

## **Diagnóstico biomolecular de anomalías genéticas asociadas a Fibrosis Quística usando indicadores mutagénicos.**

Biomolecular diagnosis of genetic abnormalities associated with Cystic Fibrosis using indicators mutagenic.

Néstor Purizaga I.<sup>1</sup>, Oscar Mendoza N.<sup>1</sup>, Alberto Ordinola Z.<sup>1</sup>, Tessy Peralta O.<sup>1</sup>, Benoit Diringer.<sup>2</sup>

### **Resumen**

Pacientes diagnosticados con Fibrosis Quística provenientes del Instituto de Salud del Niño del Ministerio de Salud del Perú y del Hospital IV E. Rebagliatti Martins (Seguridad Social), fueron evaluados durante el segundo semestre del 2013 con la finalidad de detectar mutaciones del Gen C.FTR. (Regulador de la Conductancia Transmembrana de la Fibrosis Quística). Mediante el método de la A.R.M.S-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa- Sistema de amplificación de la Mutación Refractaria), se analizaron 28 muestras, encontrándose que en el 21,42% estaban presente dos mutaciones y el 32,21% una mutación. La prevalencia de DF508 en Perú, es relativamente baja (31,30%) en comparación con el promedio latinoamericano (43,54%). Al contrario los pacientes peruanos presentan una tasa importante de G542X (7,40%) en comparación con los de Latinoamérica (5,10%).

### **Abstract**

Patients diagnosed with Cystic Fibrosis from the Institute of Child Health, Ministry of Health of Peru and E. Rebagliatti Martins Hospital (Social Security), were evaluated during the second half of 2013 in order to detect mutations in the CFTR gene (Transmembrane Conductance Regulator of Cystic Fibrosis). By the method of the ARMS-PCR (Chain Reaction Polymerase-system amplification refractory mutation), 28 samples were analyzed, finding that the two mutations were 21,42% and 32,21% this mutation. The prevalence of DF508 in Peru is relatively low (31,30%) compared to the Latin American average (43,54%). On the contrary the peruvian patients presented a significant rate of G542X (7.40 %) in comparison with the Latin American (5,10 %).

---

1.- Universidad Nacional de Tumbes; titonesherm@hotmail.com

2.- Inca Biotec SAC; diringer@yahoo.fr

## Introducción

La Fibrosis Quística (F.Q.) es la enfermedad genética, provocada por mutaciones recesivas en el gen de la C.F.T.R. (Regulador de la Conductancia Transmembrana de la Fibrosis Quística). Este gen codifica una proteína transmembrana que controla el transporte de cloro y regula indirectamente el intercambio de sodio entre la célula y el medio extracelular. La F.Q. se expresa solo en los pacientes que posean dos alelos del C.F.T.R. mutados (generalmente heredados de los padres). Los defectos de la C.F.T.R. inducen la acumulación de cloro y sodio, en las células epiteliales de los órganos que producen secreciones mucosas como pulmones, páncreas, hígado, intestinos, conductos deferentes, glándulas sudoríparas. Las importantes concentraciones en iones intracelulares inducen la entrada de agua en las células por ósmosis, resultando en un moco deshidratado y espeso en estos órganos. Esta alteración, provoca disfunciones digestivas severas y acumulación de secreción mucosa en las vías respiratorias lo que se traduce en déficit de crecimiento y de peso, bronquitis, rinitis, cirrosis, diabetes, esteirilidad y lo que es más importante, disminución de la función pulmonar.

El diagnóstico inicial de la F.Q. puede realizarse con el análisis de la Tripsina inmuno reactivo (I.R.T.) en los recién nacidos. Los pacientes que presentan tasas anormalmente elevadas de tripsina en la sangre al nacer o que muestran un cuadro clínico respiratorio o digestivo parecido a los mencionados son evaluados por la prueba del sudor. Esta prueba de referencia para el diagnóstico final, analiza la concentración de sales en el sudor que es anormalmente elevada en los pacientes con F.Q. Una vez detectada la enfermedad, el diagnóstico final se realiza con la identificación de las mutaciones del gen C.F.T.R. por técnicas de biología molecular. La dificultad reside en que se ha reportado más de 1900 mutaciones y que sus prevalencias varían en función de los orígenes étnicos del paciente además de mutaciones específicas a ciertas regiones (Dequeker *et al*; 2009). El campo del diagnós-

tico ha evolucionado en los últimos años con el avance tecnológico. Desde 1988, año del descubrimiento de la primera mutación de la C.F.T.R. (del 508) se han determinado más de 1900 mutaciones (Castellani *et al*; 2008). Una amplia mayoría de los estudios han sido realizados en países del Norte (Estados Unidos y Unión Europea).

Las investigaciones demostraron que existe una gran variabilidad de prevalencia de las mutaciones en función del origen étnico, con algunas mutaciones que son específicamente locales y hasta presentes solamente en los miembros de una sola familia. Muy pocas publicaciones tratan de la identificación y de la prevalencia de las mutaciones en América latina y son generalmente restringidas a números no mayores a 30 mutaciones ofrecidas por los kits comerciales (Raskin *et al*; 1993, Morales-Machin *et al*; 1997, Restrepo *et al*; 2000, Keyeux *et al*; 2003, Valle *et al*; 2007, Moya-Quiles *et al*; 2009, Lay-Son *et al*; 2011.). Estos kits comerciales son diseñados para identificar hasta el 90% de las mutaciones en poblaciones noreuropeas o norte americanas, pero identifican difícilmente más del 50% de las mutaciones Latinoamericanas (Perez *et al*; 2007).

Existen dos grandes vías para identificar las anomalías del gen C.F.T.R, la primera consiste en buscar mutaciones específicas conocidas. Las primeras investigaciones, iniciaron con la utilización de técnicas de tipo Reacción en Cadena de Polimerasa (P.C.R.) y secuenciación o variantes (Sherlock *et al*. 1998, Dequeker *et al*; 2009). Rápidamente otras técnicas las suplantaron (Tomaiuolo, Spina and Castaldo 2003), en particular la P.C.R.-Amplification Refractory Mutation System (A.R.M.S-P.C.R) (Ashavaid *et al*; 2005, Grody, Cutting and Watson 2007). Esta última técnica es particularmente interesante por ser rápida, barata y requerir equipamientos básicos de biología molecular. Esta técnica esta implementada como rutina en el diagnóstico de primera línea de las mutaciones más comunes en numerosos laboratorios de referencia. En el es

tudio se propuso implementar Técnicas de A.R.M.S-P.C.R. en el Diagnóstico de Fibrosis Quística.

La segunda vía consiste en técnicas de barrido del gen C.F.T.R, lo que permite identificar las mutaciones más raras. La mejor opción residiría en la secuenciación completa del gen C.F.T.R, sin embargo el importante tamaño de este gen (4,5Kb post episaje) y el costo elevado de la secuenciación son limitantes a corto plazo. Una alternativa ventajosa reside en el análisis de alta resolución de la curva de disociación (H.R.M.A) que permite encontrar la posición de la mutación en el gen C.F.T.R y secuenciar una región limitada (Montgomery *et al.*, 2007). Los especialistas de esta técnica ahora mundialmente difundida son equipos Franceses, liderados por el Dr. Ferec (Audrezet *et al.*; 2008).

Los pacientes con F.Q. exhiben un promedio de vida de 38 años en los Estados Unidos o la Unión Europea, mientras que raramente superan algunos años sin tratamientos adecuados (Hoffman and Ramsey 2013). En el Perú, dos hospitales de Lima atienden a

todos los pacientes del país con F.Q. (el Instituto Nacional de Salud del Niño y el Hospital Nacional E. Rebagliatti Martins. Según las prevalencias disponibles para Latinoamérica, entre 60 y 150 niños nacen cada año con F.Q. en el Perú. El servicio de seguimiento de F.Q. del Hospital Rebagliatti, creado hace 12 años solo cuenta con alrededor de 30 pacientes de los cuales apenas 3 son mayores de edad. En el Instituto Nacional de Salud del Niño, el servicio atiende a cerca de 30 pacientes que son menores de edad en su gran mayoría. Esto demuestra que muchos pacientes con F.Q. no son identificados.

El estudio se propuso desarrollar las biotecnologías médicas en la Universidad Nacional de Tumbes, utilizando la Fibrosis Quística como modelo para desarrollar tecnologías de diagnóstico de anomalías genéticas. Así como Implementar Técnicas de P.C.R-ARMS en el Diagnóstico de Fibrosis Quística, e identificar las mutaciones del gen C.F.T.R con técnicas de H.R.M por P.C.R en tiempo Real en los pacientes con Fibrosis Quística en el Perú.

## Material y Métodos

Para tomar contacto con la población, en un primer momento, se realizó una sensibilización de los padres de pacientes con F.Q. a través reuniones y conferencias en Lima en el Hospital Nacional E. Rebagliatti con presencia de los médicos pediatras. Luego se reveló la información a través de las redes sociales, del sitio web de la asociación Fibrosis Quística Perú (F.I.Q.U.I.-PERÚ) y de los médicos, que contactaron directamente los padres de los pacientes y les explicaron sobre la importancia de participar.

Durante todo el proyecto, un gran esfuerzo fue realizado para preservar las normas éticas así como los derechos de los pacientes con F.Q. Por ello se elaboraron cartas de información y de compromiso de participación, así como consentimientos informados para participaren el estudio. Previo al muestreo, los padres de familia firmaron una de

claración de consentimiento de participación y la carta de aceptación de toma de muestra de sangre.

Muestra y Muestreo: El análisis fue dirigido exclusivamente a los pacientes con F.Q. diagnosticado mediante un cuadro clínico característico y un diagnóstico positivo a la prueba del sudor. Las muestras fueron 2-4 ml de sangre fresca colectadas en tubos *vacutainer* con anticoagulante Etilen Diamino Tetra Acético (E.D.T.A.), conservadas a 4°C hasta su extracción. Estas muestras fueron analizadas a ciego, se llevaron con un código propio a cada paciente al laboratorio mixto de la Universidad Nacional de Tumbes-Inca Biotec SAC. El hospital donde se tomó la muestra tenía la relación código-paciente. Se tomaron muestras por duplicados para cada paciente y analizadas por espectrofotometría. Las muestras que mostraban las mejores concentraciones y cualidades de A.D.N fueron retenidas para el

diagnóstico molecular. Al finalizar el análisis, los resultados fueron enviados a los médicos que se encargan de entregarlos a los pacientes.

La primera etapa de muestreo se inició en la última semana de diciembre del 2013 y terminó la tercera semana del mes de enero. El segundo muestreo inicio desde el 15 de febrero en ambos hospitales. Todos los insumos, materiales y equipamientos pudieron ser adquiridos localmente, a excepción del *Kit* de A.R.M.S.- P.C.R. que no existe en Perú. Al no poder conseguir el *Kit* se diseñó uno propio, en la Universidad Nacional de Tumbes con asesoría del equipo técnico; para el efecto se adaptaron protocolos obtenidos del CHU de Nantes (Francia), de Perone *et al.*, (2010) y Ferrie *et al.*, (1992). Cada reacción fue optimizada para obtener resultados confiables.

Todas las muestras fueron evaluadas con un control positivo que permite: 1) evaluar la calidad del A.D.N extraído (control interno) o 2) por algunas mutaciones de un A.D.N control obtenido de un centro de referencia de F.Q. en Francia que cargaba una mutación conocida (DF508, G551D, G542X, N1303K), que permite validar el diagnóstico. Los tamaños de los amplicones obtenidos fueron estimados gracias al uso de marcadores de peso moleculares (MPM) y fueron del tamaño esperado.

Desarrollo de las pruebas moleculares: La identificación de las mutaciones se realizó en 2 etapas; 1) la extracción de A.D.N y 2) la amplificación de la región de A.D.N. de interés.

Protocolo de extracción de muestras sanguíneas: Existen varios protocolos de extracción de A.D.N., que comprenden etapas de lisis celular, purificación (separación del A.D.N. de los otros compuestos celulares), precipitación y recuperación del A.D.N. total. La evaluación, estandarización y validación de estos protocolos se realizó con muestras de sangre colectadas al azar. Se evaluaron dos protocolos. El protocolo de extracción N°1 permitió la obtención de un "pellet" de A.D.N visible, atestando del éxito de la extracción.

La calidad del A.D.N obtenido fue evaluada mediante espectrofotometría Ultravioleta V. Este análisis se realizó en los ambientes de Inca Biotec SAC en Guayaquil debido a que la Universidad Nacional de Tumbes no dispone de este equipo. Esta prueba permite determinar la concentración y la pureza del A.D.N. extraído (ausencia de contaminantes y residuos) mediante la medición de absorción 230/260 y 260/280nm.

Se realizó una prueba adicional de almacenar la sangre a 4°C por 1, 18 y 25 días antes de realizar la extracción con el fin de evaluar la evolución de la calidad del A.D.N y así definir la ventana de muestreo de los pacientes con F.Q. en los hospitales de Lima.

Análisis por A.R.M.S.- P.C.R. La A.R.M.S.-P.C.R o P.C.R de sistema refractario de amplificación de mutación es una técnica que permite detectar una mutación puntual de A.D.N. y es basada sobre el uso de sondas específicas capaz de reconocer la versión normal o mutada del alelo investigado. El análisis de cada mutación evalúa, en paralelo, la presencia de la secuencia de A.D.N. mutada y normal en dos reacciones distintas, o sea una reacción para averiguar si está presente la secuencia mutada y una reacción para amplificar la secuencia normal.

Existen *kits* comerciales que permiten evaluar de forma simultánea la presencia de varias mutaciones (Multiplex A.R.M.S.-P.C.R.) Estos *kits* permitirían evaluar de forma simultánea hasta 32 mutaciones para diagnosticar el 57% de las mutaciones encontradas en Latinoamérica. La mayoría de estas mutaciones siendo ausentes o a prevalencias inferiores al 0.1%.

La ARMS P.C.R es una técnica simple que permite detectar mutaciones específicas. Por lo tanto esta herramienta no conviene para la búsqueda de mutaciones raras, o nuevas. Para este tipo de diagnóstico se utiliza una técnica más sofisticada y delicada conocida como H.R.M.A que se realiza sobre un equipo de tipo P.C.R en tiempo real.

La qP.C.R o P.C.R en tiempo real es una variante de la P.C.R utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar el fragmento

amplificado. Considera el mismo principio que la P.C.R pero se le adiciona una sustancia fluorescente sola o acoplada a una sonda que emite una luz bajo ciertas condiciones de excitación. La cantidad de luz emitida es proporcional a la aparición de los fragmentos amplificados. La medición de esta luz en un termociclador equipado de sensores para medir fluorescencia permite cuantificar el fragmento en tiempo real, o sea mientras aparecen.

Algunos termocicladores en tiempo real permiten realizar análisis de HRM o sea analizar la curva de disociación en alta resolución. Esta técnica consiste en monitorear las pequeñas variaciones en la desaparición de la fluorescencia durante la fase de desnaturalización (cuando se incrementa la temperatura en el termociclador para abrir las cadenas de A.D.N). En efecto, una

mutación representa un cambio, una adición o una pérdida de nucleótidos en una región de A.D.N dada. Así, una variación en la secuencia del alelo mutado pueda requerir más o menos calorías para abrirse que su homóloga normal. El análisis del HRM del gen C.F.T.R consiste en amplificar las 27 regiones codantes del gen (2 sondas por región) y de analizar los perfiles térmicos de los fragmentos amplificados. Las anomalías son detectadas y su perfil permite identificar la mutación. Se recomienda secuenciar la región sospechosa por seguridad.

Fue objetivo del estudio demostrar que esta técnica es aplicable localmente en la Universidad Nacional de Tumbes. Para ello se consideró realizar una amplificación utilizando como modelo la mutación DF508 como prueba de concepto.

## Resultados

Los ratios de absorbencia a 260/280nm y 260/230nm de soluciones de A.D.N provenientes de muestras de sangre extraídas

después de diferentes tiempos de almacenamiento, se representa en la Tabla 1.

Tabla 1. Tiempo de almacenamiento, concentración y cuantificación en el espectrofotómetro de las muestras usadas como prueba para evaluar la evolución de la calidad del A.D.N.

Muestra	Tiempo almacén	ug/ml	A260/280	A260/230
Muestra 1	25 días	611	1.83	2.27
Muestra 2	25 días	377	1.78	2.17
Muestra 3	18 días	355	1.79	2.29
Muestra 4	1 día	285	1.96	2.38
Muestra 5	1 día	718	1.91	2.42
Control Extracción	Mismo día	-12	----	----

Los ratios de absorbencias a 260/280nm variaron entre 1.78 (25 días) y 1,96 (1 día) lo que indica una buena calidad de extracción. Así mismo, ratios de absorbencias a 260/230nm entre 2 y 2.4 son consideradas como aptos para la P.C.R.

Se seleccionaron las 10 mutaciones puntuales más representadas de aquellas referidas en la literatura científica para Latinoamérica y en países vecinos directos al Perú. Como se indica en la Tabla 2. En éstas mutaciones permiten, en teoría, identificar 55,9% de las mutaciones en comparación con el

kit comercial de 30 mutaciones que permite determinar 57% de las mutaciones. Ello debido a que muchas mutaciones presentan prevalencia de menos de 0,1%.

Las encuestas realizadas entre hospitales y laboratorios farmacológicos mostraron que la población total de pacientes con F.Q. atendida en el Perú está compuesta de 49 pacientes. De estos pacientes, 6 habían realizados sus análisis de mutaciones en el extranjero (EE.UU., Chile y Francia), como se indica en la Tabla 3.

Tabla 2. Prevalencia de las mutaciones más frecuentes del gen C.F.T.R en América latina.

Tipo de Mutación	Prevalencia de la mutación		
	América latina	Chile	Ecuador
<b>DF 508</b>	46,70%	39,30%	31,40%
<b>621+1G&gt;T</b>	0,16%	NA	NA
<b>G551D</b>	0,14%	NA	NA
<b>N1303K</b>	1,65%	1,80%	1%
<b>G542X</b>	5,10%	5,53%	2%
<b>3659 del C</b>	0,09%	NA	NA
<b>1717-1G</b>	0,30%	NA	NA
<b>W1282X</b>	1,13%	3,17%	NA
<b>R553X</b>	0,50%	NA	NA
<b>R1162X</b>	0,01%	1,20%	NA
<b>Promedio</b>	<b>55,9%</b>	<b>51,0%</b>	<b>34,40%</b>

NA: No analizado o igual a 0.

Tabla 3. Mutaciones del C.F.T.R de los pacientes peruanos con Fibrosis Quística diagnosticados al extranjero.

Paciente	Mutación Alelo 1	Mutación Alelo 2
1	DF508	R1162X
2	DF508	p.Q220X
3	DF508	G551D.
4	DF508	F57L
5	DF508	C.1116+2T>C
6	DF508	2789+5G>A

El resumen del diagnóstico de los 28 pacientes se presenta en la Tabla 4.

De las 10 mutaciones evaluadas, 2 fueron encontradas, la DF508 y la G542X. Se pudo encontrar 2 mutaciones en 6 de 28 pacientes (21,42%) y al menos 1 mutación en 9 de 28 (32,21%) pacientes. Puesto en análisis por cromosoma se ha analizado 56 alelos diferentes.

A partir de estos resultados, se evaluó la factibilidad de realizar análisis por H.R.M.A sobre la mutación DF508, en pacientes homocigotos (DF508/DF508) y heterocigotos composite (DF508/normal).

La muestra 1 corresponde a 1 paciente que carece de la mutación DF508; Las muestras

2, 3, 4 corresponden a A.D.N de pacientes homocigotos con la mutación DF508; la muestra 5 corresponde a un A.D.N de paciente heterocigoto (una mutación DF508 y un alelo normal). En la Figura 1, se puede apreciar las diferencias de perfiles entre las muestras negativas, las muestras homocigotas y la muestra heterocigota.

Para facilitar la lectura, se removió del programa los 2 controles negativos obteniendo el gráfico, que se presenta en la Figura 2. Las pequeñas diferencias observadas en la parte derecha del gráfico corresponden a ligeras diferencias de temperaturas de desnaturalización.

Tabla 4 Resumen del diagnóstico de los 28 pacientes analizados para las 10 mutaciones evaluadas.

<b>Código de la muestra (sangre)</b>	<b>Resultado Alelo 1</b>	<b>Resultado Alelo 2</b>
211105 EPG	DF508	DF508
3000109-GCS 14/01/14	DF508	G542X
210305 BVC	DF508	DF508
231004 SHJ	DF508	ND
08032011-MVA	DF508	ND
060204 JGR	DF508	ND
050606-PARA	ND	ND
061200 WCA	ND	ND
040812 MMF	DF508	DF508
291002-CVN	ND	ND
16092010-CAQ	ND	ND
140101-CRC	DF508	DF508
23098 FDO	ND	ND
24062001-PDR 7/01/2014	DF508	ND
050701 REV	ND	ND
MLS 161195	ND	ND
AXMC 230403	ND	ND
F. A. A.	G542X	ND
Female NBMF 291011	ND	ND
Female TRKA 310702	DF508	ND
Female RQGA 230308 27/01/2014	ND	ND
Male GPNN 10061985 T.M 11/02/14	ND	ND
APGM 27062005 DOB:Q 7/Jun./2005 05/Feb./14	ND	ND
LDPL100304 DOB 10/03/04 T.M:22/01/14	DF508	ND
M. C. V. V. 03/02/14	DF508	G542X
S. P. A. V. 03/02/14	G542X	ND
Á. F. R. 20/02/14	ND	ND
25051000 GSJ	G542X	ND
<b>Total</b>	<b>15/28</b>	<b>6/28</b>

ND: No determinado

Tabla 5. Comparación de las prevalencias de las mutaciones del gen C.F.T.R de los pacientes peruanos diagnosticadas con las prevalencias de pacientes de Chile, Ecuador y América latina.

<b>Tipo de Mutación</b>	<b>Prevalencia de la mutación por alelo</b>			
	<b>América latina</b>	<b>Chile</b>	<b>Ecuador</b>	<b>Perú</b>
<b>DF 508</b>	46,70%	39,30%	31,40%	32,4% (22/68)
<b>621+1G&gt;T</b>	0,16%	NA	NA	0%
<b>G551D</b>	0,14%	NA	NA	0,15% (1/68)
<b>N1303K</b>	1,65%	1,80%	1%	0%
<b>G542X</b>	5,10%	5,53%	2%	7,4% (5/68)
<b>3659 del C</b>	0,09%	NA	NA	0%
<b>1717-1G</b>	0,30%	NA	NA	0%
<b>W1282X</b>	1,13%	3,17%	NA	0%
<b>R553X</b>	0,50%	NA	NA	0%
<b>R1162X</b>	0,01%	1,20%	NA	0,15% (1/68)
<b>Cobertura</b>	55,9%	51,0%	34,4%	42,6%

NA: No analizado o igual a 0.

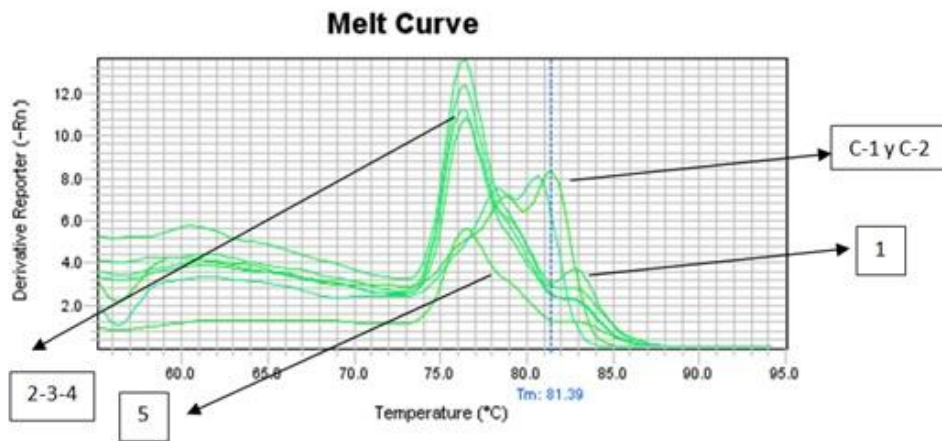


Figura 1. Perfiles de las temperaturas de disociación de A.D.N; controles, normal, heterocigotos y homocigotos para la mutación DF508 del de la C.F.T.R adquiridas por H.R.M.A.

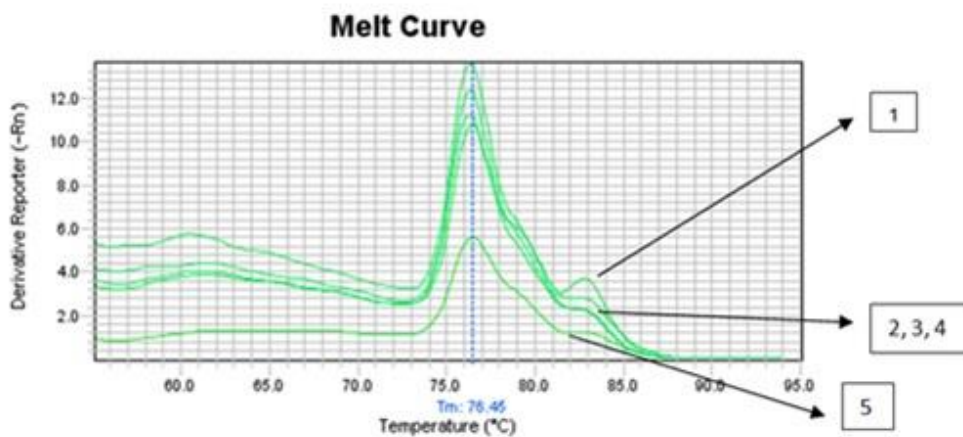


Figura 2. Perfiles de las temperaturas de disociación de A.D.N, normal, heterocigotos y homocigotos para la mutación DF508 del de la C.F.T.R adquiridas por H.R.M.A.

## Discusión

La Fibrosis Quística es una enfermedad compleja, multidisciplinaria por requerir especialistas en campos de Genética, Patología-Clínica, Microbiología, Fisioterapia, nutrición y es motivo de profundas investigaciones en el mundo. Además, la F.Q. es una enfermedad mal diagnosticada y mal tratada en el Perú en comparación con los países del Norte o con países vecinos como Argentina, Brasil y Chile. El atraso del país resulta de su carencia en unidades de diagnóstico genético para identificar los pacientes y de equipos biomédicos y personal especializados en el diagnóstico de F.Q.; dos componentes esenciales para prevenir la enfermedad y prolongar la esperanza de vida de los pacientes.

Con relación a las 10 mutaciones seleccionadas, basadas en la literatura científica, se debe acotar que las prevalencias pueden variar fuertemente de un país a otro como es el caso de Ecuador con 34,4% de las mutaciones identificadas, debido a la gran variabilidad geográfica-étnica de las mutaciones. Actualmente en Perú, sólo se han realizado análisis puntual de un grupo de mutaciones. Vela en el 2002 y Aguirre en el 2001 analizaron la incidencia de una sola mutación (DF508) en tres pacientes y doce pacientes, respectivamente.

Todas de las muestras fueron evaluadas con un control positivo que permite evaluar la calidad del A.D.N. extraído (control inter



no) o por algunas mutaciones un A.D.N control obtenido de un centro de referencia de F.Q. en Francia que cargaba una mutación conocida (DF508, G551D, G542X, N1303K) que permite validar el diagnóstico.

Los tamaños de los amplicones obtenidos fueron estimados gracias al uso de marcadores de peso moleculares (MPM) y fueron del tamaño esperado.

Se logró recuperar 28 muestras de sangres de los 49 pacientes con F.Q. presentes en Perú. En los pacientes faltantes no fue posible la toma de muestras (pacientes de provincias). Este kit pudo encontrar 2 mutaciones en 6 de los 28 pacientes (21,42%) y al menos 1 mutación en 9 de 28 (32,21%) pacientes. Al contrario, no se pudo diagnosticar mutaciones en 13 de 28 pacientes (46,4%).

A nivel de alelos, pudimos haber diagnosticado 29 de 68 alelos o sea el 42,6% de los alelos totales. La compilación de los resultados de análisis y resultados de encuestas indica que la mutación la más común es la DF508 con 32,4% (22/68), la G542X con 7,4%, y las mutaciones G551D, R1162X, F57L, p.Q220X, C.1116+2T>C, y 2789+5G>A con 0,15%. Es importante resaltar que las mutaciones G551D, R1162X diagnosticadas

en otros laboratorios eran contempladas dentro del kit de ARMS P.C.R de la Universidad Nacional de Tumbes.

En comparación con los países latinoamericanos vecinos, Perú tiene una prevalencia de DF508 relativamente baja en comparación con el promedio latinoamericano (43,54%) o concretamente con países como Argentina (59,15%), Uruguay (56,58%), Brasil (43,06%) o Chile (39,30%). Perú tiene una prevalencia de DF508 similar a Cuba (34,03%), Ecuador (31,37%) y muy superior a Costa Rica (22,92%). Al contrario, Perú muestra una prevalencia superior de G542X comparado con Argentina (4,9%), Brasil (5,33%), Chile (5,55%) Ecuador (1,96%), similar a la de Uruguay (7,89%) y muy inferior a Costa Rica que presenta una tasa record a nivel mundial de 25% (Perez *et al.*, 2007).

La cobertura total del kit utilizado en esta investigación presenta una prevalencia muy baja si se considera que el mismo kit de 10 mutaciones permitiría identificar 87,8% de las mutaciones en el norte de Europa. Estos resultados confirman que muchas mutaciones presentes en la población peruana son probablemente muy raras y difíciles a diagnosticar sin usar técnicas de barrido de A.D.N.

### Conclusiones

1. Se diagnosticaron las 10 mutaciones más frecuentes del C.F.T.R en los países de Latinoamérica, en 65,1% de los pacientes con Fibrosis Quística atendidos en Perú.
2. Se encontraron las dos mutaciones en 6 de los 28 pacientes (21,42%) y al menos una mutación en 9 de 28 pacientes (32,21%). Sin embargo, no se pudo diagnosticar mutaciones en 13 de 28 pacientes (46,4%).
3. La mutación más común fue la DF508 con 32,4% (22/68), la G542X con 7,4%, y las mutaciones G551D, R1162X, F57L y p.Q220X C.1116+2T>C, y 2789+5G>A con 0,15%.
4. En Perú se presenta una prevalencia de DF508 que es relativamente baja (32,4%) en comparación con el promedio latinoamericano (43,54%). Al contrario los pacientes peruanos presentan una tasa importante de G542X (7,4%) en comparación con sus vecinos latinoamericanos (5,1%).

### Referencias Bibliográficas.

Ashavaid, T.F, Kondkar A.A., Dherai A.J., Raghavan R., Udani S.V., Udwadia Z.F., Desai D., 2005 "Application of multiplex ARMS and

SSCP/HD analysis in molecular diagnosis of cystic fibrosis in Indian patients." *J. Mol. Diagn.* 9 (2): 59-66.

- Audrezet. M.P. Dabricot A., Le Marechal C., Ferec C., 2008. "Validation of High-Resolution DNA Melting Analysis for Mutation Scanning of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (C.FTR) Gene." *J. Mol. Diagn.* 10(5): 424-434.
- Castellani, C., H. Cuppens, M. Macek, J. Cassiman, E., Kerem, P. Durie, E. Tullis, B.M. Assael B., C. Bombieri, A. Brown, T. Casals, M. Claustres, G. Cutting, E. Dequeker, J. Dodge, I. Doull, P. Farrell, C. Ferec, E. Girodon, M. Johannesson, B. Kerem, M. Knowles, A. Munck, P. Pignatti, D. Radojkovic, M. Schwarz, M. Stuhmann, M. Tzetis, J. Zielenski, J. Elborn, 2008. "Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice" *J. Cyst. Fibros.* 7(3): 179-196.
- Dequeker E., M. Stuhmann, M.A. Morris, C. Castellani, M. Claustres, H. Cuppens, M. Des Georges, C. Ferec, M. Macek, P. F. Pignatti H. Scheffer, M. Schwartz, M. Witt. M. Schwarz, E. Girodon. 2009. "Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and C.FTR-related disorders - updated European recommendations." *Eur. J. Hum. Genet.* 17(1): 51-65.
- Ferrie R., M. Schwarz, N. Robertson, S. Vaudin, M. Super, G. Malonej, S. Little. 1992. "Development, Multiplexing, and Application of ARMS Tests for Common Mutations in the C.FTR Gene." *Am. J. Hum. Genet.* 51(1): 251-262.
- Grody W., G. Cutting, M. Watson. 2007. "The Cystic Fibrosis mutation "arms race": when less is more." *Genet. Med.* 9(11): 739-44.
- Hoffman L., B. Ramsey. 2013. "Cystic fibrosis therapeutics: the road ahead." *Chest* 143(1): 207-13.
- Keyeux G., C. Rodas, T. Bienvenu, P. Garavito, D. Vidaud, D. Sanchez, J. Kaplan and G. Aristizabal. 2003. "C.FTR mutations in patients from Colombia: implications for local and regional molecular diagnosis programs." *Hum. Mutat.* 22(3): 259.
- Lay-Son G., A. Puga, P. Astudillo and G. Repetto. 2011. "Cystic fibrosis in Chilean patients: Analysis of 36 common C.FTR gene mutations." *J Cyst. Fibros.* 10(1): 66-70.
- Montgomery J., C. Wittwer, J. Kent and L. Zhou. 2007. "Scanning the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene using high-resolution DNA melting analysis." *Clin. Chem.* 53(11):1891-8.
- Morales-Machin A., L. Borjas-Fajardo, L. Pineda-Del Villar, M. Prieto-Carrasquero, S. González, M. Gutiérrez, W. Delgado-Luengo, F. Alvarez, H. Barrera-Saldana. 1997. "Diagnostico molecular prenatal de fibrosis quística. Reporte de tres casos." *Invest. Clin.* 38(3): 145-53.
- Morales-Machin A., L. Borjas-Fajardo, L. Pineda, S. Gonzalez, W. Delgado, W. Zabala, E Fernandez. 2004. "Frecuencia de la mutación F508 en pacientes venezolanos afectados con fibrosis quística." *Invest. Clin.* 45(2): 121-130.
- Moya-Quiles M., G. Glover, P. Mondejar-Lopez, M. Pastor-Vivero, A. Fernandez-Sanchez, M. Sanchez-Solis. 2009. "C.FTR H609R mutation in Ecuadorian patients with cystic fibrosis." *J. Cyst. Fibros.* 8(4): 280-281.
- Perez M., M. Luna, O. Pivetta and G. Keyeux. 2007. "C.FTR gene analysis in Latin American CF patients: heterogeneous origin and distribution of mutations across the continent." *J. Cyst. Fibros.* 6(3): 194-208.
- Perone C., G. Medeiros, D. del Castillo, M. de Aguiar and J. Januário. 2010. Frequency of 8 C.FTR gene mutations in cystic fibrosis patients in Minas Gerais, Brazil, diagnosed by neonatal screening." *Braz J Med Biol Res.* Volume 43(2) 134-138
- Raskin S., J. Phillips, M. Krishnamani, C. Vnencak - Jones, R. Parker, T. Rozov, J. Cardieri, P. Marostica, F. Abreu and R. Giugliani. 1993. "DNA analysis of cystic fibrosis in Brazil by direct P.C.R amplification from Guthrie cards." *Am. J. Med. Genet.* 46(6): 665-9.
- Restrepo C.M., L. Pineda, A. Rojas-Martinez, C. Gutierrez, A. Morales, Y. Gomez, M. Villalobos, L. Borjas, W. Delgado, A. Myers and A. Barrera-Saldana. 2000. "C.FTR mutations in three Latin American countries." *Am. J. Med. Genet.* 91(4): 277-279.
- Tomaiuolo R., M. Spina and G. Castaldo. 2003. "Molecular diagnosis of cystic fibrosis: comparison of four analytical procedures." *Clin. Chem. Lab. Med.* 41(1): 26-32.
- Valle E., R. Burgos, J. Valle, B. Egas and Ruiz-J. Cabezas. 2007. "Analysis of C.FTR gene mutations and cystic fibrosis incidence in the Ecuadorian population." *Invest. Clin.* 48(1): 91-98.