

Detección de mutaciones en pacientes cubanos con fibrosis quística

✉ Teresa Collazo, Yaixa Piloto, Yulia Clark, Ana M Bofill, Manuel Gómez, Yadira Hernández

Centro Nacional de Genética Médica, ISCM-Habana, Cuba
Ave. 30 Esq. 146 No. 3102, Playa 16, La Habana, Cuba
E-mail: tcollazo@infomed.sld.cu

RESUMEN

La fibrosis quística es la enfermedad autosómica recesiva más frecuente en poblaciones caucásicas. En Cuba, 1 de cada 5000 recién nacidos están afectados. El gen regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (*cftr*) fue clonado en 1989 e identificada la mutación principal F508del. Desde entonces más de 1400 mutaciones diferentes en el gen *cftr* han sido descritas. La población cubana es muy heterogénea para las mutaciones del gen *cftr*. En el presente estudio se emplearon dos técnicas de tamizaje: electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE) y polimorfismo conformacional de simple cadena (SSCP) para la detección de cambios en la secuencia del gen *cftr*. Se detectaron 9 mutaciones diferentes en los pacientes estudiados y 4 cambios polimórficos en la secuencia nucleotídica, previamente descritos.

Palabras clave: Fibrosis quística, polimorfismo conformacional de simple cadena, electroforesis en gel de gradiente desnaturante

Biotecnología Aplicada 2008;25:345-349

ABSTRACT

Detection of mutations in Cuban cystic fibrosis patients. Cystic Fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive disease in Caucasian populations, in Cuba 1/5000 newborn is affected. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*cftr*) gene was cloned in 1989 and the most common mutation, F508del was identified. Since then more than 1400 different *cftr* mutations have been described. The Cuban population is highly heterogeneous for the *cftr* gene mutations. Two scanning techniques, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and single strand conformation polymorphism (SSCP), were carried out to detect *cftr* sequence changes. In the present study 9 different mutations were detected in our patients and 4 nucleotide sequence polymorphisms previously described.

Keywords: Cystic fibrosis, single-strand conformation polymorphism, denaturing gradient gel electrophoresis

Introducción

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad autosómica recesiva más frecuente en la población caucásica [1]. En Cuba, la incidencia es de aproximadamente 1 cada 5000 recién nacidos vivos [2], por lo que es considerada un problema de salud.

La enfermedad de referencia está causada por más de 1400 mutaciones en el gen regulador de la conductancia de transmembrana de la fibrosis quística (*CFTR*) [3]. Si bien existe una mutación mayoritaria F508del, presente en un promedio del 67% de los alelos de FQ analizados a nivel mundial [4], las demás mutaciones poseen frecuencias marcadamente inferiores. Solo un grupo no mayor de 20 mutaciones alcanza frecuencias entre 0.1 y 3%, mientras que las restantes son consideradas raras, ya que han sido reportadas solamente en una o dos familias [5].

El número e incidencia de las mutaciones varía de acuerdo con el origen étnico y la localización geográfica de cada población. En poblaciones genéticamente homogéneas como la de judíos Ashkenazi [6] o Huterites [7], el análisis de un pequeño grupo de mutaciones permite la identificación de más del 97% de los alelos mutados; mientras que en poblaciones heterogéneas como la de España [8] o Italia [9], estudios de más de 40 mutaciones permiten la caracterización de apenas el 74% al 78% de los alelos FQ.

La población cubana, al igual que las del sur de Europa, mostró ser altamente heterogénea para las mutaciones del gen *CFTR*. El estudio de F508del y 5 de las mutaciones reportadas como las más frecuentes, permitió detectar el 55.5% de los alelos mutados [10]. Esta información confirmó la enfermedad en estos pacientes y permitió establecer el carácter de portador o afectado en todos los familiares que así lo requirieron. Sin embargo, en una importante proporción de familias, el análisis molecular directo no aportó la información necesaria para el asesoramiento familiar.

Diferentes técnicas han sido diseñadas para la detección de cambios nucleotídicos pequeños, como las simples sustituciones de bases, deleciones o inserciones. Entre las técnicas más utilizadas están: electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE) [11], polimorfismo conformacional de simple cadena (SSCP) y análisis de heterodúplex [12]. Uno de los primeros genes que ha sido extensamente estudiado mediante estos procedimientos es el *CFTR* [13, 14].

Con el objetivo de continuar caracterizando a la población cubana de enfermos, se estandarizaron las técnicas de DGGE y SSCP que permitieron localizar las mutaciones en los diferentes exones y posteriormente identificarlas, de lo contrario no se podría realizar el diagnóstico molecular a las familias afectadas por FQ, de las cuales no se conocía la causa de la enfermedad.

1. Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR. Cystic Fibrosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds.). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8va. ed. New York: Mc Graw-Hill 2001:5121-88.

2. Guerra D. Estudio Genético de Fibrosis Quística. Tesis de Doctor en Ciencias Médicas. Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas Victoria de Girón. La Habana, Cuba; 1984.

3. CF Mutation Data Base. <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>

4. Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Worldwide survey of the DF508 mutation. Report from the Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. *Am J Hum Genet* 1990;47:354-9.

5. Tsui L-C. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:547-53.

6. Abeliovich D, Lavon IP, Lerer Y, et al. Screening for five mutations detects 97% of cystic fibrosis (CF) chromosomes and predicts a carrier frequency of 1: 29 in the Jewish Ashkenazi population. *Am J Hum Genet* 1992;51:951-6.

7. Zielenski J, Fujiwara TM, Markiewicz D, Paradis AJ, Anacleto AI, Richards B, et al. Identification of the M1101K mutation in the *CFTR* gene and complete detection of cystic fibrosis mutations in the Hutterite population. *Am J Hum Genet* 1993;52:609-15.

Materiales y métodos

De todos los casos diagnosticados clínicamente e incluidos en el Registro Nacional de FQ, se seleccionaron 23 muestras al azar para comenzar el estudio. Se distinguieron 2 grupos de pacientes, uno correspondiente a la región occidental (12 pacientes) y otro, a la región oriental del país (11 pacientes), en quienes no se había podido identificar el defecto genético responsable de FQ. Además, se realizó el análisis del exón 10 en 110 pacientes.

La extracción de ADN se realizó por el método de precipitación salina [15] a partir de 10 mL de sangre periférica con EDTA (56 mg/mL) como anticoagulante.

Mediante la técnica de SSCP se analizaron los exones 6a, 7, 10, 13a, 17a, 2, 4, 6b, 19, 1, 16, 22, 24, 13b y 10 del gen *CFTR* y los cebadores utilizados fueron los reportados por Liechti-Gallati *et al.* [16].

Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: 100ng de ADN, 15 pmol/mL de cada cebador, 1 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, 1U de Taq polimerasa, en un volumen final de 25 mL.

La amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 3 min a 94 °C, seguida por 35 ciclos, 20 seg a 94 °C, 30 seg a 55 °C, 30 seg a 74 °C y una extensión final de 5 min a 74 °C.

Después de concluida la reacción, se procedió a mezclar 1µL del producto amplificado con 3 µL de H₂O y 3.5 µL de una solución de bromofenol azul más hidróxido de sodio 10 mM. Se desnaturalizó durante 1 h 30 min a 98 °C y se puso rápidamente en hielo para que no se renaturalizara; se aplicó en un gel de acrilamida comercial, se realizó la electroforesis de cada exón a 600 V con un tiempo de duración de 80 a 120 min y se utilizó en cada corrida un control positivo, el cual presentaba una mutación en ese exón ya identificada. La visualización del ADN se realizó mediante tinción con plata.

El resto de los exones fueron estudiados por la técnica de DGGE, se realizó múltiplex en todos los casos y también se utilizó un control positivo con una mutación conocida en el exón a analizar (Tabla 1), los cebadores utilizados fueron los reportados por Fanen *et al.* [17].

El ADN fue visualizado mediante tinción con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta.

Resultados y discusión

Después de realizado el análisis en todos los exones mediante las técnicas de SSCP y DGGE, en los casos donde se encontró una variación en la corrida electroforética, se pasó a identificar la mutación o el polimorfismo.

En el exón 10 del gen *CFTR* se detectaron 106 variaciones electroforéticas, de las cuales 25 correspondieron a la mutación F508del, y dentro de estas, 7 fueron homocigóticas y 18 heterocigóticas. Se detectaron 2 pacientes portadores de la mutación I507del y 3 patrones anómalos correspondientes a una mutación o polimorfismo aún no identificado, por lo que fue necesario la secuenciación de estas 2 muestras para la identificación del defecto genético (Figuras 1 y 2).

En el exón 10 también se identificaron los polimorfismos 1540A/G, 1525-61 G-A y 1576 G/A, ya descritos en la población española y en otras poblaciones [18]. El polimorfismo 1540A/G se encontró en 56 de los 220 cromosomas analizados, lo

8. Alonso MJ, Heine-Sunyer D, Calvo M, Rosell J, Giménez J, Ramos MD, *et al.* Spectrum of mutations in the CFTR gene in cystic fibrosis patients of Spanish ancestry. *Ann Hum Genet* 2007;71:194-201.

9. Gasparini P, Marigo C, Bisceglia G, Nicolis E, Zelante L, Bombieri C, *et al.* Screening of 62 mutations in the cohort of cystic fibrosis patients from north eastern Italy: their incidence and clinical features of defined genotypes. *Hum Mutat* 1993;2:389-94.

10. Collazo T, Bofill AM, Clark Y, Hernández Y, Gómez M, Rodríguez F, *et al.* Common mutations in Cuban cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros.* 2009;8:47-9.

11. Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS, Myers RM. Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:232-6.

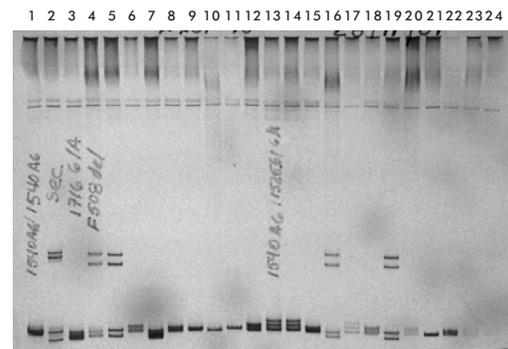


Figura 1. Resultado del SSCP en el exón 10. Corrida electroforética en un gel de acrilamida al 12%. En la carrilera 1 de derecha a izquierda se representa un paciente homocigótico para el polimorfismo 1540AG, en la 2, un patrón anómalo que hay que secuenciar, en la 3, el polimorfismo 1716A/G, la 4 corresponde al control positivo heterocigótico para la mutación F508del. En la 13, 14 y 17 el polimorfismo 1540A/G y 1525-61 y en la 16, un heterocigótico para F508del, en el 5 y 19, patrón anómalo no identificado y el resto no tiene cambios en el exón 10 de CFTR.

Tabla 1: Representación de los múltiplex A, B, C, D y el exón 21 por la Técnica de DGGE

Múltiplex	Exones	Condiciones de RCP	Condiciones de electroforesis
Múltiplex A	11, 14b, 17b	94 °C-5 min, 94 °C-, 1 min, 50 °C-1 min, 72 °C-2 min, 72 °C-7 min (40 ciclos)	Gradiente: 10-60% Tiempo: 150 min Voltaje: 180 V
Múltiplex B	14a, 15, 20	94 °C-5min, 94 °C-, 1 min, 55 °C-1 min, 72 °C-2 min, 72 °C-7 min (40 ciclos)	Gradiente: 10-60% Tiempo: 270 min Voltaje: 180 V
Múltiplex C	3, 12, 23	94 °C-5 min, 94 °C-, 1 min, 55 °C-1 min, 72 °C-2 min, 72 °C-7 min (40 ciclos)	Gradiente: 10-60% Tiempo: 150 min Voltaje: 180 V
Exón 21	21	94 °C-5 min, 94 °C-20 s, 58 °C-30 s, 72 °C-30 s, 72 °C-7min (35 ciclos)	Gradiente: 10-60% Tiempo: 270 min Voltaje: 180 V
Múltiplex E	5, 8, 18	94 °C-5 min, 94 °C-, 1 min, 50 °C-1 min, 72 °C-2 min, 72 °C-7 min (40 ciclos)	Gradiente: 10-60% Tiempo: 150 min Voltaje: 180 V

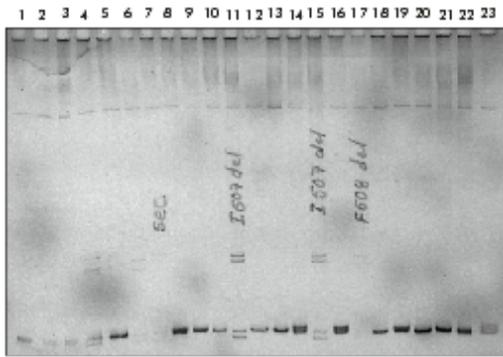


Figura 2. Resultado del SSCP en el exón 10. Corrida electroforética en un gel de acrilamida al 12%. La carrilera 11 corresponde al control positivo I507del. En la carrilera 7 de derecha a izquierda se presenta un patrón no identificado, en la carrilera 15 se presenta un patrón correspondiente a la mutación I507del y en el 17, el patrón correspondiente a la mutación F508del

que representó el 25.5 % y siendo homocigótico en cuatro de los pacientes. Ocho de los casos estudiados resultaron heterocigóticos para F508del. Otro de los polimorfismos detectados fue el 1525-61 G-A, presente en 16 cromosomas para un 7.3 %. El polimorfismo 1576 G/A solo se encontró en 2 cromosomas para el 0.9% (Figura 3).

En el exón 4 (Figura 4), la variación electroforética detectada no coincidió con el control utilizado, por lo que se procedió a realizar la secuenciación mediante el secuenciador automático ABI 377 y se detectó la mutación Y109C, frecuente en la población Suiza y no detectada en la población española [8]. Este paciente portaba además la mutación F508del.

La variación encontrada en el exón 13a coincidió con el control positivo utilizado. Para corroborar que el cambio electroforético se correspondía con la presencia de la mutación 2183 AA/G (figura 5), se realizó una amplificación con los cebadores E13xR2 y E13xD2 [18] La mutación 2183AA/G provoca una terminación prematura del codón 38 en el exón 13, ha sido reportada en Canadá, Italia, Grecia, Bulgaria,

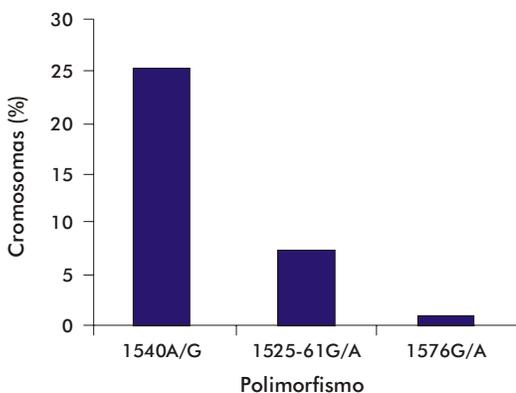


Figura 3. Distribución de los polimorfismos 1540A/G, 1525-61 G-A y 1576 G/A. En el eje de las X se encuentran las variantes polimórficas encontradas y en el eje de las Y, el porcentaje de cromosomas que presentan cada uno de estos polimorfismos

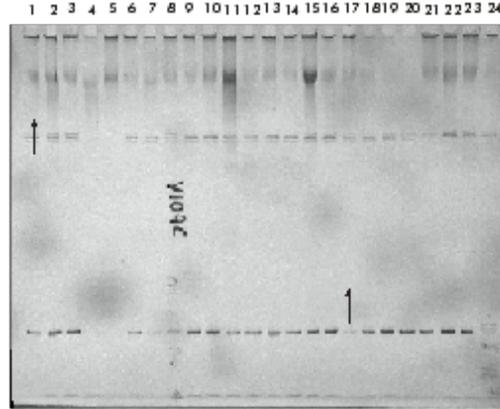


Figura 4. Resultado del SSCP del Exón 4. Corrida electroforética en un gel de acrilamida al 12%. En la carrilera 8 de derecha a izquierda se presenta un patrón de corrida anómalo, que no se corresponde con el control positivo de mutación utilizado en la última carrilera, el resto de las carrileras tienen patrones normales para el exón 4 de CFTR.

Francia, Alemania, Turquía y España; se ha encontrado en heterocigosis con las mutaciones F508del, G542X, G1244E y 2789+5G→A y en todos los casos ha cursado con un fenotipo severo [19]. Este paciente diagnosticado fue heterocigótico compuesto para I507del, variación localizada en el exón 10, y homocigótico para el alelo 7T del IVS8-6T. En la población española y en Turquía también se ha reportado la mutación 2183AA/G asociada al alelo 7T, excepto en 2 pacientes homocigóticos para el alelo 9T. Además, en el estudio de los microsatélites IVS8CA e IVS17BTA se encontró que en la población española esta mutación estaba asociada al haplotipo (16-30) y en Turquía al haplotipo (16-31) y (16-32)[20], y en el caso del paciente cubano tenía el haplotipo (16-31).

En las 23 muestras analizadas por DGGE se localizaron cambios en los exones 17b, 11, 14a, 20 y 21. En las figuras 6 y 7 se presenta la electroforesis de los exones 15, 14a, 20 y 21.

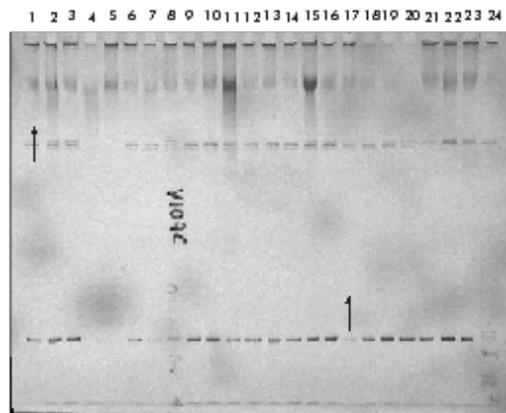


Figura 5. Resultado del SSCP del Exón 13a. Corrida electroforética en un gel de acrilamida al 12%. En la carrilera 11 de derecha a izquierda se presenta un patrón de corrida anómalo que se corresponde con el control positivo utilizado en la última carrilera, los restantes son patrones de corrida normales para el exón 13a de CFTR.

12. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86: 2766-70.

13. Claustres M, Laussel M, Desgeorges M, Giansily M, Culard JF, Razakatsara G, et al. Analysis of the 27 exons and flanking regions of the cystic fibrosis gene: 40 different mutations account for 91.2% of the mutant alleles in Southern France. Hum Mol Genet 1993. 2:1209-13.

14. Chillón M, Casals T, Giménez J, Nunes V, Estivill X. Analysis of the CFTR gene in Spanish population: SSCP-screening for 60 known mutations and identification of four new mutations. Hum Mutat 1994;3:223-30.

15. Miller SA. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988;16:1215-8.

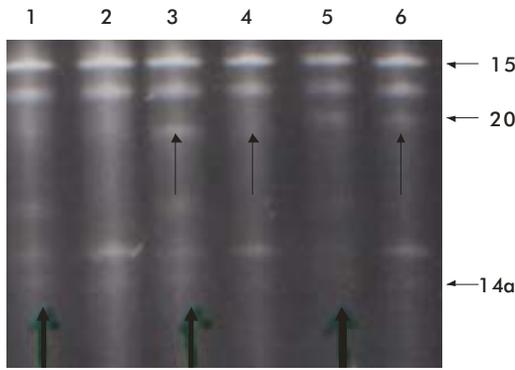


Figura 6. Resultado del Múltiplex B (Exón 15, 14a y 20). Corrida electroforética en un gel de acrilamida desnaturalizante producto de la amplificación de los exones 15, 20 y 14a de CFTR. En el exón 20 se observan cambios en las carrileras 3, 5 y 6. En el exón 14a en la 1, 3 y 5. En el exón 15 no hay cambios

En el caso del exón 14a se identificó un cambio correspondiente al polimorfismo 854T y en el exón 20 al polimorfismo 4002A/G. Ambos han sido descritos anteriormente en la población española. En el exón 15 no se detectó ningún cambio en las muestras estudiadas (figura 6).

En el exón 21 (figura 7) se detectó un cambio en la muestra 3 y fue necesario secuenciar, para definir si era una mutación o un nuevo polimorfismo, ya que no correspondía a un patrón electroforético conocido en las poblaciones analizadas con anterioridad.

En la figura 8, se representan los patrones electroforéticos correspondientes a los exones 11, 14b y 17b. En el exón 11 se detectaron las mutaciones R553X y G542X. En los casos en que el patrón electroforético obtenido por DGGE correspondía al patrón de la mutación R553X, se comprobó mediante amplificación con los cebadores EDM y I11R1 reportados por Morral *et al* [21], y en los casos en que correspondía al patrón de la mutación G542X se confirmó mediante el sistema de amplificación refractaria de mutaciones específicas [22].

Dos pacientes resultaron portadores de la mutación R553X y de ellos, uno era heterocigótico compuesto

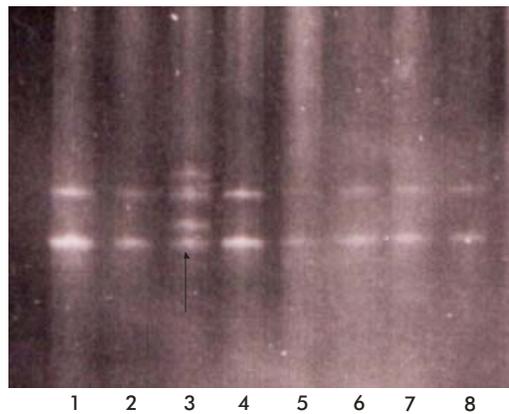


Figura 7. Resultado del DGGE del Exón 21. Corrida electroforética en un gel de acrilamida desnaturalizante, producto de la amplificación del exón 21 de CFTR. En la carrilera 3 se observa un cambio correspondiente a una mutación o polimorfismo de esta muestra en el exón 21 de CFTR

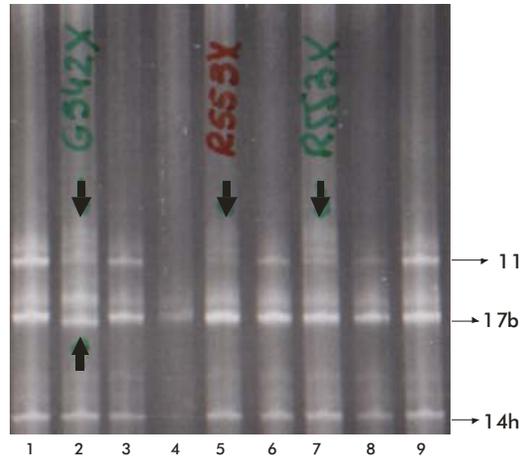


Figura 8. Múltiplex A exón 11, 14b y 17b. Corrida electroforética en un gel de acrilamida desnaturalizante producto de la amplificación de los exones 11, 17b y 14b de CFTR. En la carrilera 2 en el exón 11, hay un cambio electroforético que corresponde con la mutación G542X y en la 5 y 7, otro cambio correspondiente a la mutación R553X en el mismo exón. En el exón 17b en la carrilera 2 hay un cambio correspondiente a la mutación 3272-26G→A. En el exón 14b no se observa ningún cambio

con F508del, en el caso del heterocigótico para G542X se encontraba en el otro alelo la mutación 3272-26A→G. En el exón 14b no se encontró cambio en ninguna de las muestras analizadas.

En el exón 17b, utilizado como control positivo una muestra con la mutación 3272-26A→G, fue detectado un paciente con la misma variación electroforética, la cual fue corroborada mediante la amplificación de esa región con los cebadores específicos (17bxD1 y E17R1) reportados por Amaral *et al* [23]. Esta mutación genera un ARNm con un nucleótido extra y por consiguiente la terminación prematura de la transcripción. Ha sido identificada con anterioridad en pacientes estudiados en Francia, España, Bélgica, Grecia, Alemania y Portugal, y se ha encontrado que portan en el otro alelo, las mutaciones F508del, G542X, N1303K, W846X, entre otras. De forma general, estos pacientes presentan un cuadro clínico severo, exceptuando los heterocigóticos compuestos 3272-26A>G/L206W y 3272-26A>G/P99L [23]. El paciente encontrado portador de esta mutación en la muestra estudiada, tenía en el otro alelo la mutación G542X, lo que se correspondía con un cuadro clínico severo de la enfermedad.

En la tabla 2 se presenta un resumen de todos los cambios detectados, tanto por SSCP como por DGGE y los casos que se concluyeron. De los 23

Tabla 2. Mutaciones detectadas en 6 pacientes por SSCP y DGGE

Pacientes	Exones alterados	Mutaciones encontradas
1	11 y 17a	G542X / 3272-26A→G
2	10 y 11	F508del / R553X
3	10 y 4	F508del / Y109C
4	10 y 13a	I507del / 2183AA/G
5	10 y 14a	Secuenciar
6	10 y 21	F508del / Secuenciar

16. Liechti-Gallati S, Schneider V, Neeser D, Kraemer R. Two buffer PAGE system-based SSCP/HD analysis: a general protocol for rapid and sensitive mutation screening in cystic fibrosis and any other human genetic disease. *Eur J Hum Genet* 1999;7:590-8.

17. Fanen P, Ghanem N, Vidaud M, Besmond C, Martin J, Costes B, *et al*. Molecular Characterization of Cystic Fibrosis: 16 Novel Mutations identified by analysis of the Whole Cystic Fibrosis Conductance Transmembrane Regulator (CFTR) Coding Regions and Splice Site Junctions. *Genomics* 1992;13:770-6.

18. Bozon D, Zielenski J, Rininsland F, Tsui LC. Identification of four new mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene: 1148T, L1077P, Y1092X, 2183AA→G. *Hum Mutat* 1994;3:330-2.

19. Ravnik-Glavac M, Atkinson A, Glavac D, Dean M. DHPLC screening of cystic fibrosis gene mutations. *Hum Mutat* 2002; 19:374-83.

20. Morral N, Nunes V, Casals T, Chillón M, Giménez J, Bertranpetit J, *et al*. Microsatellite haplotypes for cystic fibrosis: mutation frameworks and evolutionary tracers. *Hum Molec Genet*. 1993;2:1015-22.

pacientes estudiados, solo en 6 fueron detectadas las dos mutaciones responsables de FQ, lo que no coincide con los resultados esperados, ya que con las técnicas de DGGE y SSCP se detectan más del 90% de las mutaciones, según lo reportado hasta el momento.

El diagnóstico de fibrosis quística [24-30] se basa en el cuadro clínico multisistémico compatible con la enfermedad, junto con dos o más determinaciones de electrolitos en sudor. Esta es una enfermedad con gran heterogeneidad clínica, con manifestaciones múltiples [24, 31, 32] que varían en su intensidad y evolución de un paciente a otro síntomas y signos, aún en pacientes con el mismo genotipo y de una misma familia. En muchos casos, el diagnóstico se dificulta porque el cuadro clínico respiratorio es similar al de otras afecciones, y en Cuba, las enfermedades respiratorias son muy frecuentes y pueden interferir en el diagnóstico.

Conclusiones

En el año 2000, un grupo de investigadores propusieron la necesidad de revisar el criterio diagnóstico para la

FQ y el dilema de crear distinción entre esta y otras enfermedades con mutaciones del gen CFTR, [25] lo que condujo a una nueva clasificación presentada a la Asociación Internacional de Fibrosis Quística en junio del 2000 en la OMS [33]. A partir de ese momento, la Comisión Nacional de Fibrosis Quística de Cuba reevaluó todos los casos investigados, y después de estudiarlos, los especialistas constataron que de los 23 casos analizados por SSCP y DGGE, solo resultaron fibroquísticos los 6 casos referidos, en los que se detectaron las mutaciones responsables en los 2 alelos del gen. Esto reafirmó la efectividad de la pesquisa y permitió corroborar la existencia de un sobrediagnóstico de FQ en el país.

Agradecimientos

Este trabajo pudo realizarse gracias a la colaboración de la Lic. Dolores Ramos, el Téc. Xavier Jiménez y la Dra. Teresa Casals, quienes permitieron realizar este trabajo en el Centro de Genética Médica y Molecular del Instituto de Investigaciones Oncológicas de Barcelona, España.

21. Morral N, Dörk T, Llevadot R, Dziadek V, Mercier B, Férec C, et al. Haplotype analysis of 94 cystic fibrosis mutations with seven polymorphic CFTR DNA markers. *Hum Mutat* 1996;8:149-59.

22. Newton CR, Graham A, Heplinsol LE, Summers S, Kalsheker N, Smith JC, Marklan AF. Analysis any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 1989;17(7):2503-16.

23. Amaral D, Pacheco P, Beck S, Farinha CM, Penque D, Nogueira P et al. Cystic fibrosis patients with the 3272-26A>G splicing mutation have milder disease than F508del homozygotes: a large European study. *J Med Genet* 2001;38(11):777-82.

24. Abreu e Silva F, Dodge JA. Guidelines for the diagnosis and management of cystic fibrosis. World Health Organization Human Genetics Programme and the International Cystic Fibrosis (Mucoviscidosis) Association. WHO/ICF(M)A

Document. Geneva, Switzerland 1996; Document WHO/HGN/ICF(M)A/GL/96.2.

25. Götz MH. Cystic Fibrosis Literature Review Annual Report. ICF (M) Annual General Meeting. Scientific/Medical Advisory Committee (S/MAC) Report. June 6; 2001. Vienna, Austria.

26. Salcedo A, García G, Antelo MC, Barrio MI, Girón RM. Diagnóstico de la fibrosis quística. *Neumadriid-par*. 1999;2:25-33.

27. Feldmann D, Tamalat A, Boule M. Genotype analysis and phenotypic manifestations of children with intermediate chloride test results. *Chest* 2000;118:1591-9.

28. Ferrer P, Pérez F, Ribes C, Ferrer Calvete J. Enzimas pancreáticas y fibrosis quística. *Acta Pediatr Esp* 1998;56:496-500.

29. Gan KH, Geus WP, Bakker W, Lamers CBHW, Heijerman GM. Genetic and clinical features of patients with cystic fibrosis diagnosed after the age of 16 years. *Thorax* 1995;50:1301-4.

30. Ludwig Neto N. Métodos diagnósticos e screening da Fibrose Cística. En: Rojo M, García E, Bosch C, eds. Libro de conferencias y resúmenes del VIII Congreso Latinoamericano de Fibrosis Quística (Mucoviscidosis) y III Jornada Hispano-latinoamericana de FQ. Octubre 20-23. Palacio de las Convenciones; La Habana, Cuba, 1997:73-5.

31. Pérez J, Pérez E. Antecedentes históricos de la fibrosis quística. En: Dapena FJ, ed. Fibrosis Quística: atención integral, manejo clínico y puesta al día. Granada: Alhulia. 1998: 23-9.

32. Njaander N. Urinary incontinence in females with cystic fibrosis. *IACFA Newsletter* 2001;60:31-5.

33. Dodge JA. Report of a new classification of Cystic Fibrosis and Related Disorders. Addressed to the ICF(M)A. (Types and Aspects). (Mr. Weggen). President's Annual Report. En: Asociaciones Nacionales Miembros de la ICF(M)A 2000.

Recibido en enero de 2008. Aprobado en noviembre de 2008.