias y las glándulas, lo que lleva a los signos y síntomas característicos de la fibrosis quística.

- ***Otros trastornos***

No son numerosas las mutaciones en el gen CFTR asociadas en problemas aislados que afectan al sistema digestivo o respiratorio: pancreatitis idiopática, inflamación del páncreas que causa dolor abdominal, náuseas, vómitos y fiebre. Los cambios en el gen CFTR se han asociado con la rinosinusitis y otros problemas respiratorios que se fundamentan en el bloqueo parcial de las vías respiratorias.

### 1.4.2 *Mutaciones del gen CFTR*

Más de 1900 variaciones del gen CFTR han sido reportadas, de las cuales sólo 20 mutaciones tienen una frecuencia  $> 0.1\%$ , siendo la más común la mutación p.F508del, seguida por cuatro mutaciones p.G551D, p.W1282X, p.G542X y p.N1303K, con una prevalencia mundial entre el 1 al 3% cada una (Derichs, 2013)

De manera general, se han clasificado las mutaciones reportadas, en 6 categorías (Derichs, 2013) **Figura 4** :

**Clase I y II:** se caracterizan por la reducción en la cantidad de proteína CFTR expresada.

Las mutaciones de la clase I pueden ser mutaciones sin sentido y de cambio de marco de lectura, así como defectos en el empalme del ARNm. Las mutaciones de clase II, incluyendo la p.F508del, producen defectos en el plegamiento o maduración, provocando una degradación prematura de la proteína.

**Clase III y IV:** se caracterizan por el mal funcionamiento del canal CFTR.

Las mutaciones clase III resultan de una apertura limitada del canal debido a una inadecuada unión a los NBDs; un ejemplo es la p.G551D que representa del 2 al 3% de las mutaciones CFTR en todo el mundo.

Las mutaciones clase IV se caracterizan porque aunque el canal sea capaz de abrir y cerrarse, los iones de cloruro y bicarbonato no atraviesan libremente el canal debido a defectos de conductancia.

**Clase V:** aunque existe producción de CFTR normal, los problemas en la regulación transcripcional hacen que se genere poca cantidad de la proteína (Derichs, 2013). Estas mutaciones afectan a la regulación de otros canales iónicos tales como el canal de sodio ENaC y el canal de cloruro rectificador (ORCC) (Schwarz, Gardner, Renwick, & Robinson, 2009).

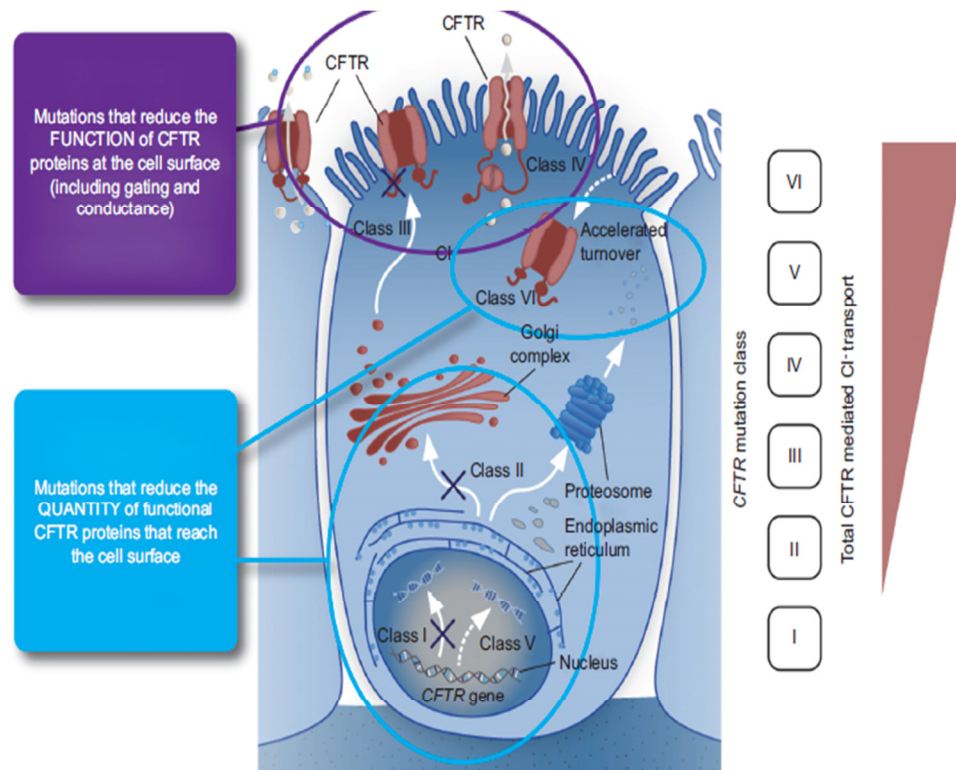
**Clase VI:** se caracterizan por la rotación de la CFTR en la superficie del canal.

En la **Tabla 2.** Se resumen algunos ejemplos para cada una de las clases de mutaciones:

**Tabla 2.**  
**Ejemplos de mutaciones del gen CFTR**

Clase de mutación	Ejemplo
I	p.Gly542X c.489+1G>T (621+1G>T) c.579+1G>T (711+1G>T)
II	p.Phe508del p.Ile507del p.Asn1303Lys
III	p.Gly551Asp
IV	p.Arg117His p.Arg334Trp
V	c.1210-12T[5] (alelo 5T) c.3140-26A>G (3272-26A>G) c.3850-2477C>T (3849+10kbC>T)

Fuente: Universal Mutation Database (2005)



#### Figura 4. Mutaciones del gen CFTR.

Las mutaciones del gen CFTR se clasifican en 6 clases. Las clases I, II, V y VI dan como resultado en ausencia o reducción de la cantidad de la proteína CFTR en la membrana celular, mientras que las clases III y IV tienen influencia en la función o actividad de CFTR en la membrana celular.

Fuente: Derichs (2013)



#### 1.4.2.1 *Mutaciones más comunes en Latinoamérica*

En el 2007, un estudio de meta análisis recolectó datos de mutaciones reportadas en 10 países de Latinoamérica: Argentina, Brasil, Chile, Colombia, México, Ecuador, Venezuela, Costa Rica, Cuba, Uruguay (Luna, Pivettaa, Keyeuxb, & Perez, CFTR gene analysis in Latin American CF patients: Heterogeneous origin and distribution of mutations across the continent, 2007).

En los 4354 cromosomas de pacientes con fibrosis quística analizados s, se encontraron 89 mutaciones, de las cuales las mutaciones con una frecuencia  $\geq 0.1\%$  fueron p.F508del (49.69%), p.G542X (5.08%), p.N1303K (1.65%), p.W1282X(1.13%) y p.R1162X (0.96%) . Adicionalmente se encontró un 37.21% de mutaciones desconocidas.

Las mutaciones denominadas “raras” con una frecuencia  $< 0.1\%$  fueron p.R75X 3,c.W1089X ,c.406-1GNA,c.1898+1GNA, c.2686\_2687insT, p.L206W ,p.I506T ,p.S589I , c.711+1GNT , c.935delA , c.2055\_2063del , c.2347delG , c.2566\_2567insT, c.2789+2\_2789+3ins, c.3199\_3204del , c.3272-26ANG , c.4016\_4017insT, las cuales fueron encontradas incluso en un solo paciente de un país específico.

Un análisis inicial debería incluir el panel de las 6 mutaciones más comunes: p.F508del, p.G542X, p.R1162X, p.N1303K, p.R334W, p.G85E y posteriormente las mutaciones seleccionadas geográficamente (mutaciones particulares o exones y límites exón / intrón) en aquellos pacientes en los que el genotipo sigue siendo desconocido.

#### 1.4.2.2 *Mutaciones en Ecuador*

En 1999, se realizó un estudio en 14 sujetos ecuatorianos para la detección de la mutación  $\Delta F508$  mediante PCR y en 6 de ellos se analizaron también siete mutaciones frecuentes en la población europea (G542X, N1303K, 1717-1, W1282X, G551D, R553X,  $\Delta 1507$ ), mediante el test INNO-Lipa. La frecuencia de  $\Delta F508$  fue 26.92% y

ninguna de las otras siete fue detectada. Este estudio sugirió que al menos el 46.15% de las mutaciones en la población estudiada son diferentes a las más comunes de Europa (Paz y Miño, Pérez, Burgos, Dávalos, & Leone, 1999)

Posteriormente, otro estudio determinó que la incidencia de la enfermedad en Ecuador es de 1:111.252 recién nacidos, y que las mutaciones más comunes usando un kit comercial con mutaciones de origen europeo son F508del (37.1%), G85E (8.9%), G542X (2.4%), G551D (1.6%), R334W (0.8%), N1303K (2.4%) (Valle, Burgos, Valle, Egas, & Ruiz, 2007).

Adicionalmente, una investigación en 6 pacientes ecuatorianos con fibrosis quística reportaron que 4 de estos eran homocigotos para la mutación H609R, la cual no ha sido encontrada en otra población (Moya, Glover, Mondéjar, Pastor, Fernández, & Sánchez, 2009).

### **1.4.3 *Fibrosis Quística***

La fibrosis quística es una de las enfermedades hereditarias autosómicas recesivas más comunes y estudiadas en la población caucásica, donde afecta en 1 de cada 2500 individuos, sin embargo también ocurre con frecuencias diferentes en otras poblaciones. Es un desorden multisistémico ya que involucra el daño al sistema pulmonar, pancreático gastrointestinal y reproductivo, debido a las mutaciones del gen que codifica la proteína CFTR (Schwarz, Gardner, Renwick, & Robinson, 2009)

El defecto en la proteína CFTR produce la pérdida de la conductancia de iones cloruro, resultando en la absorción incorrecta de sal en los conductos del sudor en la piel, falta de componentes salinos y acuosos en las secreciones, o el aumento de la viscosidad y el espesor de la mucosidad en las vías respiratorias y gastrointestinales (Ntimbane, y otros, 2008).

Las manifestaciones más comunes de la fibrosis quística en los diferentes órganos, se muestran a continuación:

- ***En el sistema respiratorio***

Es uno de los sistemas más vulnerables en la fibrosis quística, debido a que el moco hiperviscoso bloquea las vías respiratorias generando un cuadro clínico similar a las enfermedades obstructivas crónicas. Adicionalmente, la disfunción de la proteína CFTR predispone al paciente a la colonización secundaria con bacterias patógenas (Schwarz, Gardner, Renwick, & Robinson, 2009), como *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae*, que probablemente participan en la progresión de la enfermedad (Ntimbane, y otros, 2008).

- ***En el páncreas***

El 99% de los pacientes con fibrosis quística presentan insuficiencia pancreática, la proteína CFTR defectuosa provoca un volumen y fluidez reducidos de las enzimas digestivas exocrinas. El aumento de la viscosidad de las secreciones hace que las proenzimas digestivas se activen antes de alcanzar el duodeno originando daños e inflamación en los conductillos pancreático, lo que genera la inflamación crónica del páncreas. La disminución de la capacidad exocrina de las enzimas digestivas, produce la mala absorción de grasas y proteínas (Schwarz, Gardner, Renwick, & Robinson, 2009).

La fibrosis quística ha sido también relacionada con la diabetes. La homeostasis anormal de la glucosa en pacientes con FQ puede darse debido al deterioro progresivo de la función de las células  $\beta$  en islotes de Langerhans, el deterioro de la función de la hormona secretina intestinal de la insulina, y cambios en la sensibilidad a la insulina. (Ntimbane, y otros, 2008).

- ***Tracto gastrointestinal***

En aproximadamente el 10% de los recién nacidos, el íleo meconial es un signo importante de la fibrosis quística. Algunas manifestaciones como

varices esofágicas y esofagitis péptica no se producen como resultado directo de las mutaciones del gen CFTR, debido a que esta mucosa no contiene proteína CFTR, pero sí en el intestino delgado y en menor medida en el intestino grueso (con menos CFTR), el transporte de cloro inadecuado produce una mucosidad pegajosa y espesa, lo que reduce su capacidad de absorción (Schwarz, Gardner, Renwick, & Robinson, 2009).

#### **1.4.3.1 Métodos de diagnóstico de la Fibrosis Quística**

El diagnóstico de la fibrosis quística se establece cuando los individuos presentan una o más características fenotípicas propias de la enfermedad, además una evidencia de la anomalía en la función del gen CFTR de acuerdo a:

- La presencia de variantes alélicas patogénicas del gen CFTR
- Dos valores de cloruro en el sudor anormales ( $> 60$  mEq / L).
- Medidas del diferencial transepitelial nasal (NPD)
- Niveles elevados de la IRT, como método de diagnóstico en recién nacidos

Entre las principales características fenotípicas de la FQ se encuentran las enfermedades crónicas sinopulmonares: tos crónica y producción de esputo, sibilancias y atrapamiento de aire, colonización persistente con patógenos. También alteraciones nutricionales gastrointestinales: íleo meconial, prolapso rectal, malabsorción /insuficiencia pancreática, esteatorrea, o síndromes de pérdida de sal, disminución aguda de sal, alcalosis metabólica crónica, deshidratación hipoclorémica (Moskowitz, y otros, 2008)

##### **1.4.3.1.1 Pruebas moleculares**

Las técnicas moleculares para el análisis del gen CFTR se clasifican en dos grupos:

***Dirigidos a mutaciones conocidas***

- Pruebas en muestras de ADN para definir la presencia o ausencia de mutaciones específicas.
- Métodos de exploración: análisis del gen CFTR para encontrar cualquier desviación de la secuencia estándar. Estos incluyen la búsqueda de grandes reordenamientos del gen CFTR desconocidos, incluyendo grandes deleciones, inserciones, duplicaciones (MLPA)

Los reordenamientos que pueden pasarse por alto utilizando ensayos de amplificación convencional, se ha encontrado que ocurren en hasta el 2% de los alelos en los pacientes con FQ.

***Dirigidos a mutaciones no detectadas:*** Pueden estar dentro de los intrones o regiones reguladoras, que no se analizan de forma rutinaria.

***Análisis de marcadores de microsatélites :*** Adicional al estudio directo del gen CFTR, se puede utilizar los microsatélites para polimorfismos, esto es recomendado para estudios familiares de la Fibrosis Quística (Dequeker, y otros, 2009)

En la **Tabla 16 (Anexos)** se presentan las técnicas moleculares de acuerdo a esta clasificación, siendo la secuenciación una técnica de primera línea o de confirmación después de una prueba de cribado, con aproximadamente 100% de sensibilidad.

#### **1.4.3.1.2 Estrategia de diagnóstico**

En la mayoría de casos, es recomendable seguir la siguiente estrategia:

1. Iontoforesis pilocarpina cuantitativa para determinar la concentración de cloruro en el sudor.

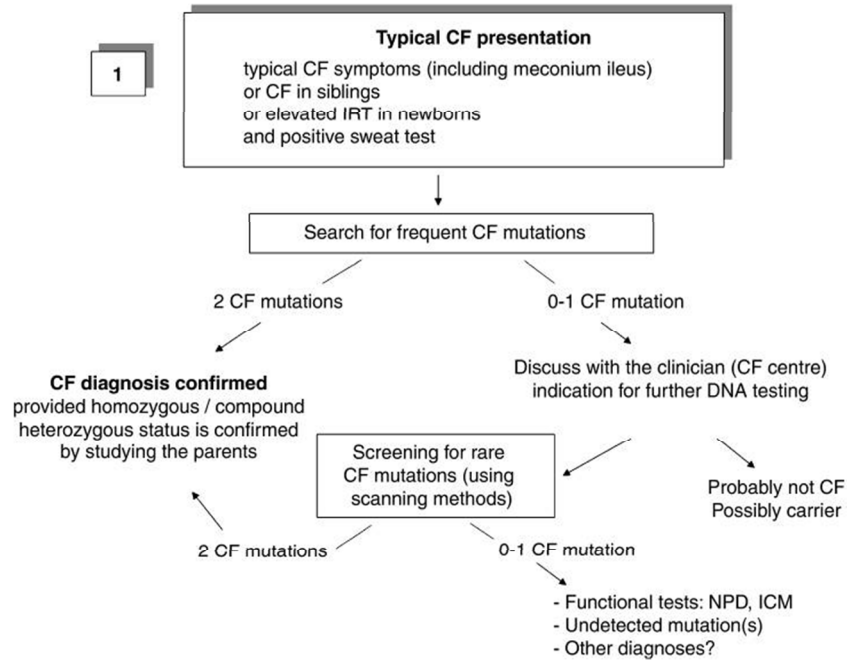
El test del cloruro en el sudor es un método bioquímico para confirmar el diagnóstico clínico de fibrosis quística, debido a que en esta enfermedad las alteraciones en el transporte iónico incluyen una conductancia reducida del cloro transepitelial y un incremento en la tasa basal de absorción de sodio. Valores de

Cloro en el sudor mayores a 60 mEq/L se considera un resultado positivo (el cual debe ser confirmado por segunda vez), un valor limítrofe se encuentra entre 40 y 60 mEq/L limítrofe y el resultado es negativo cuando el valor es menor de 40 mEq/L (Hernández & González, 2013).

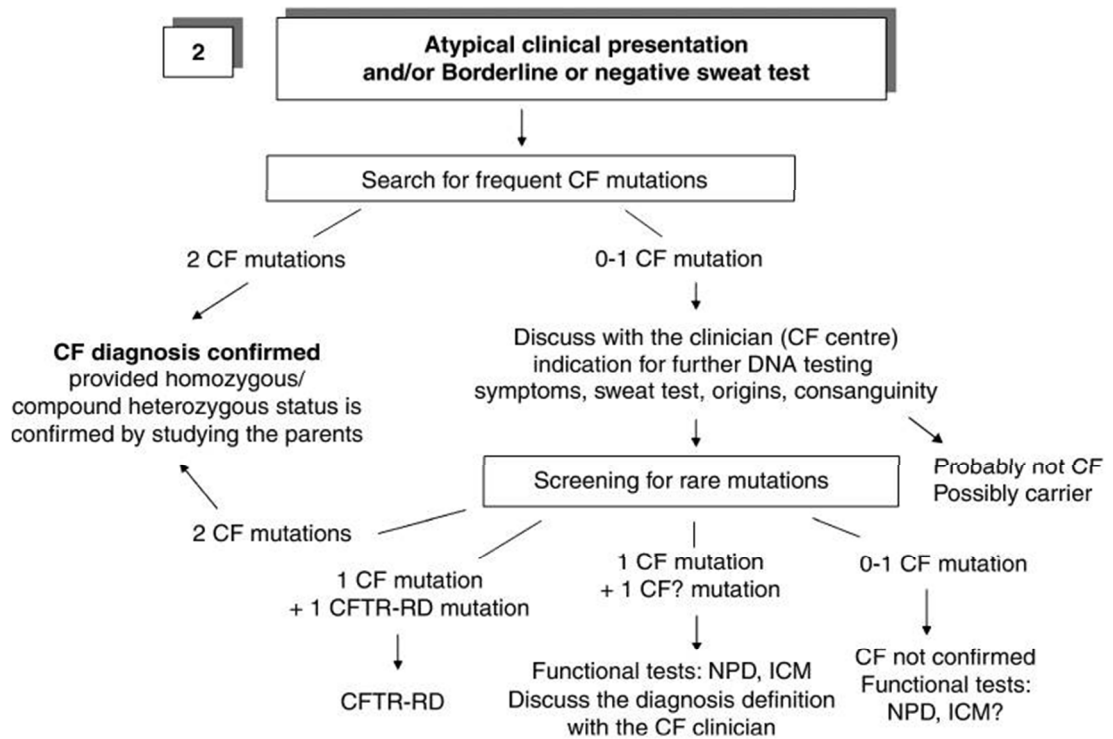
2. Pruebas moleculares genéticas del gen CFTR con objetivos:
  - a. Diagnóstico: si la prueba de cloruro en el sudor no se encuentra disponible, o no es informativa
  - b. Pronóstico y epidemiológico: para personas diagnosticadas con FQ en base a las pruebas de cloruro en el sudor
3. Mediciones del diferencial de potencial nasal transepitelial (NPD) para confirmar el diagnóstico de FQ en individuos sintomáticos con pruebas dudosas de cloruro en el sudor, o en los que se ha detectado sólo una o ninguna CFTR mutación causante de la enfermedad (Moskowitz, y otros, 2008)

Adicionalmente existen algoritmos para los diferentes casos (Dequeker, y otros, 2009):

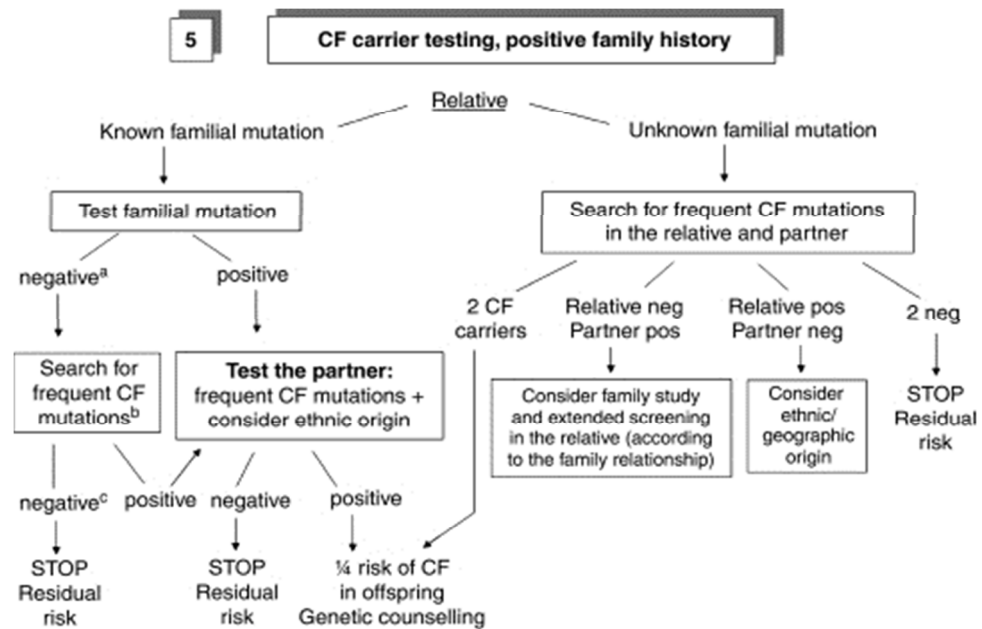
- Pruebas de diagnóstico en la presentación típica de FQ **Figura 5.**
- Pruebas de diagnóstico en la presentación clínica atípica y / o prueba limítrofe sudor **Figura 6.**
- Prueba de portador CF en individuos con historia familiar positiva **Figura 7.**



**Figura 5. Algoritmo de diagnóstico para pacientes con cuadro típico de FQ**  
 Fuente: Dequeker, y otros (2009)



**Figura 6. Algoritmo de diagnóstico para pacientes con cuadro atípico de FQ**  
 Fuente: Dequeker, y otros (2009)



**Figura 7. Algoritmo de diagnóstico para portadores de FQ**

Fuente: Dequeker, y otros (2009)

#### 1.4.4 Secuenciación

La secuenciación por el método de Sanger emplea la DNA polimerasa para generar copias de una cadena molde de DNA de doble cadena en cadenas simples, mediante la adición de nucleótidos a la nueva cadena. La elongación de la cadena se produce en el extremo 3' del cebador (Rogers, 2006).

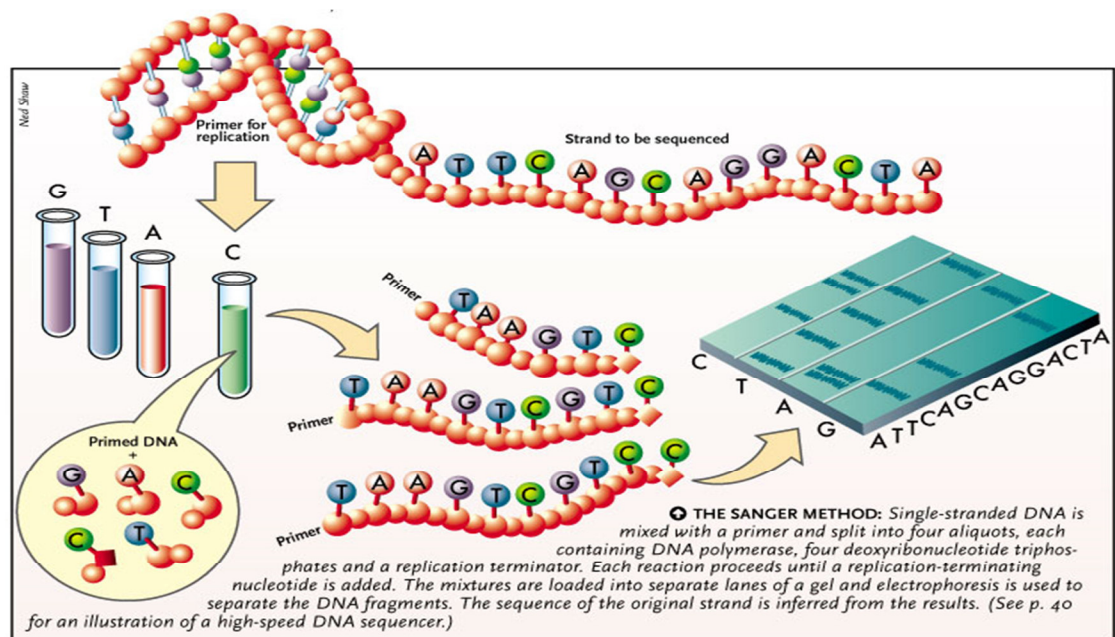
La polimerasa utiliza los cuatro desoxinucleósidos trifosfato (dNTP) y una pequeña cantidad de didesoxinucleósido trifosfato (ddNTP), análogos a los dNTPs. Los ddNTPs se diferencian de los dNTPs normales ya que en el carbono 2' y 3' de la desoxirribosa, se encuentra un -H en lugar de un -OH. (Dorado, 2004).

El DNA en estado monocatenario es mezclado con un primer o iniciador y se divide en cuatro alícuotas, cada una de estas contiene DNA polimerasa, cuatro desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs) y un terminador de la replicación (ddNTP).



Cada reacción procede hasta que se añade un nucleótido de terminación de replicación (Winnick, 2004), ya que estos no tienen el extremo 3'-OH, la DNA polimerasa ya no puede unirle el siguiente nucleótido y la reacción finaliza (Dorado, 2004).

Las alícuotas se cargan en carriles separados de un gel y se corre una electroforesis para separar los fragmentos en función de su peso molecular, y a partir de esto se infiere la secuencia (Winnick, 2004) **Figura 8.**



**Figura 8. Secuenciación de Sanger**

Fuente: Winnick(2004)

#### 1.4.4.1 Método de secuenciación por ciclos térmicos

Es una adaptación del método dideoxi de terminación de cadena (Método de Sanger), con una combinación de una reacción tipo PCR. Se sustituye la Sequenase por una ADN polimerasa termoestable, el procedimiento incluye ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión, similar a una PCR (Zabala, 2005).

Esta técnica ofrece ventajas con respecto al método convencional de un solo ciclo, debido a que la reacción puede ser llevada en temperaturas más altas para evitar las

reacciones inespecíficas de alineación de primers y requiere menos ADN molde debido a que el producto es linealmente amplificado en cada uno de los sitios (Zabala, 2005).

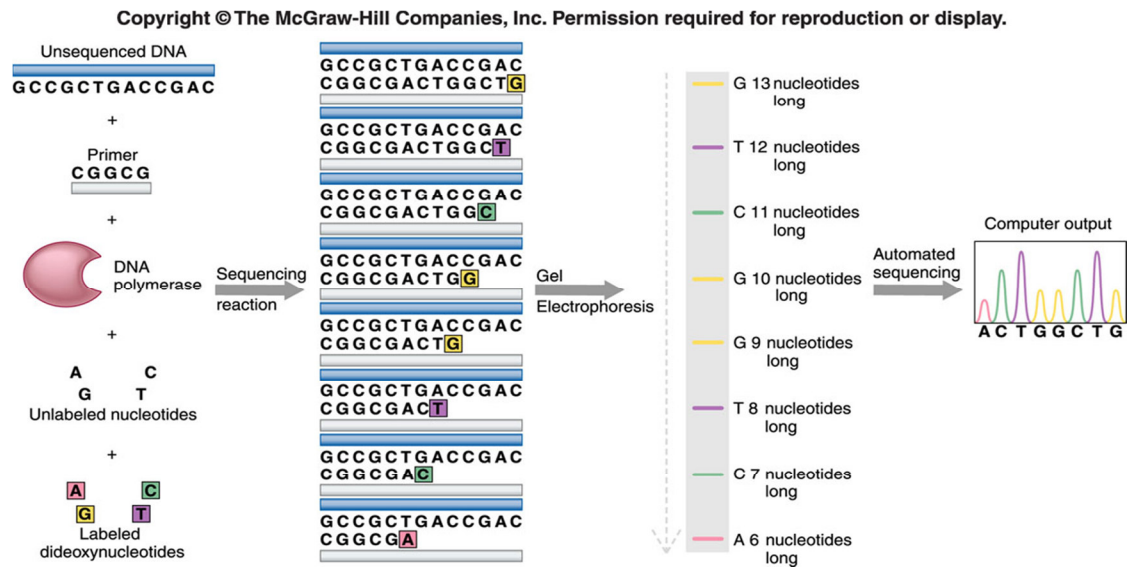
#### **1.4.4.2 *Secuenciación automatizada***

La secuenciación automatizada utiliza el fundamento del método de Sanger, pero el análisis de los fragmentos obtenidos en lugar de realizarse a través de geles de poliacrilamida, ha sido sustituido por métodos automatizados (Life technologies, 2015).

Los productos de las 4 reacciones de secuenciación ya no usa un mismo marcaje, sino cada didesoxinucleótidos tiene un marcador fluorescente. Al excitar con un láser, los 4 tipos diferentes de productos se detectan y la intensidad de la fluorescencia se traduce en picos (Life technologies, 2015) **Figura 9.**

#### **1.4.4.3 *Electroforesis capilar***

Durante la electroforesis capilar, los productos de la secuenciación cíclica se inyectan electrocinéticamente en capilares llenos de polímero, se aplica alto voltaje para que los fragmentos de ADN cargadas negativamente se muevan a través del polímero de los capilares, hacia el electrodo positivos. En su trayecto, los fragmentos de ADN marcados con fluorescencia, separados por tamaño, se mueven a través de un rayo láser que excitan la fluorescencia (Life technologies, 2015) **Figura 9.**



**Figura 9. Secuenciación automatizada**  
Fuente: Life technologies (2015)

### 1.5 Sistema de hipótesis

- La prevalencia de las mutaciones más comunes reportadas en estudios previos para la población ecuatoriana y en América Latina, es similar a la encontrada en este estudio.
- Existen mutaciones no reportadas en pacientes ecuatorianos con fibrosis quística.

## **CAPÍTULO 2**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **2.1 Participantes**

Laboratorios Especializados NETLAB brindó el financiamiento de este proyecto.

Esta investigación se llevó a cabo por parte de la Srta. Sofia Carolina Ortiz Santander, egresada de la carrera de Ingeniería en Biotecnología, bajo la supervisión de Santiago Aguirre, M.Sc Jefe del Área de Biología Molecular de NETLAB.

Como directora del proyecto, la Dra. Patricia Jiménez, M.Sc Docente-investigadora de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

La Fundación Ecuatoriana de Fibrosis Quística facilitó el contacto con los pacientes con fibrosis quística para la toma de muestras de sangre requeridas para la identificación de mutaciones del gen CFTR en este proyecto.

#### **2.2 Zona de estudio**

El trabajo de investigación se realizó en el Área de Biología Molecular de NETLAB Laboratorios Especializados ubicado en Calle “A” (Oe7A) N31-145 y Av. Mariana de Jesús, Quito- Ecuador

#### **2.3 Período de Investigación**

Este proyecto inició en Marzo y concluyó en Septiembre del 2015.

## 2.4 Procedimientos

### 2.4.1 *Muestras clínicas*

Se estableció contacto con la Fundación Ecuatoriana de Fibrosis Quística, la cual registra pacientes con esta enfermedad en Ecuador.

El 18 de Abril de 2015 se realizó la jornada de toma de muestras de sangre en 48 pacientes con diagnóstico o sospecha clínica de fibrosis quística pertenecientes a la fundación. Previo a esto, se les entregó el consentimiento informado para su lectura y firma por parte del paciente, o de sus padres en caso de menores de edad.

De cada paciente se extrajo de 3 a 5ml de sangre venosa en tubos vacutainer con EDTA, en el caso de muestras pediátricas, la toma de sangre se realizó por goteo. Las muestras fueron transportadas el mismo día a Laboratorios Especializados NETLAB para su refrigeración.

### 2.4.2 *Extracción de ADN*

La extracción de ADN para cada una de las muestras se realizó en el sistema automatizado Qiacube de Qiagen.

El ADN se cuantificó en el equipo NanoQuant Infinite 200, se colocaron 2ul de ADN de cada muestra para su lectura con el fin de asegurar una cantidad de ADN  $>5$  ng/ul y un  $\text{Radio}_{260/280} >1.7$  y 2 (Velázquez, Martínez, & Romero, 2007)

### 2.4.3 *Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa de los exones del Gen CFTR.*

Se amplificaron los 27 exones del gen CFTR a partir del ADN extraído de cada paciente utilizando los primers diseñados para el estudio Scanning the Cystic

Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene Using High-Resolution DNA Melting Analysis (Montgomery, Wittwer, Kent, & Zhou, 2007), y el kit Taq DNA Polymerase de Invitrogen siguiendo las instrucciones sugeridas por el fabricante.

El protocolo de amplificación para cada uno de los exones se realizó en el termociclador Gene Amp PCR System 9700 de Applied Biosystems, y se describe en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.**  
**Protocolo de PCR**

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	5 min	1
95°C	30s	40
50°C	30s	
72°C	30s	
72°C	7 min	1
4°C	∞	

Fuente: NETLAB (2014)

#### **2.4.4 Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR**

Para verificar la amplificación de los exones del gen CFTR se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% con 5ul Bromuro de etidio (5mg/ul) , Blue Juice como buffer de carga y se agregó el producto amplificado, en una relación 1:10.

Como marcador de peso molecular se utilizó el TrackIt 100 bp DNA Ladder, para determinar los tamaños de los fragmentos para cada uno de los exones, que deben concordar con los de Montgomery *et. al*,2007 **Tabla 17**.

#### **Anexos**

### 2.4.5 Purificación de los productos de PCR

Una vez verificado la presencia del amplicón con su adecuado tamaño, se purificó con el método de precipitación etanol/acetato de sodio de (Francis, 2005) modificado, con el fin de eliminar dNTPS y primers no incorporados a las cadenas amplificadas **Tabla 4.**

**Tabla 4.**  
**Protocolos de purificación**

Protocolo Original (Francis, 2005)	Protocolo Modificado	Explicación
Para 25 ul de reacción: <b>1.</b> Añadir 2.5 µl de acetato de sodio 3 M. <b>2.</b> Añadir 62.5 µl de etanol al 100% (almacenado a -20 C) <b>3.</b> Sellar la placa y mezclar invirtiendo 4 veces <b>4.</b> Incubar a -20 C por 20 min.	Para 25 ul de reacción: <b>1.</b> Añadir 2.5 µl de acetato de sodio 3 M. <b>2.</b> Añadir 62.5 µl de etanol al 100% (almacenado a -20 C) <b>3.</b> Sellar la placa y mezclar invirtiendo 4 veces <b>4.</b> Incubar a -20 C por 20 min.	
<b>5.</b> Centrifugar la placa a 2.500g y 4 C por 30 min	<b>5.</b> Centrifugar la placa a 2.500g por 30 min	No se contaba con centrifuga de placas con control de temperatura
<b>6.</b> Invertir la placa para remover ETOH; y centrifugar a 185g por un minuto	<b>6.</b> Invertir la placa para remover ETOH; y centrifugar a 90g por un minuto	En los primeros ensayos al centrifugar la placa <b>CONTINUA</b> →

		invertida a 185g se obtenía una concentración muy baja por lo que probablemente el ADN se estaba perdiendo a 185g's por lo que se redujeron a la mitad aproximadamente.
7. Añadir 87.5 µl de etanol al 70% etanol (almacenado a -20 C) 8. Centrifugar la placa a 2.500 x g y 4 C por 15 min.	7. Añadir 87.5 µl de etanol al 70% (almacenado a -20 C) 8. Centrifugar la placa a 2.500 x g y 4 C por 15 min.	
9. Invertir la placa para remover ETOH; y centrifugar a 185g por un minuto	9. Invertir la placa para remover ETOH; y centrifugar a 90g por un minuto	En los primeros ensayos al centrifugar la placa invertida a 185g se obtenía una concentración muy baja por lo que probablemente el ADN se estaba perdiendo a 185g's por lo que se redujeron a la mitad <b>CONTINUA</b> →



		aproximadamente.
<b>10.</b> Secar el pellet por unos minutos a temperatura ambiente y resuspender las muestras en 20µl de agua grado biología molecular.	<b>10.</b> Secar el pellet por 30 min a temperatura ambiente y resuspender las muestras en 20µl de agua grado biología molecular.	Se probaron ensayos a 7 min, 14min y 30 min, este último permitió obtener una mejor cantidad y calidad de ADN.
	<b>Acetato de sodio: 3M, pH= 5.2</b>	pH de soluciones para técnicas de Biología Molecular sugerido por (Zabala, 2005)

Los protocolos se modificaron de acuerdo a los ensayos (**Tabla 5**) donde al final se medía la concentración y radio de ADN purificado, para la PCR secuenciación con el Big Dye Xterminator kit el fabricante sugiere que la concentración del templado debe ser de al menos 3 ng/ul y el radio debe estar entre 1.7 y 1.9 (Applied Biosystems, 2002).

**Tabla 5.**  
**Ensayos de purificación de PCR.**

Ensayo	Resultados		
<p>4 muestras de productos de PCR del exón 10 y 11 con el protocolo original</p> <p>4 muestras de productos de PCR del exón 10 y 11 con diferentes tiempos de secado, y retirando el etanol con pipeta en el paso 6 y 9.</p>		Concentración (ng/ul)	Radio 260/280
	1	0.2	0
	2	0	0
	3	0.1	2.2
	4	0	1.33
	7 min T ambiente		
		Concentración (ng/ul)	Radio 260/280
	1	35,3	1,53
	2	50	1,63
	3	117	1,52
	4	117,4	1,52
	14 min T ambiente		
		Concentración (ng/ul)	Radio 260/280
	1	77,8	1,58
	2	97,2	1,61
3	129,7	1,54	
4	142,3	1,55	
<b>CONTINUA →</b>			

4 muestras exón 10 y 11, Modificación en el paso 6, 9, 10	30 min a T ambiente																
		<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Concentración (ng/ul)</th> <th>Radio 260/280</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>98,6</td> <td>1,57</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>118,4</td> <td>1,58</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>204,6</td> <td>1,57</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>171,8</td> <td>1,58</td> </tr> </tbody> </table>		Concentración (ng/ul)	Radio 260/280	1	98,6	1,57	2	118,4	1,58	3	204,6	1,57	4	171,8	1,58
		Concentración (ng/ul)	Radio 260/280														
	1	98,6	1,57														
	2	118,4	1,58														
	3	204,6	1,57														
	4	171,8	1,58														
		Exón 10:															
		<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Concentración (ng/ul)</th> <th>Radio 260/280</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>24.9</td> <td>1.68</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>4.3</td> <td>2.39</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>2.9</td> <td>2.42</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>1.5</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>		Concentración (ng/ul)	Radio 260/280	1	24.9	1.68	2	4.3	2.39	3	2.9	2.42	4	1.5	5
		Concentración (ng/ul)	Radio 260/280														
	1	24.9	1.68														
	2	4.3	2.39														
3	2.9	2.42															
4	1.5	5															
	Exón 11:																
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Concentración (ng/ul)</th> <th>Radio 260/280</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>6</td> <td>1.68</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>11.5</td> <td>2.39</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>5</td> <td>2.42</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>22</td> <td>1.69</td> </tr> </tbody> </table>		Concentración (ng/ul)	Radio 260/280	1	6	1.68	2	11.5	2.39	3	5	2.42	4	22	1.69	
	Concentración (ng/ul)	Radio 260/280															
1	6	1.68															
2	11.5	2.39															
3	5	2.42															
4	22	1.69															

#### 2.4.6 *Reacción de secuenciación*

Se utilizó el Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit, que se fundamenta en la secuenciación de Sanger con la modificación de ser de tipo ciclo térmico, siguiendo las instrucciones del fabricante.

En el termociclador Gene Amp PCR System 9700 de Applied Biosystems se llevó a cabo la reacción de secuenciación con el protocolo de 96°C-1 min, (96°C-10s, 50°C - 5s, 60°C- 4 min) por 25 ciclos y 4°C por 5 min.

#### 2.4.7 *Purificación de productos de secuenciación*

Se purificaron los productos de la secuenciación con el protocolo recomendado por el Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, 2002), el cual utiliza la precipitación con etanol y EDTA para eliminar los nucleótidos marcados que no han sido incorporados en las cadenas de ADN, con modificaciones **Tabla 6** de acuerdo a los ensayos en la **Tabla 12 (Anexos)**.

**Tabla 6.**  
**Protocolos de purificación de productos de secuenciación**

Protocolo Original Big Dye Xterminator Manual	Protocolo Modificado	Explicación
Para 10 ul de reacción: 1. Añadir 2.5ul de EDTA 125mM Asegurarse que el EDTA alcance el fondo de las muestras. 2. Añadir 30ul de etanol al 100%	Para 10 ul de reacción: 1. Añadir 2.5ul de EDTA 125mM Asegurarse que el EDTA alcance el fondo de las muestras. 2. Añadir 30ul de etanol al 100%	<b>CONTINUA →</b>

<p>3. Sellar con aluminio, mezclar invirtiendo 4 veces</p> <p>4. Incubar a temperatura ambiente 15 min</p> <p>5. Centrifugar a 2500g por 30min</p>	<p>3. Sellar con aluminio, mezclar invirtiendo 4 veces</p> <p>4. Incubar a temperatura ambiente 15 min</p> <p>5. Centrifugar a 2500g por 30min</p> <p>6. Añadir 50ul de etanol al 70%</p> <p>7. Centrifugar a 1650g por 15 min</p>	
<p>6. Invertir la placa para eliminar el etanol y centrifugar a 185 g por un minuto</p>	<p>8. Invertir la placa para eliminar el etanol y centrifugar a 40g por un minuto</p>	<p>Se disminuyeron las gravedades con el fin de evitar la pérdida de los productos de secuenciación</p>
<p>7. Añadir 30ul de etanol al 70%</p> <p>8. Centrifugar a 1650g por 15 min</p> <p>9. Invertir la placa para eliminar el etanol y centrifugar a 185 g por un minuto</p>		
<p>10. Secar el pellet en oscuridad por algunos minutos</p>	<p>9. Secar el pellet por 30 min</p>	<p>Se usó el tiempo de secado del protocolo acetato de <b><i>CONTINUA</i></b> →</p>

		sodio/etanol para productos de PCR
11. Resuspender las muestras en buffer de inyección: Hi Di formamide	10. Resuspender las muestras en 10ul de buffer de inyección: Hi Di formamide	
	<b>EDTA: 125mM, pH=8</b>	pH de soluciones para técnicas de Biología Molecular sugerido por (Zabala, 2005)

Dado que se obtuvo mayor cantidad de secuencias en la combinación de los dos protocolos de purificación Acetato/etanol y EDTA/etanol modificados, se usó estos para la purificación de productos de PCR y de secuenciación respectivamente, para la secuenciación de los 27 exones del gen CFTR.

#### **2.4.8 Electroforesis capilar**

La reacción de electroforesis capilar de los productos de secuenciación purificados, se realizó en el equipo de 3500 Genetic Analyser de Applied BioSystems del Área de Biología Molecular en NETLAB Laboratorios Especializados.

#### **2.4.9 Análisis de la secuencia**

Para el análisis de la secuencia de los exones del gen CFTR se utilizó el Software SeqScape3, donde se subió la secuencia de cada exón del gen CFTR de la base de datos NCBI **Tabla 18 (Anexos)** y la secuencia de cada uno de los exones

de los pacientes obtenida del 3500 Sequence Analyser con el fin de compararlas e ir en busca de variaciones, posteriormente se buscó en bibliografía el reporte de las mutaciones encontradas.

#### **2.4.10 Verificación y repetitividad del método**

Considerando el tiempo y costos que involucró la secuenciación de los 27 exones del gen CFTR para 48 pacientes, se corrió un control negativo por cada uno de los 27 exones para los 48 pacientes.

Como fue explicado anteriormente, en nuestro país no se ha estudiado de manera muy detallada el gen de la fibrosis quística por lo tanto no se contó con controles positivos para todas las mutaciones que pudieron ser encontradas en este estudio.

## **CAPÍTULO 3**

### **RESULTADOS**

#### **3.1 Muestras clínicas**

En la jornada de toma de muestras de sangre de los 48 pacientes se registraron datos de ciudad, edad, género, test del sudor (Valores en Anexos

**Tabla 19)** y diagnóstico molecular **Tabla 13 (Anexos).**

Los pacientes nombrados como 8,9, 15, 22, 24, 25, 32, 38, 42, 46 y 48 se realizaron previo a esta investigación el diagnóstico molecular de fibrosis quística en el exterior que consiste en la detección de mutaciones en el gen CFTR. Estos pacientes fueron tomados como controles de las mutaciones correspondientes, en este estudio.

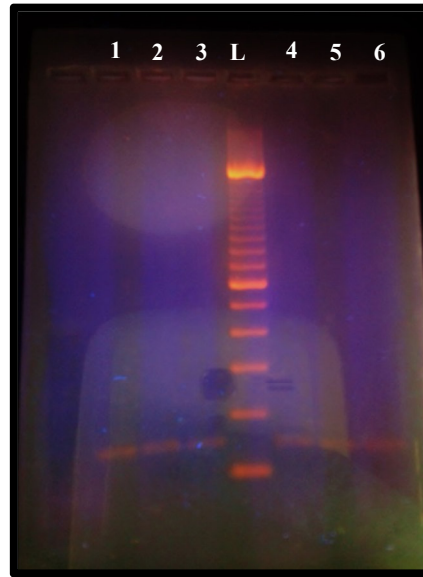
#### **3.2 Extracción y cuantificación de ADN de las muestras de sangre periférica**

Todas las muestras de ADN presentaron concentraciones  $>5$  ng/ul y ratios 260/280  $>1.7$  y 2 después de su cuantificación en el equipo NanoQuant Infinite 200 **Tabla 14 (Anexos)**

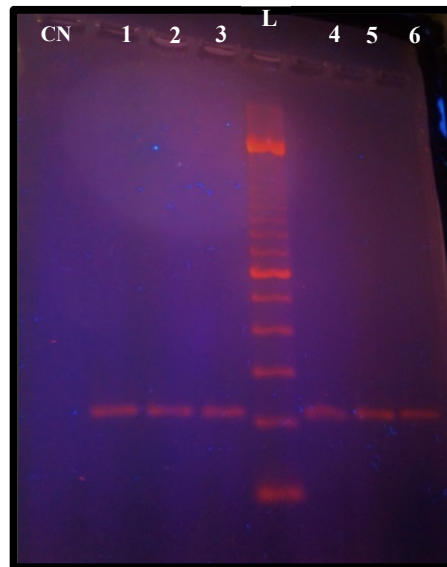
#### **3.3 Amplificación de exones por Reacción en Cadena de la Polimerasa y electroforesis en gel de agarosa.**

Todos los exones amplificados a partir del ADN genómico de los pacientes, presentaron tamaños de fragmento coincidentes con los propuestos por (Montgomery, Wittwer, Kent, & Zhou, 2007) En la **Figura 10, Figura 11, Figura 12, y Figura 13** se muestran algunas de las fotografías de los exones amplificados.

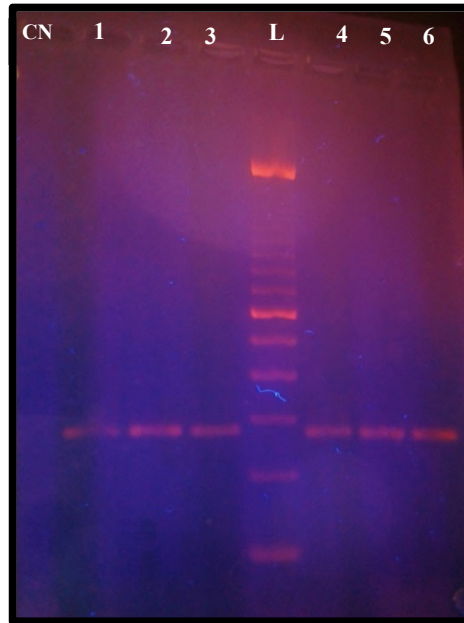




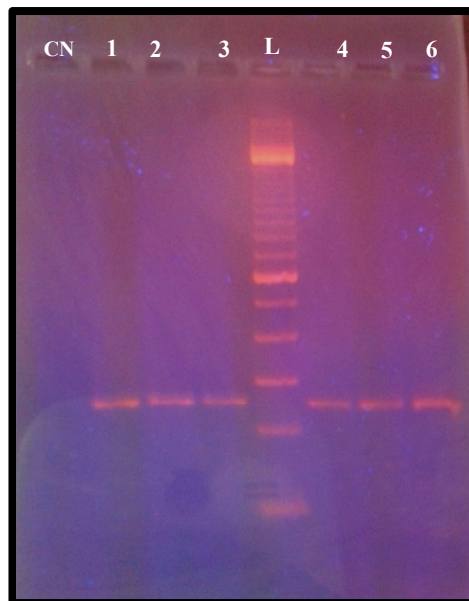
**Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa Exón 1(146pb)**  
CN: Control negativo; L: Marcador de peso molecular 100pb; 1, 2, 3, 4, 5 ,6:  
Amplificación por PCR para el exón 1 a partir de ADN genómico de pacientes.



**Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa Exón 14b (212pb).**  
CN: Control negativo; L: Marcador de peso molecular 100pb; 1, 2, 3, 4, 5 ,6:  
Amplificación por PCR para el exón 14b a partir de ADN genómico de pacientes.



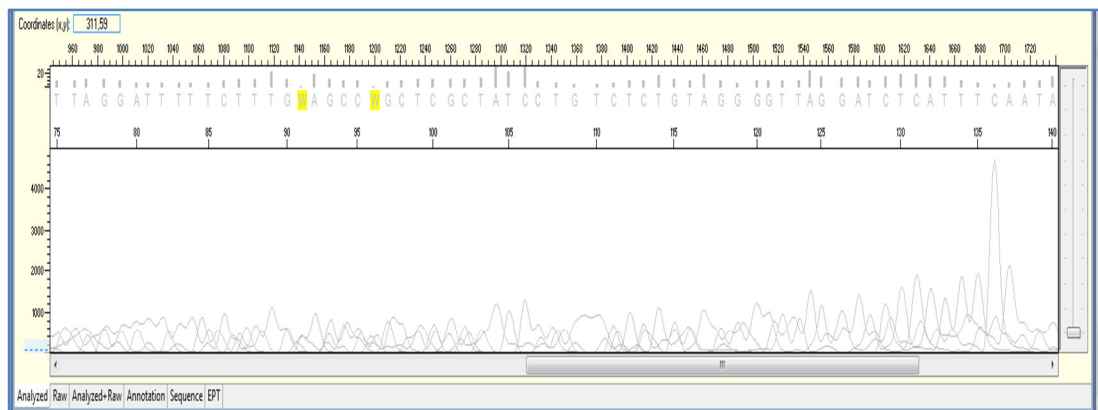
**Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa Exón 10 (277pb).**  
CN: Control negativo; L: Marcador de peso molecular 100pb; 1, 2, 3, 4, 5, 6:  
Amplificación por PCR para el exón 10 a partir de ADN genómico de pacientes



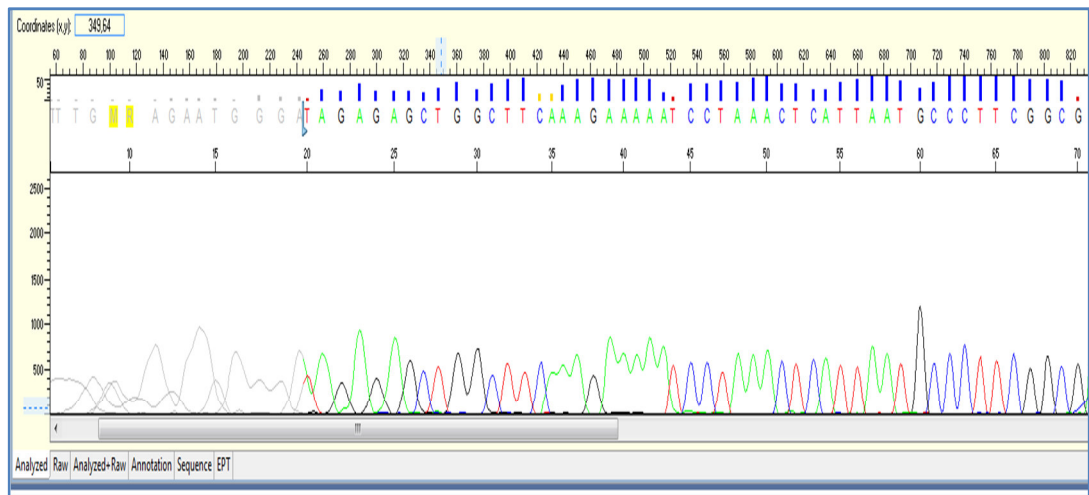
**Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa Exón 17a (250pb)**  
CN: Control negativo; L: Marcador de peso molecular 100pb; 1, 2, 3, 4, 5, 6:  
Amplificación por PCR para el exón 17a a partir de ADN genómico de pacientes.

### 3.4 Reacción de secuenciación y electroforesis capilar

Los productos de secuenciación de la mayoría de exones sometidos a electroforesis capilar arrojaron secuencias completas que podían ser analizadas, sin embargo los exones **3**, **5**, **11,17 a**, **17b** tuvieron que ser repetidos, dado su baja calidad de secuencias como se observa el ejemplo del exón 3 **Figura 14**. Al repetir estas muestras desde la amplificación del exón por PCR hasta la electroforesis capilar, se obtuvo mejor calidad en las secuencias **Figura 15**.



**Figura 14. Electroferograma de la muestra 7. Exón 3 (Primera corrida de secuenciación)**



**Figura 15. Electroferograma de la muestra 7. Exón 3 (Segunda corrida de secuenciación)**

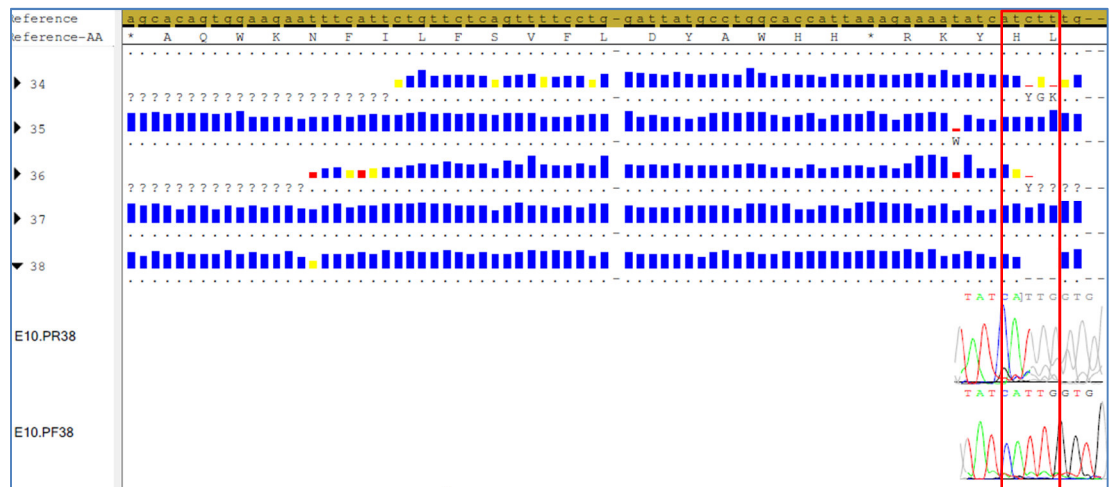
### 3.5 Análisis de secuencias

El análisis de las secuencias realizado en el software SeqScape 3, permitió encontrar 70 variaciones de secuencia diferentes en los 27 exones del gen CFTR.

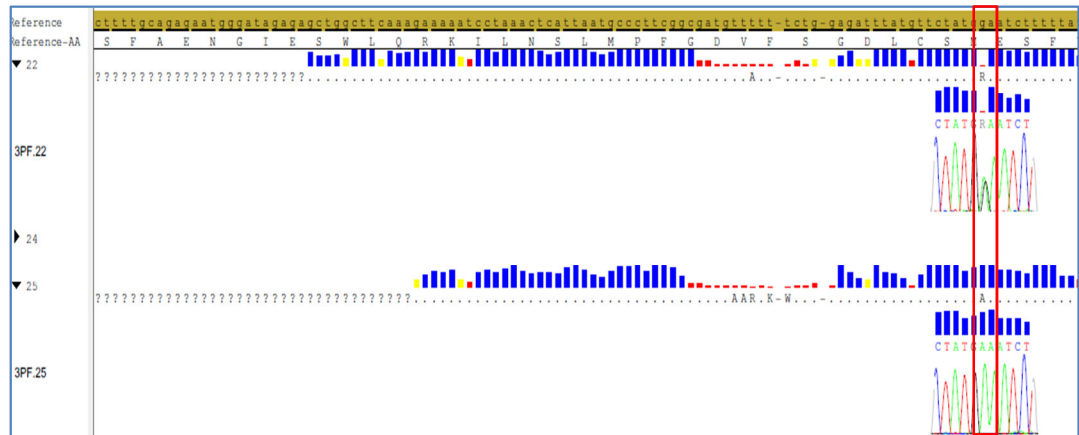
Se realizó una búsqueda de estas variaciones en la sección Graphics de la secuencia completa del gen CFTR ubicada en la base de datos NCBI: NG\_016465.3: *Homo sapiens cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (ATP-binding cassette sub-family C, member 7) (CFTR), RefSeqGene on chromosome 7*, la cual muestra el reporte de las mutaciones del gen CFTR respaldado por estudios de este gen en varias poblaciones y el significado clínico asignado para cada mutación.

La **Tabla 15 (Anexos)** resume las variaciones de secuencia obtenidas para cada exón y sus respectivos reportes.

De las 70 variaciones identificadas, 5 están catalogadas como causantes de la enfermedad o patogénicas: p.F508del (**Figura 16**), p.G85E (**Figura 17**), W1098X, R1162X, N1303K.



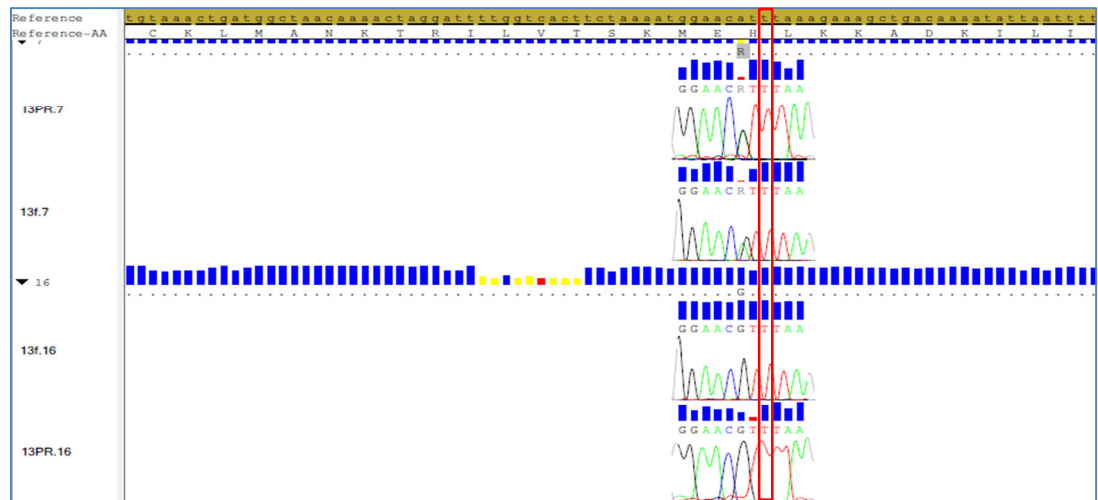
**Figura 16. Muestra 38(Homocigoto), Muestra 34 (Heterocigoto) para la mutación p.F508del. Software SeqScape 3, en amarillo secuencia de referencia del exón 10 p.F508del: Delección del triplete TCT en la posición 1654:1656 en el exón 10 que provoca la delección de la Fenilalanina en el aminoácido 508 de la proteína CFTR.**



**Figura 17. Muestra 25 (Homocigoto), Muestra 22 (Heterocigoto) para la mutación p.G85E. Software SeqScape 3, en amarillo secuencia de referencia del exón 3**

p.G85E: Cambio de una Guanina por una Adenina en la posición 386 del exón 3 que provoca el cambio de una glicina por ácido glutámico en el aminoácido 85 de la proteína CFTR.

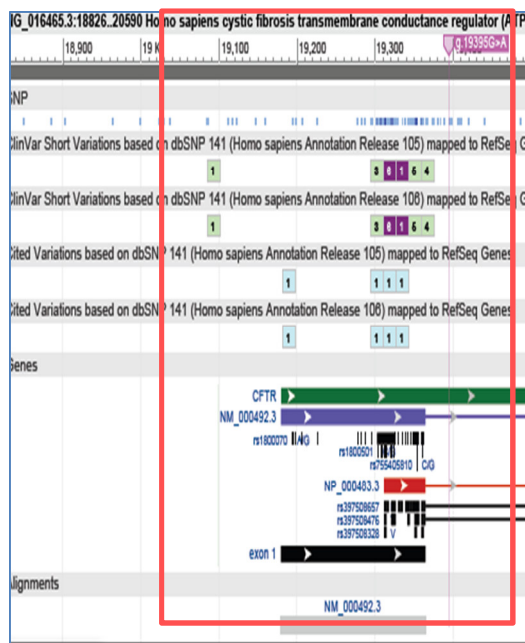
La mutación **p.H609R** (Figura 18) se identificó en 10 pacientes, esta ha sido reportada en un solo estudio en la población ecuatoriana por Moya *et.al* (2009).



**Figura 18. Muestra 16 (Homocigoto), Muestra 7 (Heterocigoto) para la mutación p.H609R. Software SeqScape 3, en amarillo secuencia de referencia del exón 13.**

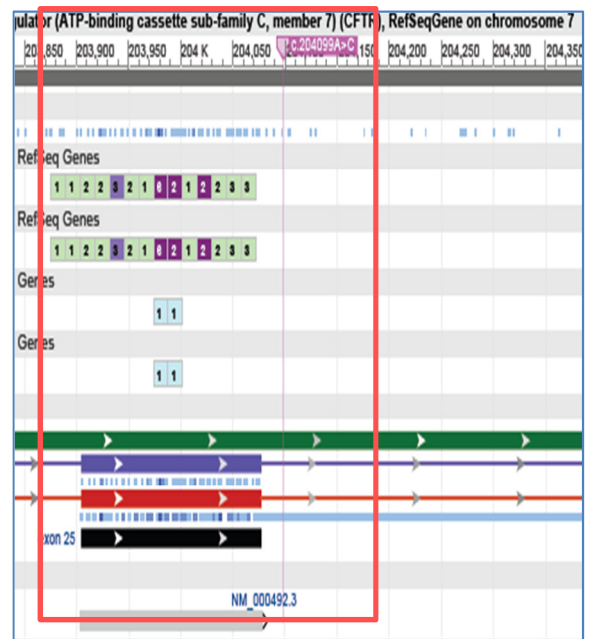
p. H609R: cambio de una Adenina por una Guanina en la posición 1958 del exón 13 que provoca el cambio de histidina por arginina en el aminoácido 609 de la proteína CFTR.

Se encontró también variaciones sin significado clínico asignado: NG\_016465.3:g.19395G>A (exón 1), p.Lys1177Arg (exón 7), otras que representan alelos benignos NG\_016465.3:g.19304G>C (exón1), NG\_016465.3:g.75901C>T (exón 6b) , y otras que se encuentran fuera de la región del exón: **NG\_016465.3:g.19395G>A (exón 1) Figura 19.**, y **c.204099A>C (exón 22) Figura 20**, estas dos últimas junto a la **c.206359C>A (exón 24)** se encontraron en un 14.5%, 48% y 14.5% de pacientes, respectivamente, y solo en estado **homocigoto**.



**Figura 19. Variante NG\_016465.3:g.19395G>A exón 1**

Fuente: Sección Graphics del gen CFTR en la NCBI



**Figura 20. Variante c.204099A>C exón 22.**

Fuente: Sección Graphics del gen CFTR en la NCBI

Además se identificaron los polimorfismos p.M470V, p.T854T, p.T966T, p.P1290P, p.Q1463Q, p.Y1424Y.

Las mutaciones reportadas en el diagnóstico molecular previo de los pacientes en el exterior, también fueron encontradas por secuenciación en este estudio.

### 3.6 Análisis estadístico de resultados

#### 3.6.1 Población

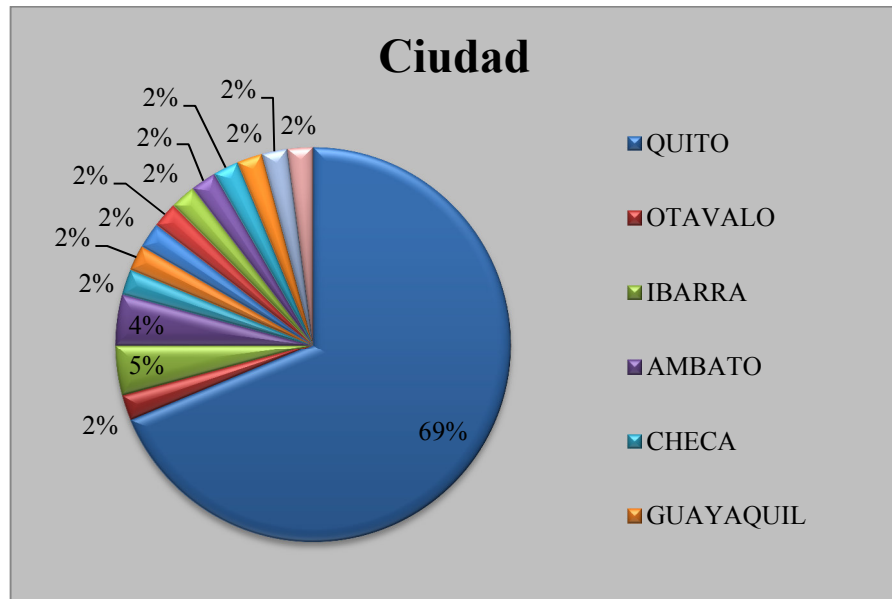
Los pacientes que acuden a la Fundación Ecuatoriana de Fibrosis Quística ingresan con un cuadro clínico sospechoso o confirmado de la enfermedad y se adhieren a esta fundación en busca del apoyo para el tratamiento de esta enfermedad otorgado por el Ministerio de Salud Pública.

Gran parte de los pacientes analizados en este estudio son de Quito probablemente porque es más accesible para ellos acudir a la Fundación que está ubicada en esta ciudad, y participar en este tipo de estudios **Gráfico 1**.

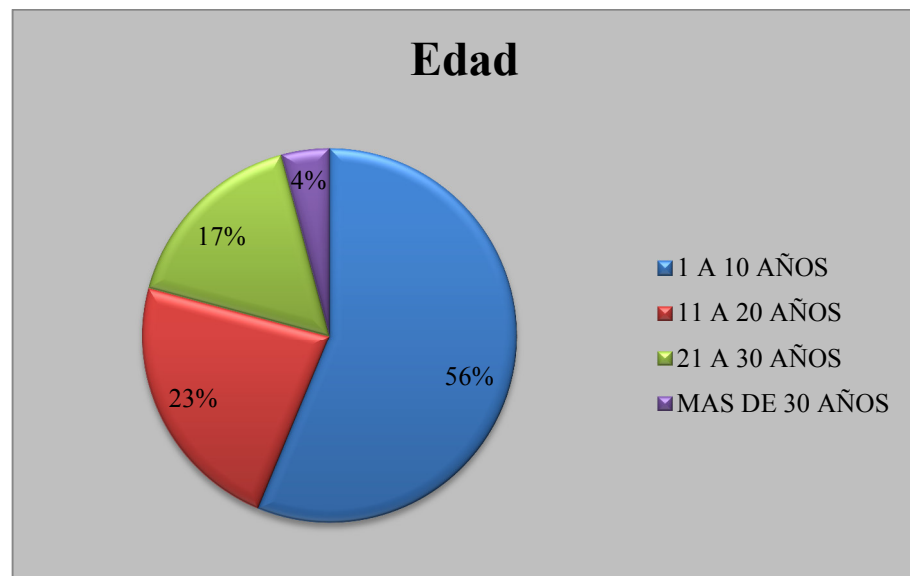
La mayoría de pacientes son niños entre 1 y 10 años, seguido de adolescentes entre 11 y 20 años **Gráfico 2**. Esto puede deberse a que los signos clínicos de la fibrosis quística aparecen en las primeras etapas de vida (Escobar & Sojo, 2002).

Los datos obtenidos del Test del sudor en este estudio colocan al 23% de los pacientes con doble positivo, 58% con un resultado positivo para el test del sudor no confirmado por segunda vez, 15% sin registros, y el 4% con un resultado positivo y otro limítrofe **Gráfico 4**.

En relación al género de los pacientes existe una distribución equitativa de la enfermedad **Gráfico 3**.

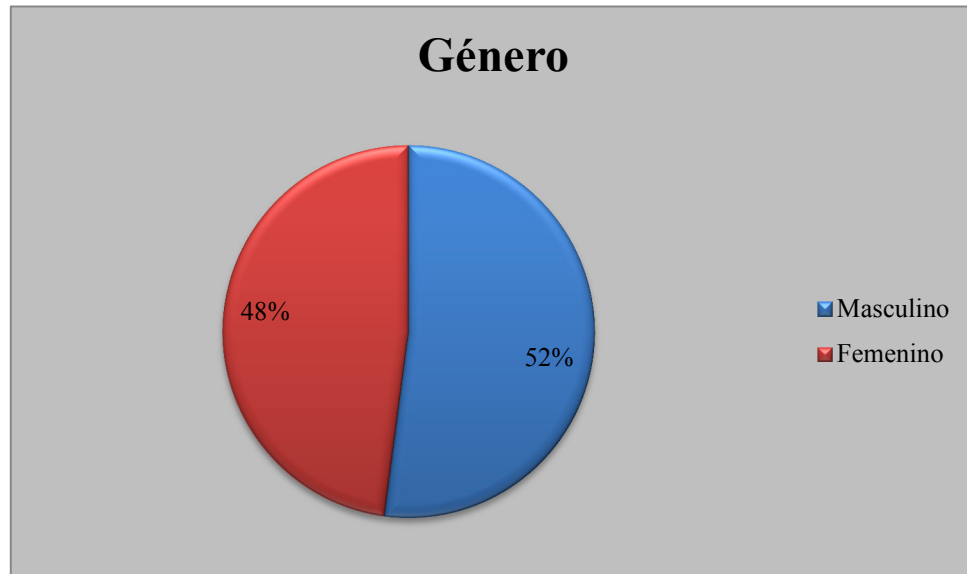


**Gráfico 1. Origen de las muestras clínicas**

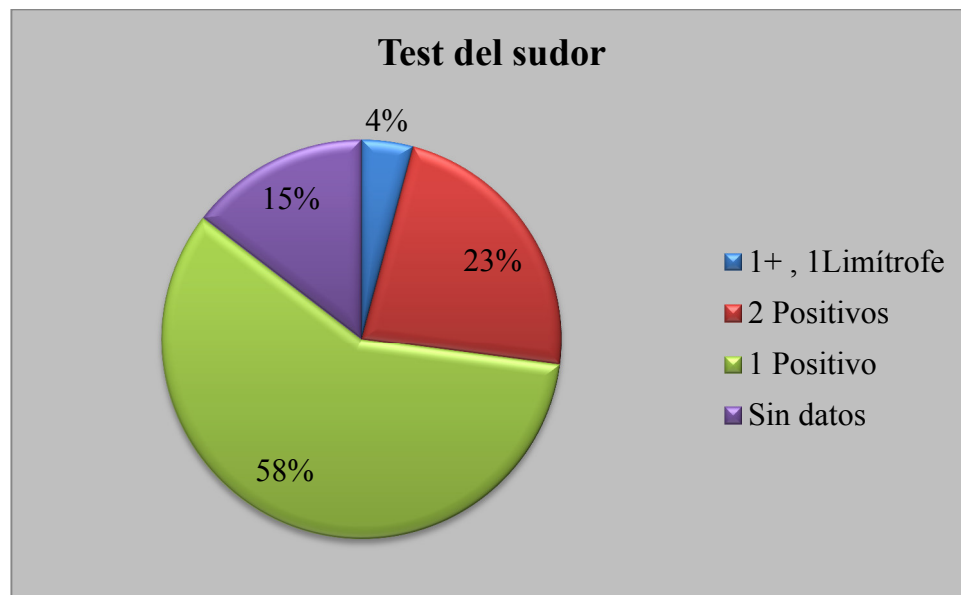


**Gráfico 2. Distribución de las muestras clínicas por grupos etarios**





**Gráfico 3. Distribución de las muestras clínicas por género**



**Gráfico 4. Distribución de pacientes por resultados del test del sudor**

### 3.6.2 *Frecuencias alélicas de las mutaciones del gen CFTR*

Estudios previos sobre la prevalencia de mutaciones del gen CFTR en pacientes con fibrosis quística en diferentes poblaciones han utilizado frecuencias alélicas para la estadística de sus resultados:

- Analysis of CFTR gene mutations and Cystic Fibrosis incidence in the Ecuadorian population (Valle, Burgos, Valle, Egas, & Ruiz, 2007)
- Secuenciación del gen CFTR en un grupo de pacientes chilenos con fibrosis quística (Lay, Vásquez, Puga, Manque, & Repetto, 2014)
- Frequency of 8 CFTR gene mutations in cystic fibrosis patients in Minas Gerais, Brazil, diagnosed by neonatal screening (Perone, Medeiros, Castillo, Aguiar, & Januário, 2010)

La frecuencia génica o frecuencia alélica consiste en la proporción de cada alelo en un locus dado en una población específica. La frecuencia alélica absoluta será cuantas veces aparezca el alelo en el estudio, y la frecuencia alélica relativa el cociente entre la frecuencia absoluta de una mutación determinada y el número total de alelos  $n$ .

$$n = \text{número de individuos} * 2 \text{ (alelos o cromosomas)}$$

$$\text{Frecuencia alélica relativa} = \frac{\text{Frecuencia alélica absoluta}}{n}$$

### 3.6.3 *Selección de pacientes para la determinación de frecuencias alélicas*

El diagnóstico de la fibrosis quística se establece cuando los individuos presentan una o más características fenotípicas propias de la enfermedad, además de la evidencia de la anomalía en la función del gen CFTR por la presencia de variantes alélicas patogénicas del gen CFTR, dos valores de cloruro en el sudor anormales ( $> 60$  mEq / L), medidas del diferencial transepitelial nasal (NPD), o niveles elevados de la IRT (Moskowitz, y otros, 2008)

Con respecto a la población de este estudio, los 48 pacientes analizados pertenecen a la Fundación Ecuatoriana de Fibrosis Quística debido a que presentan características fenotípicas de la enfermedad y la mayoría tienen al menos un valor anormal del test de cloruro en el sudor. Con la secuenciación de los 27 exones del gen CFTR se detectaron variantes patogénicas que permitió establecer el diagnóstico molecular de varios de los pacientes.

De acuerdo a estos criterios, para el cálculo de frecuencias alélicas, se tomará en cuenta a los **25 pacientes con variantes patogénicas** que en este caso corresponderían a la población con diagnóstico molecular de fibrosis quística confirmado como pacientes o portadores.

Adicionalmente se incluirán **7 pacientes con diagnóstico clínico confirmado** (doble positivo para el test del sudor) que presentan mutaciones sin significado clínico asignado, las cuales deberían ser evaluadas en próximos estudios para definir su patogenicidad **Tabla 7**.

**Tabla 7.**  
**Mutaciones sin significado clínico asignado, en 7 pacientes con doble positivo para el test del sudor**

Paciente	Test del sudor	Test del sudor	Mutación
2	118	98	NG_016465.3:g.19395G>A Homocigoto c.74655del A Homocigoto p.T854T Heterocigoto
5	75	112	c.43590T>G Heterocigoto p.Lys114Ter Heterocigoto NG_016465.3:g.75901C>T Heterocigoto c.134337T>C Homocigoto c.166851G>C Homocigoto c.206359C>A Homocigoto
11	82	87	NG_016465.3:g.19395G>A Homocigoto c.204099A>C Homocigoto p.M470V Heterocigoto p.T854T Heterocigoto
12	76	78	p.T854T Homocigoto c.79447C>A Heterocigoto c.204099A>C Homocigoto
13	88	90	NG_016465.3:g.19395G>A Homocigoto c.142053T>G Heterocigoto c.204099A>C Homocigoto c.75922T>C Heterocigoto c.75884A>C Heterocigoto
17	80	89	p.M470V Heterocigoto c.204099A>C Homocigoto c.206359C>A Homocigoto
41	110	89	p.Ser18Gly Heterocigoto p.G970S Heterocigoto

Entre las mutaciones patogénicas se incluyó la **p.H609R** reportada solo en una ocasión en 4 de 6 pacientes ecuatorianos con diagnóstico clínico de fibrosis quística por Moya *et.al* (2009). En este estudio se encontró en **4 pacientes en estado homocigoto** con síntomas de fibrosis quística que coinciden con lo sugerido por la OMS, 3 de ellos con al

menos un valor positivo para el test del sudor, por lo que probablemente se trata de una mutación causante de la enfermedad **Tabla 8**.

**Tabla 8.**  
**Datos clínicos de pacientes homocigotos para la p.H609R**

Paciente n°	Edad	Test de sudor I	Test de sudor II	Signos clínicos	Criterios de sospecha clínica diagnóstica de la OMS de acuerdo al grupo etario*
15	9	119	Sin datos	Problemas permanentes de sinusitis crónica y ha tenido colonizaciones por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<b>Escolares:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Síntomas respiratorios crónicos inexplicados</li> <li>• <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en secreción bronquial</li> <li>• Sinusitis crónica</li> <li>• Poliposis nasal</li> <li>• Bronquiectasias</li> </ul>
30	11	Sin datos	Sin datos	Problemas pulmonares	
45	25	115	131	Problemas pulmonares leves, y problemas pancreáticos. Paciente hospitalizado por pancreatitis.	<b>Adolescentes y Adultos:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Enfermedad pulmonar supurativa crónica e inexplicada</li> <li>• Dolor abdominal recurrente</li> <li>• Pancreatitis</li> <li>• Síndrome de obstrucción intestinal distal</li> <li>• Cirrosis hepática e hipertensión portal</li> </ul>
16	28	134	Sin datos	Bronquiectasias, paciente hospitalizado frecuentemente por exacerbaciones pulmonares y digestivas	

\*(Hernández & González, 2013)

### 3.6.4 Cálculo de frecuencias alélicas de mutaciones patogénicas

En la **Tabla 9** se resume el número de alelos para cada una de las mutaciones patogénicas encontradas en este estudio que corresponden al 78% de los individuos con diagnóstico de fibrosis quística confirmado, mientras que aproximadamente el 22% corresponde a los 7 pacientes con diagnóstico clínico de fibrosis quística (doble positivo para el test del sudor) que no presentaron alelos para estas mutaciones, pero sí para otras aun sin reporte clínico asignado.

**Tabla 9.**  
**Alelos para las mutaciones patogénicas de este estudio**

Mutación	Número de Pacientes	Número de alelos
p.F508del	13	15
p. H609R	10	14
p. G85E	5	6
p.W1098X	2	2
p.R1162X	1	1
p.N1303K	1	1
Alelos con mutaciones patogénicas	25 <sup>a</sup> (78%)	39
WT o normales para las mutaciones patogénicas	7(22%)	25 <sup>b</sup>
Total	32	64

a. Sumatoria de pacientes= 25, algunos pacientes portan más de una mutación.

b. WT o normales para las mutaciones patogénicas

*7 pacientes sin mutaciones reportadas como patogénicas \* 2 alelos  
+ 11 alelos (de pacientes heterocigotos para las mutaciones patogénicas)  
= 25 alelos*

c.  $n = 32 \text{ pacientes} \times 2 \text{ alelos o cromosomas} = 64 \text{ Alelos}$

Con esta información se calcularon las frecuencias alélicas para estas mutaciones

**Tabla 10.**

**Tabla 10.**  
**Frecuencias alélicas de mutaciones patogénicas encontradas en este estudio.**

<b>Mutación</b>	<b>Frecuencia alélica absoluta</b>	<b>Frecuencia alélica relativa (%)</b>
<b>p.F508del</b>	15	23.44
<b>p. H609R</b>	14	21.88
<b>p. G85E</b>	6	9.38
<b>p.W1098X</b>	2	3.13
<b>p.R1162X</b>	1	1.56
<b>p.N1303K</b>	1	1.56

**3.6.5 Panel de mutaciones del gen CFTR para la población ecuatoriana y comparación de las mutaciones con reportes en otras poblaciones.**

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, el panel de mutaciones más comunes en la población ecuatoriana con fibrosis quística sugerido como un **screening inicial** para el diagnóstico molecular de la enfermedad en nuestro país corresponde a las mutaciones: **p.F508del, p. H609R, p.G85E, p.W1098X, p.R1162X, p.N1303K.**

Los frecuencias de las mutaciones patogénicas obtenidas en este estudio se compararon con estudios en otras poblaciones, ya que se ha reportado que las mutaciones del gen CFTR y sus respectivas frecuencias varían de acuerdo al origen geográfico y/o étnico (Derichs, 2013).

Con este fin, se utilizó la prueba de hipótesis de diferencia de proporciones con un  $p= 0.05$  utilizando el software Statistix para definir si las frecuencias encontradas difieren significativamente de las reportadas en otros países **Tabla 11.**

**Tabla 11.**  
**Prueba de hipótesis para la diferencia de proporciones de las mutaciones patogénicas en Ecuador y otros países.**

Mutación	Ecuador <sup>a</sup> n= 32 (p1)	Ecuador <sup>b</sup> n= 62 (p2)	Colombia <sup>c</sup> n=92 (p2)	Perú <sup>d</sup> n=12 (p2)	Chile <sup>e</sup> n= 578 (p2)	México <sup>f</sup> n=97 (p2)	España <sup>g</sup> n= 1804 (p2)
		% p1≠p2 p1<p2	% p1≠p2 p1<p2	% p1≠p2 p1<p2	% p1≠p2 p1<p2	% p1≠p2 p1<p2	% p1≠p2 p1<p2
p.F508del	23.44%	37.1% p = 0.0580 p = 0.0290	41.8% p = 0.0086 p = 0.0043	25% p = 0.8783 p = 0.4391	30.6% p = 0.2231 p = 0.1116	40.7% p = 0.0127 p = 0.0064	52.7% p < 0.05 p < 0.05
p.H609R	21.88%	N.T	N.R	N.T	N.T	N.T	N.R
		% p1≠p2 p1>p2	% p1≠p2 p1>p2	% p1≠p2 p1>p2	% p1≠p2 p1>p2	% p1≠p2 p1>p2	% p1≠p2 p1>p2
p.G85E	9.38%	8.9% p = 0.9091 p = 0.4545	N.R	N.T	0.5% p < 0.05 p < 0.05	0.5% p < 0.05 p < 0.05	0.8 p < 0.05 p < 0.05
p.W1098X	3.13%	N.T	N.R	N.T	N.T	N.T	N.R
		% p1≠p2	% p1≠p2	% p1≠p2	% p1≠p2	% p1≠p2	% p1≠p2
p.R1162X	1.56%	N.R	1.1% p = 0.7644	N.T	0.9% p = 0.5656	N.R	1.6% p = 0.9773
p.N1303K	1.56%	2.4% p = 0.6997	0.5% p = 0.4324	N.T	N.R	2.1% p = 0.8016	2.5% p = 0.6345

### Leyenda Tabla 11

n= población de estudio, % frecuencia alélica para la mutación

- a) Presente estudio
- b) (Valle, Burgos, Valle, Egas, & Ruiz, 2007)
- c) (Keyeux, y otros, 2003)
- d) (Silva, 2008)
- e) (Lay, Puga, Astudillo, & Repetto, 2011)
- f) (Orozco L. , y otros, 2000)
- g) (Bobadilla, Macek, Fine, & Farrell, 2002)

N.T: Mutación no testeada

N.R: Mutación no reportada

p1 y p2: Proporciones

p= valor de p para la prueba de hipótesis de las proporciones, a un 95% de confianza

p<0.05: estadísticamente significativo, Mutación no reportada en otros países de Latinoamérica y España,

Mutación reportada solo en la población ecuatoriana por Moya *et. al* (2009)



## CAPÍTULO 4

### DISCUSIÓN

El presente trabajo constituye la primera investigación a nivel molecular en fibrosis quística en el Ecuador que analiza los 27 exones del gen CFTR para determinar la prevalencia de mutaciones en nuestra población, constituyendo un avance importante en el diagnóstico molecular de la enfermedad en nuestro país.

A diferencia del estudio realizado por Valle *et. al* (2007) sobre la prevalencia de mutaciones en población ecuatoriana con fibrosis quística, utilizando un kit comercial de 29 mutaciones (técnica de hibridación) del gen CFTR con el cual el 50% de los pacientes quedaron sin mutación identificada, el método de secuenciación aplicado en este estudio permitió encontrar 70 variaciones de secuencia, según Dequeker *et. al* (2009) la secuenciación del gen CFTR tiene mayor sensibilidad con respecto a otras técnicas moleculares como la Hibridación, SSCP, DDGE utilizadas para la detección de mutaciones

Cinco de estas corresponden a mutaciones patogénicas (p.F508del, p.G85E, p.N1303K, p.R1162X y p.W1098X) junto a la mutación p.H609R, representan al 78% de los pacientes con diagnóstico confirmado de fibrosis quística, el 22% restante de pacientes con diagnóstico clínico de fibrosis quística tienen otras mutaciones que no han sido reportadas clínicamente.

La mutación p.F508del es la más común en pacientes con fibrosis quística a nivel mundial con una frecuencia del 66% (Collazo, 2008). En este estudio se detectó una frecuencia del 23.4%, menor con respecto a España y países de Latinoamérica como México e incluso Colombia **Tabla 11**, uno de los países más cercanos al nuestro.

La mutación p.G85E tiene una prevalencia a nivel mundial del 0.2%, siendo más frecuente en la región del Mediterráneo: España 1%, e Italia con el 1,7% (Decaestecker, Decaestecker, Castellani, Jaspersz, Cuppensz, & Boeck, 2004). En este estudio, se encontró con una frecuencia del 9.38 %, mayor con respecto a España, Chile y México **Tabla 11**. Según Valle *et. al* (2007) la prevalencia de la mutación p.G85E en Ecuador es mucho mayor con respecto a los estudios de mutaciones en el gen CFTR a nivel latinoamericano, incluso a nivel mundial siendo mayor que la descrita en el sur de Grecia de donde se cree se originó.

La mutación p.W1098X no ha sido reportada en otros países de Latinoamérica ni en España, pero si en países como Turquía con una frecuencia 0.6% (Bobadilla, Macek, Fine, & Farrell, 2002) e Israel 1% (World Health Organization, 2006), mientras que las mutaciones p.N1303K y p. R1162X fueron identificadas en este estudio con una frecuencia similar a otros países de Latinoamérica y en España.

Estas mutaciones y sus frecuencias comparadas con otros países demuestran la heterogeneidad del genotipo de la población para el gen de la fibrosis quística.

El perfil de mutaciones del gen CFTR en América Latina refleja la alta variabilidad de sus habitantes ya que es una región diversa en cuanto al origen de la población, cultura y medio ambiente. La **Figura 21 (Anexos)** muestra la formación de 3 grupos separados de acuerdo al tipo y frecuencias de las mutaciones patogénicas del gen CFTR: 1) Argentina y Uruguay, 2) Chile, Brasil y Colombia, y 3) Cuba, Ecuador y Venezuela (Luna, Pivetta, Keyeuxb, & Perez, CFTR gene analysis in Latin American CF patients: Heterogeneous origin and distribution of mutations across the continent, 2007).

Esto coincide con las diferencias de frecuencias encontradas en la población ecuatoriana de este estudio, con respecto a otros países de Latinoamérica como Colombia, México, Chile y Ecuador.

Uno de los hallazgos más importantes de este estudio es la detección de la mutación p.H609R, la cual se encontró en 4 pacientes en estado homocigoto que presentan cuadro clínico de fibrosis quística, por lo que probablemente corresponde a una mutación causante de la enfermedad (patogénica).

El presente trabajo corresponde al segundo reporte de la mutación p.H609R a nivel mundial en la población ecuatoriana, después de Moya *et. al* (2009) quienes encontraron esta mutación en 4/6 pacientes ecuatorianos con fibrosis quística con doble positivo para el test de cloruro del sudor y con cuadro fenotípico de la enfermedad: insuficiencia pancreática, colonización con *Pseudomonas aeruginosa*, deterioro en la función pulmonar de acuerdo a valores de FEV1<sup>1</sup> entre el 36 y 75%.

La mutación p.H609R probablemente no ha sido tomada en cuenta en el examen habitual para el diagnóstico molecular de fibrosis quística en Ecuador, ya que los pacientes 16, 30 y 45 homocigotos para esta mutación, se habían sometido a un panel de 89 mutaciones comunes del gen de la fibrosis quística el cual no detectó ninguna mutación, mientras que el paciente 15 se había realizado una secuenciación completa del gen CFTR el cual si reportó la mutación p.H609R.

Los resultados encontrados en este estudio reafirman la importancia de la elaboración de un panel de mutaciones propio para nuestra población, la cual difiere bastante de otras incluso dentro de Latinoamérica, con el fin de establecer un diagnóstico molecular acertado y oportuno de la fibrosis quística en Ecuador donde no se ha investigado este gen profundamente. El panel de mutaciones sugerido como un screening inicial para la población ecuatoriana con fibrosis quística debería contener las mutaciones patogénicas **p.F508del**, **p.H609R**, **p.G85E**, **p.W1098X**, **p.R1162X** y **p.N1303K**, encontradas en este estudio.

---

<sup>1</sup> VOLUMEN ESPIRADO MÁXIMO EN EL PRIMER SEGUNDO DE LA ESPIRACIÓN FORZADA: Criterio de evaluación de la función pulmonar en pacientes con fibrosis quística, FEV1 > 70% (afectación leve), FEV1 40 - 69% (moderada), FEV1 < 39% (grave) (Hernández & González, 2013).

Las 64 variaciones restantes no se incluyen en el panel diagnóstico ya que no tienen reporte de patogenicidad, esto junto a la calidad del diagnóstico clínico previo de los pacientes, excluyeron a 16 de ellos (33% de la población de estudio) de la evaluación de resultados por no contar con diagnóstico clínico y/o molecular confirmado de fibrosis quística debido a que son pacientes sin doble positivo para el test de cloruro en el sudor y con variaciones de secuencia sin significado clínico asignado.

Un estudio similar de Lay *et. al* (2014) de secuenciación de los 27 exones del gen CFTR en pacientes chilenos con fibrosis quística, menciona que aunque con la aplicación de éste método en la región codificante y los segmentos intrónicos adyacentes a los exones se espera un 90% de detección en el total de alelos, existe una gran proporción de variantes que no han sido identificadas que disminuyen la tasa de detección de mutaciones, otro factor importante a tomar en cuenta es la certeza del diagnóstico clínico de fibrosis quística sometidos a estudio molecular.

Las variaciones encontradas fuera del exón 1 (NG\_016465.3:g.19395G>A) y exón 22 (c.204099A>C) en un porcentaje del 15% y 48% de la población de estudio, se deberían continuar evaluando para determinar la su efecto en la proteína ya que podrían ubicarse en regiones intrónicas o reguladoras del gen CFTR, como ha sido descrito para el intrón 16 (Bienvenu, Cartault, Lesure, Renouil, Beldjord, & Kaplan, 1996) e intrón 23 (Yoshimura, Chu, & Crystal, 1992), donde ciertas mutaciones en esta ubicación causan un cambio en el *splycing* y por lo tanto efecto en la proteína.

Por lo citado anteriormente, es importante continuar con la investigación de todas estas variaciones sin significado clínico para asignarles un reporte de patogenicidad en relación a los hallazgos clínicos en las diferentes poblaciones. Adicionalmente, el estudio del gen CFTR se profundizaría aún más con la búsqueda de variaciones patogénicas en las regiones intrónicas y de unión intrón-exón (Dequeker, y otros, 2009). Así como rearreglos (deleciones y duplicaciones) (Dequeker, y otros, 2009) que se observan por la técnica de MLPA y no por secuenciación (Lay, Vásquez, Puga, Manque, & Repetto, 2014).

Con esto, se sugiere ampliar el panel de mutaciones del gen CFTR para mejorar la tasa de detección de la fibrosis quística en nuestro país, esperando así que el costo beneficio que representa el diagnóstico oportuno vaya en beneficio del paciente y que el Ministerio de Salud Pública del Ecuador optimice los tratamientos terapéuticos para aquellos pacientes con diagnóstico certero para ésta enfermedad.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES

- La secuenciación de los 27 exones del gen CFTR mediante el método de Sanger permitió la identificación de 70 variaciones de secuencia en el gen CFTR dentro de estas las mutaciones patogénicas p.F508del, p. H609R, p.G85E, p.W1098X, p.R1162X y p.N1303K corresponden aproximadamente al 78% de los pacientes con diagnóstico de fibrosis quística de este estudio.
- Las mutaciones más frecuentes: p.F508del, p.G85E, p.W1098X, p.R1162X y p.N1303K identificadas en esta investigación han sido reportadas en estudios previos, sin embargo presentan frecuencias alélicas relativas propias para la población ecuatoriana.
- La mutación p.H609R es la segunda más frecuente en la población estudiada y constituye el segundo reporte en pacientes ecuatorianos con Fibrosis Quística, siendo probablemente una mutación causante de la enfermedad de acuerdo a la clínica de los pacientes que la presentan.
- Las mutaciones p.F508del, p. H609R, p.G85E, p.W1098X, p.R1162X y p.N1303K, deberían incluirse en el screening diagnóstico de la enfermedad en nuestro país.
- Se debería evaluar la prevalencia de las mutaciones p.G542X, p.G551D, y p.R334W encontradas por Valle *et. al* 2007 en la población ecuatoriana para incluirlas o no en el panel de las mutaciones más comunes para el screening inicial de fibrosis quística, ya que este estudio no las detectó.

## **CAPÍTULO 6**

### **RECOMENDACIONES**

- Definir el significado clínico de las variaciones de secuencia no reportadas previamente encontradas en este estudio, realizando ensayos tanto en pacientes con fibrosis quística como en individuos normales, junto una recolección más profunda de los datos clínicos de los pacientes.
  
- Realizar un análisis de las variantes NG\_016465.3:g.19395G>A y c.204099A>C en próximos estudios para entender el efecto que puedan tener las mismas en la proteína ya que al encontrarse fuera de los exones 1 y 22 respectivamente, posiblemente se ubican en regiones intrónicas o reguladoras del gen CFTR.
  
- Para aquellos pacientes con diagnóstico clínico de fibrosis quística que después de la secuenciación siguen manteniendo un genotipo desconocido se debería buscar variaciones en las regiones intrónicas y de unión intrón-exón, además de grandes deleciones y duplicaciones (MLPA) en el gen CFTR.

## CAPÍTULO 7

### BIBLIOGRAFÍA

- Applied Biosystems. (2002). BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. USA.
- Bienvenu, T., Cartault, F., Lesure, F., Renouil, M., Beldjord, C., & Kaplan, J. (1996). A splicing mutation in intron 16 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene, associated with severe disease, is common on Reunion Island. *Human heredity*, 168-71.
- Bobadilla, J. L., Macek, M., Fine, J. P., & Farrell, P. M. (2002). Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Human Mutation*, 575–606.
- CFTR Science. (2015). *CFTR science*. Recuperado el 2015, de <https://www.cftrscience.com/?q=normal-CFTR-protein>
- Collazo, T. (Mayo de 2008). *Revista Cubana de Medicina General Integral*. Recuperado el 2015, de [http://www.bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol27\\_2\\_08/ibi04208.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol27_2_08/ibi04208.htm)
- Decaestecker, K., Decaestecker, E., Castellani, C., Jaspersz, M., Cuppensz, H., & Boeck, K. D. (2004). Genotype/phenotype correlation of the G85E mutation in a large cohort of cystic fibrosis patients. *European Respiratory Journal*, 679–684.
- Dequeker, E., Stuhmann, M., Morris, M. A., Casals, T., Castellanis, C., Claustres, M., y otros. (2009). Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders – updated European recommendations. *European Journal of Human Genetics*, 17, 51-65.
- Derichs, N. (2013). Targeting a genetic defect: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators in cystic fibrosis. *European Respiratory review*, 22(127), 58-65.
- Dorado, G. (2004). *Universidad de Córdoba*. Recuperado el 2015, de <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/47%20SECUENCIACI%C3%93N%20DNA.pdf>



- Escobar, H., & Sojo, A. (2002). *Asociación Española de Pediatría*. Recuperado el 2015, de <http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/10-FQ.pdf>
- Fanen, P., & Hasnain, A. (25 de Mayo de 2004). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. Recuperado el 15 de Septiembre de 2015, de <http://atlasgeneticsoncology.org/Educ/CystFibID30032ES.pdf>
- Francis, D. (2005). *Ohio Agricultural Research and Development Center*. Recuperado el Marzo de 2015, de <http://www.oardc.ohio-state.edu/tomato/604.03/Module3/PCRproductSequencing.pdf>
- Gene Medicine. (Julio de 2012). *Oxford University GeneMedicine*. Recuperado el 2015, de <http://www.genemedresearch.ox.ac.uk/cysticfibrosis/function.html>
- Genetics Home Reference. (Enero de 2008). *Genetics Home Reference*. Recuperado el Marzo de 2015, de <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/CFTR>
- Hakkak, A. M., Keramatipour, M., Talebi, S., Brook, A., Afshari, J. T., Raazi, A., y otros. (2013). Analysis of CFTR Gene Mutations in Children with Cystic Fibrosis, First Report from North-East of Iran. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 16(8), 918-921.
- Hernández, P., & González, F. (3 de Diciembre de 2013). *Ministerio de Salud Pública del Ecuador*. Recuperado el Marzo de 2015, de <http://instituciones.msp.gob.ec/documentos/Guias/fibrosis.pdf>
- Huang, Q., Ding, W., & Wei, M.-X. (2008). Comparative analysis of common CFTR polymorphisms poly-T, TG-repeats and M470V in a healthy Chinese population. *World Journal of Gastroenterology*, 1925-1930.
- Kan, S., Roth, P., Piltcher, O., & Oliveira, R. d. (2015). Chronic rhinosinusitis and nasal polyposis in cystic fibrosis: update on diagnosis and treatment. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 41(1), 65-76.
- Keyeux, G., Rodas, C., Bienvenu, T., PGaravito, Vidaud, D., Sanchez, D., y otros. (2003). CFTR mutations in patients from Colombia: implications for local and regional molecular diagnosis programs. *Human Mutation*, 22(3), 259.
- Lay, G., & Repetto, G. (2010). Genética y fibrosis quística: Desde el gen CFTR a los factores modificadores. *Neumología Pediátrica*.

- Lay, G., Puga, A., Astudillo, P., & Repetto, G. M. (2011). Cystic fibrosis in Chilean patients: Analysis of 36 common CFTR gene mutations cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 10(1), 66-70.
- Lay, G., Vásquez, M., Puga, A., Manque, P., & Repetto, G. (2014). Secuenciación del gen CFTR en un grupo de pacientes chilenos con fibrosis quística. *Scielo*, 85(4), 448-454.
- Life technologies. (2015). *Life technologies*. Recuperado el Marzo de 2015, de [http://www.lifetechnologies.com/us/en/home/life-science/sequencing/sanger-sequencing/sanger\\_sequencing\\_method.html](http://www.lifetechnologies.com/us/en/home/life-science/sequencing/sanger-sequencing/sanger_sequencing_method.html)
- Luna, M., Pivetta, O., Keyeux, G., & Perez, M. (Mayo de 2007). CFTR gene analysis in Latin American CF patients: Heterogeneous origin and distribution of mutations across the continent. *Journal of Cystic Fibrosis*, 6(3), 194-208.
- Luna, M., Pivetta, O., Keyeux, G., & Perez, M. (Mayo de 2007). CFTR gene analysis in Latin American CF patients: Heterogeneous origin and distribution of mutations across the continent. *Journal of Cystic Fibrosis*, 6(3), 194-208.
- Montgomery, J., Wittwer, C., Kent, J. O., & Zhou, L. (2007). Scanning the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene Using High-Resolution DNA Melting Analysis. *Clinical Chemistry*, 53(11), 1891-1898.
- Moskowitz, S. M., Chmiel, J. F., Stern, D. L., Cheng, E., Gibson, R. L., Marshall, S. G., y otros. (2008). Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders. (R. A. Pagon, M. P. Adam, H. H. Ardinger, S. E. Wallace, A. Amemiya, L. J. Bean, y otros, Edits.) *Genetics in Medicine*, 851-868.
- Moya, M., Glover, G., Mondéjar, P., Pastor, M. D., Fernández, A., & Sánchez, M. (2009). CFTR H609R mutation in Ecuadorian patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 8, 280-281.
- Ntimbane, T., Comte, B., Mailhot, G., Berthiaume, Y., Poitout, V., Prentki, M., y otros. (2008). Cystic Fibrosis-Related Diabetes: From CFTR Dysfunction to Oxidative Stress. *Clinical Biochemistry Reviews*, 30, 153-177.
- Orozco, L., Velázquez, R., Zielenski, J., Tsui, L.-C., Chávez, M., Lezana, J. L., y otros. (2000). Spectrum of CFTR mutations in Mexican cystic fibrosis patients: identification of five novel mutations (W1098C, 846delT, P750L, 4160insGGGG and 297-1G A). *Human Genetic*, 360-365.

- Orozco, L., Velázquez, R., Zielenski, J., Tsui, L.-C., Chávez, M., Lezana, J., y otros. (2000). Spectrum of CFTR mutations in Mexican cystic fibrosis patients: identification of five novel mutations (W1098C, 846delT, P750L, 4160insGGGG and 297-1G→A). *Human Genetics*, 6(3), 360-365.
- Paz y Miño, C., Pérez, C., Burgos, R., Dávalos, M. V., & Leone, P. (1999). The  $\Delta F508$  mutation in Ecuador, South America. *Human Mutation*, 14(4), 1098-1004.
- Perone, C., Medeiros, G., Castillo, D. d., Aguiar, M. d., & Januário, J. (Febrero de 2010). Frequency of 8 CFTR gene mutations in cystic fibrosis patients in Minas Gerais, Brazil, diagnosed by neonatal screening. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 43(2), 134-138.
- Rogers, A. (23 de Abril de 2006). *California State University, Sacramento*. Recuperado el 2015, de <http://www.csus.edu/indiv/r/rogersa/bio181/seqsanger.pdf>
- Schwarz, M., Gardner, A. J., Renwick, P., & Robinson, D. (2009). *Clinical Molecular Genetics Society*. Recuperado el 2015, de <http://www.acgs.uk.com/media/774379/cfbp26may.pdf>
- Silva, C. (2008). *Cybertesis*. Recuperado el 2015, de [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/xmlui/bitstream/handle/cybertesis/1612/silva\\_ac.pdf?sequence=1](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/xmlui/bitstream/handle/cybertesis/1612/silva_ac.pdf?sequence=1)
- Trujillano, D., Weiss, M., Julia, K., Papachristos, E., Werber, M., & Kandaswamy, K. (2015). *Validation of a semiconductor next generation sequencing assay for the clinical genetic screening of CFTR*. Recuperado el Octubre de 2015, de Centogene: [\https://www.centogene.com/uploads/media/Trujillano\\_et\\_al-2015-Molecular\\_Genetics\\_\\_Genomic\\_Medicine.pdf](https://www.centogene.com/uploads/media/Trujillano_et_al-2015-Molecular_Genetics__Genomic_Medicine.pdf)
- Universal Mutation Database. (2005). *Universal Mutation Database*. Recuperado el 2015, de [http://www.umd.be/CFTR/W\\_CFTR/gene.html](http://www.umd.be/CFTR/W_CFTR/gene.html)
- Valle, E. P., Burgos, R., Valle, J., Egas, D., & Ruiz, J. (2007). Analysis of CFTR gene mutations and Cystic Fibrosis incidence in the Ecuadorian population. *Scielo*, 48, 91-98.
- Velázquez, L. P., Martínez, M. d., & Romero, A. C. (2007). *Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático*. Recuperado el 2015, de <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/extraccion.pdf>

- Winnick, E. (2004). *The Scientist*. Recuperado el 15 de Septiembre de 2015, de <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/15939/title/DNA-Sequencing-Industry-Sets-its-Sights-on-the-Future/>
- World Health Organization. (2006). Recuperado el 2015, de [http://www.who.int/genomics/publications/en/HGN\\_WB\\_04.02\\_report.pdf](http://www.who.int/genomics/publications/en/HGN_WB_04.02_report.pdf)
- Yoshimura, K., Chu, C.-S., & Crystal, R. G. (1992). Alternative Splicing of Intron 23 of the Human Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene Resulting in a Novel Exon and Transcript Coding for a Shortened Intracytoplasmic C Terminus. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 686-690.
- Zabala, J. (2005). *Manual de técnicas de biología molecular* (Vol. 7). Yucatán: DIRECCION GENERAL DE DESARROLLO ACADEMICO.

## Anexos

**Tabla 12.**  
**Ensayos de protocolos de purificación**

Muestras	Purificación de productos de PCR original (1)	Purificación de productos de PCR modificado (2)	Purificación de productos de secuenciación original (1)	Purificación 2 Purificación de productos de secuenciación modificado (2)	Secuencia SI: X NO:			
					1.1	1.2	2.1	2.2
1 E3	X		X	X				
2 E3		X	X	X				X
3 E11	X		X	X				
4 E11		X	X	X			X	X
5 E10	X		X	X				
6 E10		X	X	X				X
7 E13	X		X	X				
8 E13		X	X	X		X		
9 E17b	X		X	X				X
10 E17b		X	X	X			X	X

**Tabla 13.**  
**Datos de los pacientes analizados en este estudio**

Paciente	Edad	Género	Ciudad	Test del sudor*	Diagnóstico molecular
1	11	M	Quito	Positivo, Limítrofe	
2	18	F	Quito	2 Positivos	
3	8	F	Quito	Positivo ,Limítrofe	
4	7	F	Otavallo	1 Positivo	
5	9	F	Quito	2 Positivos	
6	11	M	Quito	Sin datos	
7	22	F	Ibarra	1 Positivo	<b>CONTINÚA→</b>

8	27	F	Quito	1 Positivo	Heterocigoto p.F508del
9	20	M	Quito	1 Positivo	Heterocigoto p.F508del
10	6	M	Quito	Sin datos	
11	5	F	Quito	2 Positivos	
12	3	F	Quito	2 Positivos	
13	1	M	Quito	2 Positivos	
14	4	M	Quito	1 Positivo	
15	9	F	Ambato	1 Positivo	Homocigoto p.H609R
16	28	F	Quito	1 Positivo	
17	2	M	Quito	2 Positivos	
18	5	F	Quito	Sin datos	
19	1	M	Quito	1 Positivo	
20	5	F	Quito	1 Positivo	
21	12	M	Checa	1 Positivo	
22	10	F	Quito	2 Positivos	Heterocigoto p.G85E
23	12	F	El Coca	1 Positivo	
24	2	F	Quito	1 Positivo	Heterocigoto para p.W1098X y p.N1303K
25	12	M	Guayaquil	1 Positivo	Homocigoto G85E
26	2	F	Quito	1 Positivo	
27	1	F	Quito	1 Positivo	
28	34	F	Quito	1 Positivo	
29	7	M	Baños	Sin datos	<b>CONTINÚA→</b>

30	11	F	Salcedo	Sin datos	
31	11	F	Atuntaqui	1 Positivo	
32	4	M	Ambato	1 Positivo	Heterocigoto p.G85E
33	4	M	Sto. Domingo	1 Positivo	
34	14	M	Quito	Sin datos	
35	8	F	Quito	1 Positivo	
36	4	M	Quito	1 Positivo	
37	25	M	Guaranda	1 Positivo	
38	21	M	Quito	1 Positivo	Homocigoto p. F508del
39	5	M	Quito	1 Positivo	
40	6	M	Quito	1 Positivo	
41	10	M	Quito	2 Positivos	
42	25	F	Ibarra	2 Positivos	Heterocigoto y p.F508del p.R1162X
43	12	M	Quito	2 Positivos	
44	34	F	Riobamba	1 Positivo	
45	25	M	Quito	2 Positivos	
46	24	M	Quito	1 Positivo	Heterocigoto p.F508del
47	7	M	Quito	Sin datos	
48	1	M	Francisco de Orellana	1 Positivo	Heterocigoto p.F508del

\*Interpretación basada en la Guía de Práctica Clínica (GPC) y Manual de Procedimientos de Fibrosis Quística para Ecuador (Hernández & González, 2013)

**Tabla 14.**  
**Concentraciones y radios de muestras de ADN genómico**

Paciente	Concentración de ADN (ng/ul)	Radio <sub>260/280</sub>
1	25.6	2.02
2	27.2	1.89
3	22.7	1.91
4	33.6	1.88
5	21	1.81
6	21.3	1.9
7	35.8	1.85
8	21.2	1.83
9	29.8	1.87
10	32.9	1.87
11	24.5	1.87
12	19.7	1.84
13	24.9	1.8
14	24.1	1.79
15	25.6	1.87
16	31.3	1.89
17	23.4	2
18	24.8	1.84
19	37.8	1.83
20	18.9	1.87
21	15.1	1.72
22	23.4	1.81
23	26.2	1.71
24	28.2	1.84
25	17.1	1.86 <i>CONTINÚA</i> →



26	32.2	1.81
27	25.9	1.86
28	29.2	1.85
29	36.5	1.87
30	36.6	1.88
31	32.4	1.88
32	19.9	1.84
33	20	1.92
34	20.4	1.95
35	16.4	1.86
36	33	1.85
37	34.2	1.84
38	12.2	1.85
39	18.8	1.92
40	55.4	1.8
41	8.9	1.85
42	22.2	1.82
43	44.6	1.8
44	25	1.75
45	27	1.74
46	12.8	1.78
47	30.2	1.79
48	39.6	1.77

**Tabla 15.**  
**Variaciones de secuencia encontradas en este estudio para los 27 exones del gen CFTR**

Exón	Variación	Significado clínico	Paciente
1	NG_016465.3:g.19395G>A	No asignado	2,3,6,8,9,11,13,14,24,30,37,45
	c.*19396C>A	Sin reporte	37
	c.*19304delG	Sin reporte	37
	p.Ser18Gly	Alelo no probado <sup>e</sup>	41
	NG_016465.3:g.19304G>C	Alelo benigno <sup>d</sup>	42
2	c.*43590T>G	Sin reporte	5
	c.*43510_43511delTG	Sin reporte	14
	c.*43473delG	Sin reporte	14
	c.*43621T>A	Sin reporte	16,23,24
	c.*43580G>T	Sin reporte	21,22
	c.*43594A>G	Sin reporte	22
	c.*43583A>G	Sin reporte	22
	c.*43575G>C	Sin reporte	25,47
	NG_016465.3:g.43582T>C	Alelo no probado <sup>e</sup>	27
	c.*43598G>A	Sin reporte	27 <i>CONTINÚA</i> →

	NG_016465.3:g.43592T>C	Alelo no probado <sup>e</sup>	28,29,30,31,35,36,37,40,43,47
	c.*43555G>C	Sin reporte	37,38,43,45,46
	c.*43544T>A	Sin reporte	46
<b>3</b>	<b>p.G85E</b>	<b>Patogénica</b>	<b>22,23, 25,32, 40</b>
<b>4</b>	p.Lys114Ter	Clínica no proporcionada <sup>e</sup>	5,7
<b>5</b>			
<b>6A</b>	c.*74655del A	Sin reporte	2
	c.*74534G>C	Sin reporte	3,10,15,16,18,30,34,40,42,46
	c.*74491G>C	Sin reporte	10, 34
	c.*74629T>C	Sin reporte	22
<b>6B</b>	NG_016465.3:g.75901C>T	Alelo Benigno	5,7,8,9,21,34,36,38,42,43,46,47,48
	c.*75922T>C	Sin reporte	13,14,23,30,31,40
	c.*75884A>C	Sin reporte	13
	c.*75896T>C	Sin reporte	20
<b>7</b>	c.*79447C>A	Sin reporte	12
	p.G330E	Alelo no	<b>26 CONTINÚA→</b>

		probado <sup>e</sup>	
<b>8</b>			
<b>9</b>	c.*88121G>A	Sin reporte	8
	p.Ala485Val	Alelo no probado <sup>e</sup>	16
<b>10</b>	p.M470V <sup>a</sup>	Polimorfismo	3,4,7,11,13,15,17,19,20,22, 23,25,26,27,28, 30,33,35,37,39,44,45
	p.F508del	Patogénica	6,8,9, 31,34,36,38,40,42,43,46,47, 48
<b>11</b>			
<b>12</b>			
<b>13</b>	p.H609R		7,15,16,22,29,30,34,37,45, 48
	c.*131477G>C	Sin reporte	15
	c.*131437C>A	Sin reporte	21
	c.*131851G>C	Sin reporte	25, 29
	c.*131796C>G	Sin reporte	26
	c.*131653A>G	Sin reporte	33
	c.*131910G>T	Sin reporte	35
<b>14a</b>	p.T854T <sup>b</sup>	Polimorfismo	2,8,9,11,12,18,19,20,26,31, 35,42
	c.*134337T>C	Sin reporte	5 <i>CONTINÚA</i> →

	c.*134228G>C	Sin reporte	8
<b>14b</b>	c.*142053T>G	Sin reporte	13
	c.*142152T>G	Sin reporte	13,27
<b>15</b>	p.T966T <sup>b</sup>	Polimorfismo	33
	c.*143018G>T	Sin reporte	39
	p.G970S		39,41,46
	c.*142934T>G	Sin reporte	46
<b>16</b>			
<b>17a</b>	c.*14998T>A	Sin reporte	20,34,47
<b>17b</b>	p.W1098X	Patogénica	24,43
	c.*151025G>A	Sin reporte	29
	c.*151010delT	Sin reporte	40
<b>18</b>			
<b>19</b>	c.*166851G>C	Sin reporte	5,16,18,34
	c.*166773C>G	Sin reporte	12
	c.*166921A>G	Sin reporte	20
	c.*166879T>G	Sin reporte	21,24,26,27
	p.Lys1177Arg	No asignado	36
	p.R1162X	Patogénica	42
<b>20</b>	p.P1290P <sup>b</sup>	Polimorfismo	3,28
	c.*181837A>G	Sin reporte	36
<b>21</b>	p.Asn1303Lys	Patogénica	24 <i>CONTINÚA</i> →

22	c.*204099A>C	Sin reporte	9,10,11,12,13,14,15,16,17, 18,19,20,22,23,25,26,27,28 29,30,31,32,33,34,35,36,37 ,39,40,42,43,44,45, 46
	c.*203927A>T	Sin reporte	31
23	c.*204759G>A	Sin reporte	6,20
	c.*204767A>G	Sin reporte	6,20
24	p.Q1463Q <sup>b</sup>	Polimorfismo	3,11,19,26,28,31,35
	c.*206359C>A	Sin reporte	5,6,7,8,9,15,16,17,18,22,34 ,39,43,44
	p.Y1424Y <sup>b</sup>	Polimorfismo	39

\*Posición en la secuencia de referencia NG\_016465.3 para el gen CFTR.

a. Polimorfismo o variante neutra (Trujillano, Weiss, Julia, Papachristos, Werber, & Kandaswamy, 2015), b. Polimorfismo (Huang, Ding, & Wei, 2008), c. H609R (Moya, Glover, Mondéjar, Pastor, Fernández, & Sánchez, 2009), d. Alelo benigno = no patogénico, e. casos en los que los datos no están disponibles o son desconocidos

**Tabla 16.**  
**Técnicas de diagnóstico molecular de la FQ**

Técnica para detección de mutaciones conocidas	Mutaciones detectadas	Ventajas	Limitaciones
Análisis héteroduplex	F508del y I507del micro inserciones/ deleciones : 394delTT,1677delTA, 1609delCA	Simple y rápido	Patrón de migración no específico para la mutación dada <b>CONTINÚA</b> →

Análisis por enzimas de restricción	Mutaciones individuales	Simple y rápido Útil para la prueba de portador en cascada en caso de mutaciones raras	No específico G551D y R553X tienen el mismo sitio de corte utilizando la enzima HincII, y W1282X y R1283M con la enzima MnlI
Hibridación inversa dot Blot	Más de 20 mutaciones por dúplex	Apropiado para series largas	
Innogenetics (Inno LiPA)	36 mutaciones	Buena especificidad	
ARMS	Más de 20 mutaciones	Apropiado para series largas	Diseño complejo de primers
Tepnel (Elucigene)	20-38 mutaciones	Buena especificidad	
OLA Abbott Molecular (Cystic Fibrosis Genotyping Assay)	32 mutaciones	Buena especificidad Apropiado para series largas	
Técnica para detección de mutaciones desconocidas	Mutaciones detectadas	Ventajas	Limitaciones
DGGE (Electroforesis desnaturante en gel de	Detecta todas las mutaciones de pocas pares de base en las regiones codificantes	Alta sensibilidad > 95%	Difícil de configurar; automatización <b>CONTINÚA</b> →

gradiente)	y límites intrónicos		difícil Se puede perder mutaciones isostables en el estado homocigótico
DHPLC (Cromatografía líquida desnaturalizante)		Alta sensibilidad > 95%	Generalmente se pierde mutaciones homocigóticas. Necesita secuenciación de las regiones ricas en polimorfismos
SSCP (Polimorfismo de cadena simple)		Simple y rápido	Sensibilidad del 80-85%
Secuenciación (técnica de primera línea o de confirmación después de una prueba de cribado)		Aproximadamente 100% de sensibilidad	
PCR Multiplex fluorescente	Con el objetivo de detectar deleciones, inserciones y	Simple y rápido	Sensible a los métodos de <b><i>CONTINÚA</i></b> →



MLPA	duplicaciones. Todas las regiones codificantes		extracción. Las duplicaciones pueden ser difíciles de probar
------	--	--	--

Fuente: Dequeker, y otros (2009)

**Tabla 17.**

**Tamaños del producto amplificado de los 27 exones del gen CFTR**

Amplicon	Tamaño del producto (bp)
Exon 1	146
Exon 2	210
Exon 3	169
Exon 4, Amplicon 1	191
Exon 4, Amplicon 2	185
Exon 5	188
Exon 6a	256
Exon 6b	200
Exon 7, Amplicon 1	227
Exon 7, Amplicon 2	189
Exon 8	189
Exon 9	258
Exon 10	277
Exon 11	175
Exon 12	169
Exon 13, Amplicon 1	206
Exon 13, Amplicon 2	322
Exon 13, Amplicon 3	254
Exon 13, Amplicon 4	241
Exon 14a	232 <i>CONTINÚA</i> →

Exon 14b	212
Exon 15, Amplicon 1	193
Exon 15, Amplicon 2	182
Exon 16	216
Exon 17a	250
Exon 17b, Amplicon 1	183
Exon 17b, Amplicon 2	174
Exon 18	217
Exon 19, Amplicon 1	204
Exon 19, Amplicon 2	196
Exon 20	206
Exon 21	250
Exon 22	251
Exon 23	196
Exon 24, Amplicon 1	166
Exon 24, Amplicon 2	151

Fuente: Montgomery, Wittwer, Kent, & Zhou(2007)

**Tabla 18.**

**Secuencias de referencia de los 27 exones del gen CFTR**

Exón	Secuencia de referencia GenBank
1	M55106.1
2	M55107.1
3	M55108.1
4	M55109.1
5	M55110.1
6a	M55111.1
6b	M55111.1
7	M55112.1
8	M55113.1 <i>CONTINÚA</i> →

9	M55114.1
10	M55115.1
11	M55116.1
12	M55117.1
13	M55118.1
14a	M55119.1
14b	M55120.1
15	M55121.1
16	M55122.1
17a	M55123.1
17b	M55124.1
18	M55125.1
19	M55126.1
20	M55127.1
21	M55128.1
22	M55129.1
23	M55130.1
24	M55131.1

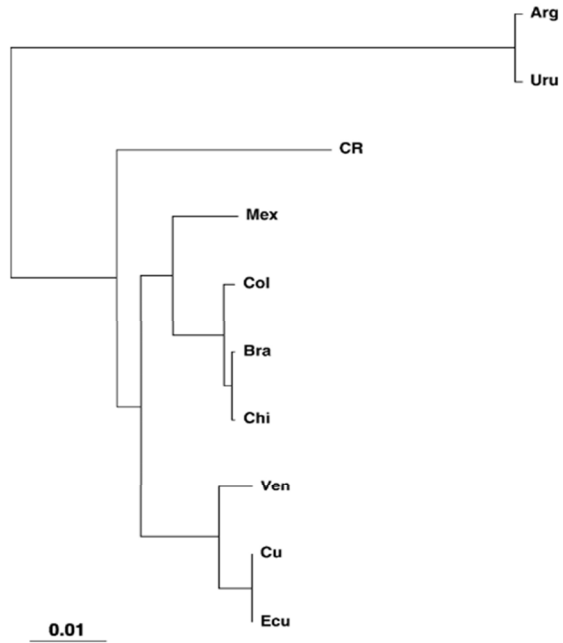
**Tabla 19.**  
**Valores del test del sudor para los 48 pacientes de este estudio**

Paciente	Test del sudor	
	1	2
1	85	42
2	118	98
3	95	48
4	87	Sin datos
5	75	112
6	Sin datos	Sin datos <i>CONTINÚA</i> →

7	115	Sin datos
8	103	Sin datos
9	132	Sin datos
10	Sin datos	Sin datos
11	82	87
12	76	78
13	88	90
14	62	Sin datos
15	119	Sin datos
16	134	Sin datos
17	80	89
18	Sin datos	Sin datos
19	87	Sin datos
20	200	Sin datos
21	115	Sin datos
22	95	98 <i>CONTINÚA</i> →

23	81	Sin datos
24	82	Sin datos
25	86	Sin datos
26	82	Sin datos
27	97	Sin datos
28	84	Sin datos
29	Sin datos	Sin datos
30	Sin datos	Sin datos
31	98	Sin datos
32	123	Sin datos
33	84	Sin datos
34	Sin datos	Sin datos
35	70	Sin datos
36	108	Sin datos
37	119	Sin datos <i>CONTINÚA</i> →

38	116	Sin datos
39	Sin datos	Sin datos
40	146	Sin datos
41	110	89
42	137	129
43	110	108
44	98	Sin datos
45	115	131
46	130	Sin datos
47	Sin datos	Sin datos
48	98	Sin datos



**Figura 21. Árbol de distancias de países de Latinoamérica de acuerdo a las mutaciones patogénicas del gen CFTR.**

Fuente: Luna, Pivettaa, Keyeuxb, & Perez(2007)