



***ANALISIS DE POLIMORFISMOS DEL RECEPTOR BETA 2 ADRENERGICO
EN PACIENTES COLOMBIANOS AFECTADOS POR FIBROSIS QUISTICA***

DAISSY LORENA SANCHEZ PIRAJAN

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE GENETICA

BOGOTA

2010

ANALISIS DE POLIMORFISMOS DEL RECEPTOR BETA 2 ADRENERGICO

EN PACIENTES COLOMBIANOS AFECTADOS POR FIBROSIS QUISTICA

DAISSY LORENA SANCHEZ PIRAJAN

TESIS DE MAESTRIA

DRA. HEIDI ELIANA MATEUS MD, MSc.

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE GENETICA

BOGOTA

2010

2

Nota de Aceptación

Firma Dra. Heidi Mateus

Firma Presidente del Jurado

Firma Jurado

Firma del Jurado

Bogotá, Septiembre de 2010.

Dedicada a Dios y a mi hermosa familia.

Agradecimientos

Agradezco a Dios antes que a nadie, a mis padres por todo el esfuerzo de su vida que me ha permitido estar donde estoy, a mis hermanas por su apoyo incondicional, a mis amigos por su fuerza, a mis compañeros por su paciencia y a mis profesores a quien les debo todo lo que ahora sé y la motivación para no quedarme en ello.

Agradezco a mi compañera de trabajo y amiga Dra. Cladelis Rubio y a todos quienes de una u otra forma tuvieron que ver con este trabajo.

Agradezco a los pacientes que permitieron la realización de esta investigación y para quienes es éste trabajo.

Finalmente, agradezco especialmente a mi directora la Dra. Heidi Mateus por su apoyo incondicional en todo el sentido de la palabra.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCION	17
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
2. JUSTIFICACION	22
3. OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GENERAL	25
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	25
4. MARCO TEORICO	27
4.1 MARCO HISTORICO DE LA FIBROSIS QUÍSTICA	28
4.2 FISIOPATOLOGÍA DE LA FIBROSIS QUÍSTICA	30
4.3 EPIDEMIOLOGÍA	33
4.4 PRESENTACIÓN CLINICA DE LA FIBROSIS QUÍSTICA	36
4.4.1 Enfermedad Pulmonar.	36
4.4.2 Complicaciones del Tracto Gastrointestinal y Páncreas	38

	pág.
4.4.3 Manifestación de la Fibrosis Quística en otros órganos	38
4.5 DIAGNÓSTICO DE LA FIBROSIS QUÍSTICA	39
4.5.1 Técnicas Moleculares Para la Detección de Mutaciones en CFTR	42
4.6 TRATAMIENTO DE LA FIBROSIS QUÍSTICA	43
4.7 CORRELACIÓN ENTRE FENOTIPO Y GENOTIPO PARA FIBROSIS QUÍSTICA	46
4.8 RECEPTOR β- 2 ADRENÉRGICO	52
4.8.1 Activación del Receptor β- 2 Adrenérgico	53
4.8.2 Métodos de Regulación del Receptor β- 2 Adrenérgico	55
4.8.2.1 Desensibilización: Mecanismo regulador de la Señalización	55
4.8.2.2 Regulación Negativa del Receptor: Mecanismo regulador del	
Número de Receptores	56
4.8.3 Polimorfismos del Receptor β2-Adrenérgico	56
4.9 RELACION FIBROSIS QUÍSTICA – RECEPTOR β2-ADRENÉRGICO	59
5. METODOLOGÍA	61
5.1 TIPO DE ESTUDIO	61
5.2 POBLACIÓN DE REFERENCIA	61

	pág.
5.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN	62
5.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	62
5.5 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	63
5.5.1 Estandarización de la Metodología Experimental	64
5.5.1.1 Extracción de ADN	64
5.5.1.2 PCR Alelo Específica	65
○ Estandarización	66
● Estandarización PCR por Componentes	68
▪ PCR Alelo Específica: Polimorfismo p.R16G	68
▪ PCR Alelo Específica: Polimorfismo p.Q27E	70
▪ PCR Alelo Específica: Polimorfismo p.T164I	71
5.5.1.3 Análisis estadístico y Correlación Genotipo-Fenotipo	72
6. RESULTADOS	74
6.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS POBLACIONES ANALIZADAS	74
6.2 ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS p.R16G, p.Q27E Y p.T164I DEL RECEPTOR B2-ADRENÉRGICO	76
6.3 ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS PARA LA POBLACIÓN CONTROL Y DE PACIENTES AFECTADOS POR FIBROSIS QUÍSTICA	81

	pág.
6.4 CORRELACIÓN GENOTIPO DEL RECEPTOR BETA 2 ADRENÉRGICO – FENOTIPO PACIENTES AFECTADOS POR FIBROSIS QUÍSTICA	84
6.4.1 Alelos Polimórficos, Genotipo y Haplotipos vs. Variables Clínicas	84
6.4.2 Alelos Polimórficos, Genotipos y Haplotipos vs. Fibrosis Quística Clásica y No Clásica	88
6.4.3 Alelos Polimórficos, Genotipos y Haplotipos vs. Mutaciones en CFTR	89
7. DISCUSION	91
• GENÉTICA DE POBLACIONES: DISTRIBUCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS p.R16G, p.Q27E Y p.T164I DEL RECEPTOR BETA 2 ADRENÉRGICO	93
• CORRELACIÓN POLIMORFISMOS DEL RECEPTOR BETA 2 ADRENÉRGICO Y FENOTIPO DE LOS PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA	107
• ANÁLISIS DE LOCI GEN ADRB2 Y GEN CFTR: DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO	110
8. CONCLUSIONES	112
9. RECOMENDACIONES	114

	pág.
10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	116

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Clasificación de las mutaciones del gen CFTR según su mecanismo patológico molecular.	32
Tabla 2. Condiciones fisiológicas y Procedimientos técnicos asociados con Falsos positivos y Negativos de la Prueba de Electrolitos en Sudor.	41
Tabla 3. Relación entre Cantidad de Proteína CFTR Funcional y Manifestaciones Clínicas	49
Tabla 4. Primers empleados para la PCR Alelo Específica e Identificación de los polimorfismos p.R16G, p.Q27E y p.T164I del gen ADRB2	66
Tabla 5. Condiciones de Amplificación de PCR para los polimorfismos p.R16G y p.Q27E.	68

pág.

Tabla 6. Estandarización de PCR Alelo específica por Componentes:

Prueba con diluciones de ADN. 69

Tabla 7. Estandarización de PCR Alelo específica por Componentes

para p.R16G: Concentraciones Finales. 70

Tabla 8. Estandarización de PCR Alelo específica por Componentes

para p.Q27E: Concentraciones Finales. 71

Tabla 9. Condiciones de Amplificación de PCR para el polimorfismo

p.T164I. 71

Tabla 10. Estandarización de PCR Alelo específica por Componentes

para p.T164I: Concentraciones Finales. 72

	pág.
Tabla 11. Variables Clínicas asociadas a Compromiso de la Vía Respiratoria de los pacientes con FQ.	75
Tabla 12. Mutaciones encontradas en la Población de Pacientes con FQ.	75
Tabla 13. Lista de Haplotipos Más Probables y sus frecuencias encontradas mediante Arlequin v.3.1.	82
Tabla 14. Análisis estadístico en relación a variables clínicas y alelos Polimórficos.	85

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Esquema Hipotético de la proteína CFTR	30
Figura 2. Cascada de Patofisiología de la Enfermedad Pulmonar en Fibrosis Quística	37
Figura 3. Procedimiento Experimental Sugerido para Genotipificación y Análisis de Población Control y Pacientes Afectados por Fibrosis Quística	64
Figura 4. Polimorfismos p.R16G, p.Q27E, p.T164I encontrados en las poblaciones analizadas	76
Figura 5. Frecuencias Genotípicas en Población Control y en Pacientes	77

pág.

Figura 6. Distribución de los alelos polimórficos p.R16G, p.Q27E y p.T164I en Controles y Pacientes afectados por FQ

79

Figura 7. Distribución de Haplotipos en la Población control y de pacientes Afectados por FQ

83

Figura 8. Porcentajes hallados para los genotipos del polimorfismo p.R16G en tres poblaciones analizadas

96

ANEXOS

	pág.
ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO PACIENTES AFECTADOS	126
ANEXO 2. ASENTIMIENTO TELEFÓNICO PACIENTES AFECTADOS	131
ANEXO 3. CONSENTIMIENTO INFORMADO CONTROLES	134
ANEXO 4. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN POR SALTING OUT	141
ANEXO 5. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN POR PROBE	143
ANEXO 6. GELES POLIMORFISMOS p.R16G, p.Q27E y p.T164I	145

INTRODUCCIÓN

La Fibrosis Quística (FQ) es una enfermedad de herencia autosómica recesiva caracterizada por mutaciones en el gen de la Conductancia Transmembrana de la Fibrosis Quística o CFTR, el cual funciona como un canal de Cloro a nivel celular.

Esta entidad ha sido ampliamente estudiada en diversas poblaciones. Dichos estudios revelan que existe mayor prevalencia en poblaciones caucásicas encontrando que la frecuencia de portadores es de 1 en 25 individuos y la incidencia de la enfermedad es de 1 en 2500 nacidos vivos.

En general, la Fibrosis Quística está clínicamente caracterizada por enfermedad pulmonar obstructiva crónica, insuficiencia pancreática exocrina y electrolitos elevados en sudor, entre otras. Sin embargo, a nivel del gen CFTR, se han hallado a la fecha más de 1500 mutaciones, que al ser estudiadas revelan una alta complejidad y heterogeneidad en el desarrollo de la Fibrosis Quística.

De este modo, en cuanto a la relación genotipo-fenotipo esperada de una enfermedad con herencia mendeliana como lo es la Fibrosis Quística, solamente ha sido posible

establecer una relación directa entre ciertas mutaciones leves y severas en el gen CFTR versus el desarrollo de suficiencia e insuficiencia pancreática, y la ausencia congénita bilateral de vasos deferentes en pacientes del género masculino.

Sin embargo, la alta tasa de mortalidad por Fibrosis Quística se debe a la enfermedad pulmonar obstructiva crónica que se desarrolla en los pacientes afectados por esta patología, en la cual, la correlación con el genotipo no es clara. Sobre este punto se han desarrollado varios estudios, los cuales han intentado establecer asociaciones y relaciones que permitan entender su evolución.

Estos intentos no han sido del todo en vano, por el contrario, han brindado valiosa información capaz de determinar que la Fibrosis Quística a nivel pulmonar se comporta diferente, tal vez de una manera más compleja y similar al desarrollo de enfermedades multifactoriales, ya que a este nivel se ven implicados factores ambientales que explican parte del desarrollo heterogéneo a nivel pulmonar, y también factores genéticos modificadores del desarrollo de FQ.

En cuanto a los factores genéticos adicionales que podrían estar implicados en la variabilidad del compromiso pulmonar se han estudiado genes implicados en la cascada de evolución clínica de la patología, partiendo de aquellos genes involucrados en la defensa inmunológica (p.e. MBL-2, TGF- β 1), genes implicados en el desarrollo de

inflamación (p.e. TNF- α , IL10) y genes involucrados en la pérdida progresiva de la función pulmonar (p.e. NOS3).

También han sido estudiados genes implicados tanto en el funcionamiento normal a nivel pulmonar como en el mantenimiento del tono muscular en las vías respiratorias. Dentro de estos genes se ha propuesto el gen del Receptor Beta 2 adrenérgico (ADRB2), cuya activación precede la formación de cAMP, intermediario de la activación de canales de cloro, como lo es el canal CFTR. Estudios realizados en este gen han demostrado que los polimorfismos p.R16G, p.Q27E y p.T164I pueden alterar su funcionamiento normal como receptor de agonistas endógenos y exógenos. Adicionalmente, dicha variabilidad funcional se ha visto asociada con el desarrollo clínico de pacientes con FQ al evaluar indicadores de función pulmonar, y también con la maduración y activación del canal CFTR a nivel proteico.

Con este orden de ideas, se observa la necesidad de estudiar y determinar si la asociación reportada en estudios previos entre los polimorfismos p.R16G, p.Q27E, p.T164I de este receptor versus la severidad de la Fibrosis Quística se da en pacientes colombianos afectados por FQ, con el fin de desarrollar hipótesis acordes con los resultados y enfatizar en las posibilidades terapéuticas de estos pacientes. Para alcanzar este objetivo se propone un estudio caso- control que permita comparar diferentes variables cualitativas de relevancia para esta investigación.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Fibrosis Quística es una enfermedad letal en la mayoría de los casos. Cerca del 94% de los pacientes que la padecen mueren a causa de la enfermedad pulmonar generada por la deficiencia del canal CFTR.

La enfermedad pulmonar derivada de mutaciones en el gen CFTR no ha sido directamente relacionada con algún grupo específico de mutaciones. Por el contrario, se ha detectado la intervención de múltiples factores en este proceso.

Dentro de los genes propuestos para ser modificadores del curso de la enfermedad respiratoria en la Fibrosis Quística está el gen del Receptor Beta 2 Adrenérgico, caracterizado por actuar en las células del endotelio de la vía respiratoria, mediando procesos de broncodilatación.

Este gen contiene múltiples polimorfismos. Sin embargo, se ha observado que los polimorfismos p.R16G, p.Q27E, p.T164I están asociados con el curso de la Fibrosis Quística y también con la respuesta a tratamiento de pacientes afectados por esta entidad.

En Colombia no han sido reportados estudios de asociación entre este gen como modificador de la Fibrosis Quística, ni con otros genes modificadores.

Es por esto que surge la pregunta: ¿En la población colombiana existe una relación entre los polimorfismos p.R16G, p.Q27E, p.T164I y la severidad de la Fibrosis Quística?

De ser demostrable dicha asociación, podrían establecerse hipótesis en cuanto al procesamiento que se lleva a cabo en las células de la vía respiratoria de estos pacientes con Fibrosis Quística. Adicionalmente se podrían identificar medidas terapéuticas alternativas, con bases científicas, que conduzcan al mejoramiento en cuanto a pronóstico y calidad de vida de estos pacientes aún subestimados en nuestra población.

2. JUSTIFICACIÓN

La Fibrosis Quística es una enfermedad ampliamente estudiada debido al gran impacto que tiene en las poblaciones caucásicas, la heterogeneidad mutacional y diversidad en su distribución a nivel mundial y en cuanto a la variabilidad en el cuadro clínico de los pacientes que la padecen.

A pesar que desde 1989 se identificó con claridad el gen responsable de la Fibrosis Quística, y se determinó el modo mendeliano de herencia de esta enfermedad como de tipo autosómico recesivo, se han encontrado complejas relaciones a nivel fisiológico y molecular que sugieren mayor complejidad en cuanto a su presentación fenotípica; esto implica la adición de otros factores genéticos, epigenéticos y ambientales interactuando con mutaciones de base o polimorfismos en el gen responsable de la Fibrosis Quística que conllevan a un alto grado de heterogeneidad clínica.

El mayor grado de variabilidad fenotípica y el menor grado de asociación genotipo-fenotipo en la Fibrosis Quística se da a nivel del compromiso pulmonar, el cual es la causa principal de muerte en los pacientes afectados.

Es por este motivo que se han investigado otras causas genéticas diferentes a mutaciones en el gen CFTR como modificadores del fenotipo clínico en la Fibrosis Quística las cuales

pueden estar relacionadas con dicha variabilidad. Entre ellos está el gen del Receptor Beta 2 Adrenérgico o ADRB2, el cual ha demostrado tener un papel clave en cuanto a la fisiopatología de las enfermedades respiratorias.

Dentro de los polimorfismos descritos en este gen, tres (p.R16G, p.Q27E, p.T164I) han sido implicados en el curso clínico de la Fibrosis Quística, la maduración y activación del canal CFTR y la respuesta al tratamiento de la enfermedad pulmonar.

Los polimorfismos p.R16G, p.Q27E y p.T164I han sido evaluados en diferentes poblaciones, con resultados significativos para el manejo clínico de la Fibrosis Quística, demostrando la importancia no solo del genotipo del gen ADRB2 sino también de los haplotipos derivados de estos polimorfismos.

En Colombia, los estudios para Fibrosis Quística se han ocupado de la determinación de las mutaciones más frecuentes, lo cual es imperativo para concluir datos epidemiológicos reales en cuanto a esta enfermedad. Actualmente se está llevando a cabo una investigación sobre la relación del gen MBL-2 y la severidad de la Fibrosis Quística, sin embargo, ningún estudio publicado hasta ahora para nuestra población ha revelado asociaciones con otros genes que pueden estar involucrados en la fisiopatología de FQ, lo cual también resulta determinante para el manejo terapéutico y el entendimiento fisiológico de la enfermedad.

Es por esto que se hace fundamental dar un paso adelante en cuanto al conocimiento de relaciones existentes entre genes y sus productos proteicos, en este caso entre el Receptor Beta 2 Adrenérgico y la Proteína CFTR.

Este objetivo solo se puede alcanzar estudiando nuestra población, estableciendo comparaciones entre pacientes con Fibrosis Quística y controles, sus genotipos y haplotipos para el gen ADRB2.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la asociación existente entre los polimorfismos p.R16G, p.Q27E y p.T164I del Receptor β 2 adrenérgico y el grado de compromiso clínico en pacientes con Fibrosis Quística atendidos en la Unidad de Genética de la Universidad del Rosario.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar los polimorfismos del gen ADRB2 presentes en los pacientes afectados por FQ incluidos en el estudio y determinar su genotipo.
- Establecer los polimorfismos del gen ADRB2 presentes en controles sanos analizados y determinar su genotipo.
- Determinar la frecuencia de los polimorfismos genéticos en el receptor β -2 adrenérgico, identificados en pacientes afectados con Fibrosis Quística y controles sanos.
- Comparar las frecuencias de los polimorfismos analizados entre los controles sanos y los pacientes con Fibrosis Quística.

- Correlacionar los polimorfismos encontrados con los hallazgos clínicos y paraclínicos presentes en los pacientes con Fibrosis Quística.
- Comparar las frecuencias de los polimorfismos del Receptor beta 2 adrenérgico obtenidas con las reportadas a nivel mundial.
- Determinar los haplotipos más probables para los pacientes con Fibrosis Quística analizados y para los controles sanos analizados.
- Comparar los datos haplotípicos obtenidos para los pacientes con Fibrosis Quística analizados y los controles sanos estudiados.

4. MARCO TEORICO

La Fibrosis Quística fue descubierta en 1938. Su aparición se vio acompañada de síntomas como mala absorción de grasas y proteínas, esteatorrea, falla del crecimiento e infección pulmonar. Sin embargo, con hallazgos posteriores que indicaban la aparición de secreciones espesas y moco en los ductos de las glándulas secretoras, esta enfermedad comenzó a ser parte de las Mucoviscidosis (Davis, 2006).

Dentro de las Mucoviscidosis, la Fibrosis Quística ha sido clasificada de acuerdo a la sintomatología y la presentación clínica.

De esta forma, se reconoce la Fibrosis Quística clásica con insuficiencia pancreática, la Fibrosis Quística sin insuficiencia pancreática, Fibrosis Quística idiopática, Fibrosis Quística atípica y otras formas de Fibrosis Quística.

La Fibrosis Quística clásica está caracterizada por la triada clásica, dada por aumento de electrolitos en sudor, enfermedad pulmonar obstructiva crónica e insuficiencia pancreática exocrina. Adicionalmente, se pueden presentar complicaciones en otros órganos como hígado, intestino, tracto genital, entre otros (Karczeskia et al, 2006).

Sin embargo, según la Clasificación Internacional de Enfermedades descrita por la Organización Mundial de la Salud para el año 2007, la Fibrosis Quística se puede clasificar en Fibrosis Quística con manifestaciones Pulmonares, Fibrosis Quística con manifestaciones Intestinales, Fibrosis Quística con Otras Manifestaciones y Fibrosis Quística No Especificada (WHO, 1990).

4.1 MARCO HISTÓRICO DE LA FIBROSIS QUÍSTICA

La Fibrosis Quística fue reconocida por primera vez en 1938 cuando a partir de autopsias a niños malnutridos se pudo establecer la diferencia entre esta entidad y la enfermedad celiaca, ya que se pudieron visualizar signos típicos como el moco espeso de las glándulas. En ese año, Anderson introdujo el término de Fibrosis Quística del Páncreas, relacionándolo con la destrucción de la función pancreática exocrina (Davis, 2006).

Posteriormente, en el año 1949, Lowe y colaboradores propusieron que el defecto básico de la Fibrosis Quística debía estar en un solo gen y que la herencia debía ser autosómica recesiva (Rowe et al, 2005).

En 1953, Paul Di Sant Agnese demostró la pérdida hasta de cuatro veces más de sal en el sudor de niños con Fibrosis Quística, herramienta fundamental para el desarrollo posterior de métodos de diagnóstico (Collins, 1992, Davis, 2006).

La técnica diagnóstica por medio de iontoforesis con pilocarpina fue desarrollada y propuesta por Gibson y Cooke en el año 1959 (Gibson et al, 1959, Davis, 2006,). En ella se realiza estimulación de una solución de pilocarpina por medio de electrodos, que a su vez estimula la sudoración; transcurrido un tiempo, se realiza la medición del peso del sudor. Se consideraba una prueba efectiva si el peso era superior a 80 mg y positiva si la concentración era superior a 60 mEq/L (Gibson et al, 1959).

En el año 1983, Paul Quinton logra identificar que el defecto básico en la Fibrosis Quística estaba en el transporte de cloruro, característica que se unió a otros hallazgos realizados por Boucher y colaboradores, y Knowles y colaboradores, quienes encontraron que en los pacientes con Fibrosis Quística había un alto grado de reabsorción de sodio (Davis, 2006).

En 1989, se realizó la clonación e identificación del gen responsable de la Fibrosis Quística, trabajo realizado por Tsui y colaboradores, definiendo así que el gen se encontraba en el cromosoma 7, y que el producto proteico tendría 1480 aminoácidos. De este mismo estudio se derivó la estructura predicha de la proteína CFTR, caracterizada por ser un canal regulado por cAMP (Kerem et al, 1989, Riordan et al, 1989, Rommens et al, 1989 Davis, 2006,).

4.2 FISIOPATOLOGÍA DE LA FIBROSIS QUÍSTICA

La Fibrosis Quística es una entidad de herencia autosómica recesiva generada por mutaciones en el gen del *Canal de Conductancia Transmembrana de la Fibrosis Quística* o CFTR por sus siglas en inglés, el cual está ubicado en el cromosoma 7q31.2 (Kerem et al, 1989, Riordan et al, 1989, Rommens et al, 1989). Este gen tiene una longitud de 250kb y está compuesto por 27 exones. El proceso de transcripción de este gen genera un mRNA de 6.5 kb cuya traducción produce una proteína transmembranal de 1480 aminoácidos que funciona como una canal de cloro (Kerem et al, 1989, Riordan et al, 1989, Rommens et al, 1989, Gallati, 2003, Davis, 2006,).

Esta proteína está compuesta por dos dominios de unión a nucleótidos (NBF1 y NBF2), dos dominios transmembranales conformados cada uno por seis α -hélices (MSD1 y MSD2) y un dominio regulador R (Figura 1) (Gallati, 2003, Rowe, S., et al., 2005).

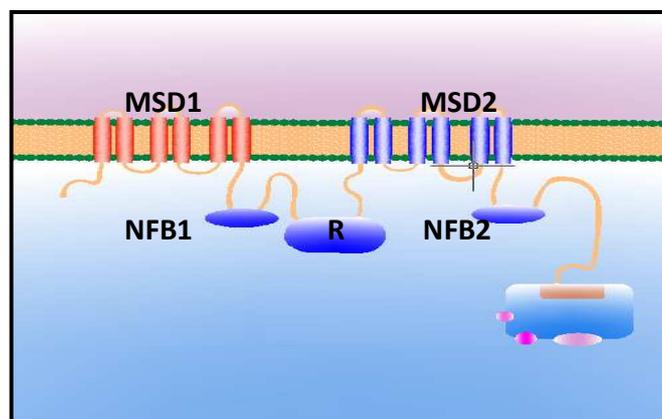


Fig. 1. Esquema hipotético de la Proteína CFTR.

La actividad y función normal de este canal depende directamente de cada una de sus partes.

En condiciones normales, los dominios NBFs, también llamados los dominios de hidrólisis de ATP, se unen a esta molécula con el fin de clivarla y obtener energía para lograr la apertura del canal. En el mismo instante en que se hidroliza el ATP, el dominio regulador R es fosforilado por una proteína quinasa, en general por la proteína quinasa A (PKA), la cual es producida por diversas rutas de señalización intercelular. Dicha fosforilación es la que permite la apertura del canal para la liberación de moléculas de cloro (Collins, F., 1992).

Este canal es regulado por el AMP cíclico (cAMP), molécula encargada de activar a la PKA por unión directa con su dominio regulador, dejando libre el dominio catalítico (Collins, 1992, Rowe et al, 1992, Billington et al, 2003).

Sin embargo, hay diversas maneras en que este canal puede verse afectado. Esto depende especialmente de la clase de mutación que esté presente en el gen CFTR.

Se han encontrado múltiples mutaciones a lo largo de este gen que producen interrupciones en distintas instancias del procesamiento de la proteína, generando de éste modo la enfermedad. Estas mutaciones han sido clasificadas de acuerdo con el mecanismo por el cual generan daño a nivel celular, impidiendo el correcto funcionamiento del canal.

Así, las mutaciones para este gen se pueden clasificar en (Gallati, 2003 De Gracia et al, 2005, Rowe et al, 2005):

CLASE	MECANISMO	MUTACIONES
I	Impide la síntesis o transcripción normal del gen	G542X, R116X, 1898+3A-->G, CFTRdel19, 711+1G-->T, 1609del CA, R1162X
II	Impide el procesamiento normal de la proteína	F508del, N1303K, I507del, R1066C
III	Defecto en la regulación normal de la proteína	D1270N, G551D
IV	Defecto a nivel de conductancia y apertura del canal	L206W, R334W, R117H, R347H, D836Y, P205S
V	Defecto parcial en la transcripción del gen	2789+5G-->A, 1811+1.6kbA-->G, 3849+10kbC-->T, 3272+26G-->A

Tabla 1. Clasificación de las mutaciones del gen CFTR según su mecanismo patológico molecular

En estudios *in vitro* se ha observado un nuevo fenómeno que ha conducido a establecer una última clase de mutaciones para el gen CFTR; ésta sería la Clase VI y corresponde a aquellas mutaciones que se escapan de los procesos de control celular o se restablecen, pero sufren un recambio acelerado desde la membrana plasmática (Rowe et al, 2005, Zeitlin, 2000).

De ésta manera, con base en el genotipo de un paciente, teniendo en cuenta la clase de mutación que tiene y su estado, sea éste homocigoto, heterocigoto o heterocigoto compuesto, se podrían entonces deducir fenotipos leves o severos, dependiendo del momento en el cual se ven afectadas las proteínas (Gallati, 2003). En otras palabras, es de esperarse que pacientes con mutaciones Clase I, II o III tengan fenotipos más severos que pacientes con otra clase de mutaciones, o pacientes que tengan genotipos compuestos por una mutación leve y una severa.

Esta relación entre fenotipo leve y un genotipo compuesto por una mutación leve y una severa, se ha visto en pacientes con suficiencia pancreática y con fenotipos de Fibrosis Quística atípica (Noone et al, 2001, Davis, 2006,)

4.3 EPIDEMIOLOGÍA

La Fibrosis Quística es una enfermedad detectada en la mayoría de las poblaciones. Sin embargo, la frecuencia más alta de portadores y la mayor incidencia de esta patología la tiene la población Caucásica, cuya frecuencia de portadores es de 1 en 25 e incidencia es de 1 en 2500 a 1 en 3200 nacidos vivos (n.v).

Dentro de estas poblaciones de origen caucásico se encuentran principalmente los norteamericanos, europeos occidentales, y austral asiáticos. Ellas han referido un

aumento significativo de supervivencia en los casos de afectados con Fibrosis Quística debido principalmente al mejoramiento en el manejo y su cuidado clínico y al aumento de casos atípicos encontrados por medio de los nuevos métodos diagnósticos (WHO, 2004).

Estudios realizados en otras poblaciones han encontrado datos lejanos a lo reportado para caucásicos. Por ejemplo, para países hispanos la incidencia aproximada de FQ es de 1 en 9500 nacidos vivos (Turcius, 2005), encontrando la mayor incidencia en Cuba con una tasa de 1 en 3900 n.v. (WHO, 2004). Para afroamericanos la incidencia reportada es cercana a 1 en 15000 n.v., y para asiáticos el promedio es de 1 en 31000 n.v. (Turcius, 2005). Dentro de esta población se ha reportado la menor incidencia a nivel mundial correspondiente a personas de origen japonés, las cuales tienen una incidencia estimada de 1 en 1.000.000 a 1 en 350.000 n.v. (WHO, 2004).

A pesar que estas cifras parecen ser consoladoras para la mayoría de las poblaciones, se ha determinado que la baja frecuencia de la enfermedad en algunos países puede deberse a la baja tasa de detección que tienen para dicha entidad (WHO, 2002).

Para Colombia, no hay datos certeros sobre la incidencia real de esta enfermedad. Sin embargo, algunas investigaciones realizadas en la Universidad del Rosario han determinado que la frecuencia de portadores de la mutación más común encontrada en

este país (p. F508del) es de 1/89 con variaciones regionales, y que la incidencia estimada de la enfermedad debe ser cercana a 1 en 5025 casos (Universidad del Rosario, 2010).

Adicionalmente, un estimado de la incidencia de FQ entre el 2000 y el 2005, basándose en datos de tasa de natalidad e incidencia reportada estableció que cerca de 700 nuevos casos debían existir anualmente. Sin embargo, tan solo 350 casos habían sido reportados hasta el año 2000 (WHO, 2002).

Es por esto que se ve una gran necesidad en nuestro país de desarrollar programas de tamizaje neonatal que incluyan Fibrosis Quística, y evidencien casos sub estimados a nivel nacional.

Estos programas han sido implementados en países como Francia y Gran Bretaña, detectando las mutaciones más comunes por tamizaje neonatal o diagnóstico molecular y ha permitido disminuir la incidencia de la enfermedad en más del 30% en los últimos 10 años (WHO,2004).

Así, se hace muy útil establecer las mutaciones más frecuentes en cada uno de los países. Para Colombia, en el estudio realizado por Mateus, H., se demostró que las mutaciones

más comunes para nuestra población son p. F508del (28%), G542X (5%), 621+1G→T (4.6%), 1811+1.6kbA→G (2.1%) y N1303K (0.84%) (Mateus, 2005); Sin embargo, sigue faltando un programa a nivel nacional que permita estimar datos de incidencia y prevalencia reales para nuestra población.

4.4 PRESENTACIÓN CLÍNICA DE LA FIBROSIS QUÍSTICA

La Fibrosis Quística es una enfermedad de compromiso múltiple ya que puede afectar el sistema respiratorio, el sistema gastrointestinal y páncreas, el sistema genito-urinario e hígado (Turcius, 2005, Davis, 2006).

4.4.1 Enfermedad Pulmonar. La Fibrosis Quística se caracteriza por presentar síntomas a nivel del sistema respiratorio. Para esta condición, Ratjen (Ratjen, 2009) propuso una cascada que intenta determinar el orden en el cual se da cada uno de los pasos que conllevan a esta sintomatología asociada a FQ (Figura 2).

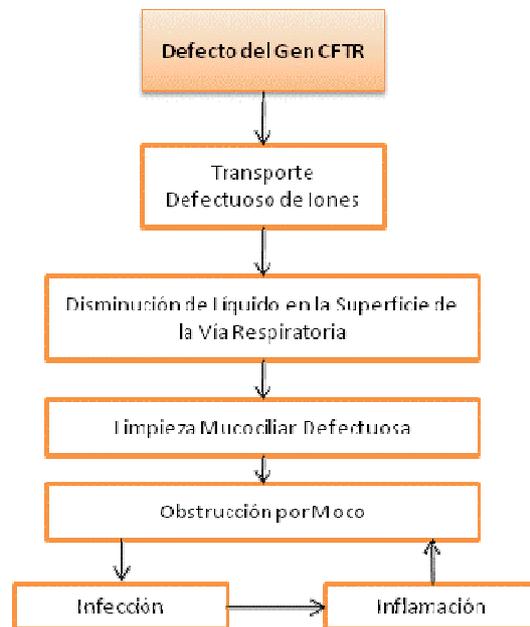


Figura 2. Cascada de Patofisiología de la enfermedad Pulmonar en FQ (Ratjen, 2009)

La disfunción del canal CFTR genera un desnivel de cargas iónicas por la acumulación de iones Cl^- a nivel extracelular, disminución en la reabsorción de iones Na^+ y deshidratación de la mucosa. La obstrucción mucosa de las glándulas exocrinas es la mayor causa de la alta morbi-mortalidad que presenta esta entidad.

En el pulmón, como consecuencia del daño del canal de cloro, se presenta disminución de intercambio de fluidos y bajas concentraciones de sal como resultado de una absorción anormal de sodio desde el lumen. Esto genera secreciones espesas que obstruyen la vía respiratoria y las glándulas sub mucosas. Como consecuencia de dichas secreciones se genera un ambiente útil para la colonización bacteriana, generalmente por *Pseudomonas*

aeruginosa, *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae* (Rowe et al, Turcius, 2005). Estas infecciones preceden el daño del tejido pulmonar por inflamación crónica, caracterizada por la elevación de IL8, IL6, TNF- α y reducida concentración de citoquinas antiinflamatorias y proteasas (Rowe et al, 2005, Dorfman et al, 2008).

Finalmente, se presenta pérdida progresiva de la función pulmonar que conlleva a paros respiratorios y la muerte de aproximadamente el 94% de los casos de FQ.

4.4.2 Complicaciones del Tracto Gastrointestinal y Páncreas. El 85% a 90% de los pacientes con FQ sufren de insuficiencia pancreática, la cual es generada por la disminución de secreciones pancreáticas y bajas concentraciones de bicarbonato. De esta manera las pro-enzimas producidas en el páncreas no pueden ser liberadas al torrente sanguíneo y por ende, son activadas prematuramente, generando la destrucción del tejido y la formación de quistes obstructivos en éste órgano (Turcius, 2005).

El diagnóstico de esta forma de patología esta dado por la excreción de grasas fecales o esteatorrea.

4.4.3 Manifestación de la Fibrosis Quística en otros órganos. Estudios en el gen CFTR han demostrado que ciertas mutaciones están vinculadas con manifestaciones en el tracto

reproductivo masculino, en el cual hay ausencia bilateral de vasos deferentes en el 95% de los casos (Gallati, 2003). Estos individuos son infértiles, aunque existe un porcentaje muy bajo (1-2%) que puede ser fértil (Turcius, 2005).

Al realizar la prueba de electrolitos en sudor para estos pacientes se obtienen datos negativos o limítrofes. Es por esto que este caso de Fibrosis Quística es clasificado entre el grupo de Otras Manifestaciones de Fibrosis Quística.

En el caso de las mujeres con mutaciones en este gen se presentan cambios fisiológicos en la ovulación y dificultad para quedar en embarazo, sin embargo no se ha identificado infertilidad completa (Turcius, 2005).

Adicionalmente, se han encontrado mutaciones asociadas en el gen CFTR en pacientes con Aspergilosis broncopulmonar alérgica, Bronquiectasias diseminadas, Azoospermia obstructiva, Pancreatitis idiopática, Sarcoidosis, entre otras, demostrando que mutaciones en este gen predisponen a patologías asociadas a la Fibrosis Quística (Gallati, 2003).

4.5 DIAGNÓSTICO DE LA FIBROSIS QUÍSTICA

El diagnóstico clínico de Fibrosis Quística sigue los criterios normalmente empleados, que corresponden a aumento de electrolitos en sudor presentes en pacientes con síntomas

clínicos típicos de esta enfermedad, como lo es el desarrollo de enfermedad pulmonar y/o gastrointestinal o que tengan historia familiar de FQ (Stern, 1997).

La técnica empleada para la detección de electrolitos en sudor fue realizada por primera vez por Gibson y Cooke en el año 1959. Este método consistía en estimular la sudoración de los pacientes mediante el uso de corriente eléctrica y una solución de pilocarpina, alcaloide muscarinico que tiene la propiedad de estimular la sudoración; tras este procedimiento se pesaba el sudor seco. El peso necesario para poder realizar el diagnóstico de Fibrosis Quística era mayor o igual a 80 mg (Gibson et al, 1959). Actualmente, se debe realizar la prueba de electrolitos en sudor mediante iontoforesis de pilocarpina siguiendo las Guías de la Fundación de Fibrosis Quística (Le Grys et al, 2007). Tras realizar la iontoforesis de pilocarpina se mide la concentración de electrolitos. El resultado de la prueba se considera positivo si la concentración es mayor de 60mEq/L y está acompañado de los síntomas típicos de Fibrosis Quística (Stern, 1997, Davis, 2006). Si la concentración es menor de 50mEq/L la prueba se considera negativa.

Sin embargo, existen valores limítrofes (entre 50 y 60 mEq/L) que no permiten definir en su totalidad el diagnóstico de esta entidad, además de falsos positivos y negativos dados por otras condiciones de la persona evaluada, los cuales deben ser considerados tras la prueba de electrolitos en sudor y se enuncian a continuación (Stern, 1997, Davis, 2006, Ortega, 2007):

	Falsos Positivos	Falsos Negativos
Condiciones o Enfermedades Asociadas	Malnutrición	
	Fucosidosis	
	Hipotiroidismo	
	Enfermedad de Almacenamiento de Glucógeno Tipo I	
	Mucopolisacaridosis	
	Colestasis Familiar	Edema
	Insuficiencia Suprarrenal	Deshidratación
	Hipoparatiroidismo familiar	Malnutrición severa
	Pseudohipoaldosteronismo	Tratamiento con Diuréticos
	Síndrome de Mauriac	Tratamiento con esteroides
	Diabetes Insípida Nefrogénica Hereditaria	Tratamiento con ciertos Antibióticos
	Nefrosis	
	Síndrome de Klinefelter	
	Infusión Prostaglandina E	
	Anorexia nervosa	
Hipogammaglobulinemia		
Procedimientos Técnicos Asociados	Muestra concentrada	Muestra Insuficiente
	Muestra evaporada	Errores de medición
	Muestra insuficiente	Calibración del Equipo

Tabla 2. Condiciones fisiológicas y Procedimientos técnicos asociados con Falsos positivos y Negativos de la Prueba de Electrolitos en Sudor.

La realización de esta prueba, apoyada en síntomas asociados a Fibrosis Quística, conlleva a la búsqueda de las mutaciones responsables de la enfermedad, las cuales se pueden determinar gracias a la identificación del gen CFTR en el año 1989 (Kerem et al, 1989, Rommens et al, 1989).

4.5.1 Técnicas Moleculares Para la Detección de Mutaciones en CFTR. El estudio del gen CFTR ha permitido determinar hasta el momento un número superior a 1300 para aquellas mutaciones asociadas a Fibrosis Quística. La determinación de las mutaciones responsables de la enfermedad en cada paciente afectado, o sus familiares puede ser un trabajo difícil, considerando que el estudio más amplio para el diagnóstico molecular de la Fibrosis Quística contempla solo 70 mutaciones (Stern, 1997).

Es por esto que es de gran utilidad realizar estudios poblacionales, que permitan determinar la frecuencia de las mutaciones asociadas a la enfermedad, para poner a disposición de cada población el panel de mutaciones más adecuado que cubra la mayoría de los casos.

Las mutaciones para el gen CFTR se pueden determinar de manera directa mediante PCR, RFLPs, PCR-Heteroduplex, Dot-blot, Dot-blot Reverso o Secuenciación (Tomaiuolo et al, 2003, Jay et al, 2006).

Esta última técnica permite determinar diversas mutaciones previamente conocidas, mutaciones raras, o mutaciones nuevas. Sin embargo, dentro de las mutaciones más frecuentes que se presentan en este gen están las grandes deleciones, las cuales no son detectables por secuenciación.

El diagnóstico indirecto de mutaciones en CFTR se puede realizar mediante Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE) y Polimorfismos conformacionales de cadena única (SSCPs), entre otros (Tomaiuolo et al, 2003).

4.6 TRATAMIENTO DE LA FIBROSIS QUÍSTICA

La Fibrosis Quística es una enfermedad de compromiso múltiple. Para esta enfermedad se han propuesto diversas medidas terapéuticas que buscan mejorar la calidad de vida de los pacientes y el pronóstico de la enfermedad.

La Insuficiencia Pancreática Exocrina derivada de mutaciones en el gen CFTR, genera principalmente deficiencia enzimática, la cual se maneja mediante el suministro de diferentes suplementos que buscan superar este déficit (Davis, 2006). Adicionalmente, los pacientes con Fibrosis Quística requieren un control estricto a nivel nutricional. Con esto se busca que los pacientes se mantengan lo más estables posible, disminuyan el riesgo de infecciones pulmonares, y mejoren su pronóstico y calidad de vida.

Los pacientes con FQ típica, con disfunción pancreática exocrina requieren suplementos vitamínicos, especialmente necesitan consumir vitaminas lipo solubles como las

Vitaminas A, D y E (Mason, 2005, Davis, 2006). Este consumo es dependiente de la edad de los pacientes y de su estado nutricional.

Además de las vitaminas, los pacientes con FQ tienen requerimientos especiales de energía, minerales y ácidos grasos.

En cuanto a la enfermedad pulmonar, se han propuesto diferentes medidas para el tratamiento. El manejo principal está dado por el suministro de terapia y agentes terapéuticos que alivien la obstrucción de la vía respiratoria, como lo es el drenaje postural y “clapping” o el suministro de DNAsa humana recombinante. La broncoconstricción se maneja con broncodilatadores y esteroides inhalados; y la infección de la vía respiratoria con antibióticos orales o intravenosos, dependiendo del compromiso pulmonar y las exacerbaciones de los pacientes (Davis, 2006).

Para mejorar las condiciones de los pacientes afectados por Fibrosis Quística que sufren de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, se ha propuesto llevar a cabo otras medidas más agresivas como la terapia génica, la cual consiste en liberación de copias del gen CFTR normal a las células epiteliales de los pulmones de los pacientes afectados, usando vectores virales o lipídicos (Mason, 2005, Geller et al, 2009, Ratjen, 2009). Sin embargo, esta metodología ha fallado en cuanto a la transferencia del ADN, por las mismas condiciones de los pacientes y el difícil acceso a sus pulmones tras la formación de

moco espeso y la colonización bacteriana, además de la poca expresión de CFTR que se logra alcanzar, y de la escasa visualización de los beneficios en cuanto a sintomatología de los pacientes (Mason, 2005, Ratjen, 2009).

Además de esta opción, se ha propuesto medidas terapéuticas en pro del mejoramiento del transporte de iones. Por ejemplo, la estimulación de otros canales de cloro dependientes de calcio mediante el uso de fármacos estimuladores del receptor PY2 y la inhibición de la absorción de sodio (Geller et al, 2009).

Adicionalmente, se ha sugerido la realización de terapias respiratorias a los pacientes afectados, y el uso de oxígeno. Estos tratamientos dependen directamente de la edad y condiciones de los pacientes, y las recomendaciones de los médicos tratantes (Mason, 2005).

La medida más drástica de manejo para los pacientes con FQ es el trasplante de pulmón. Esta opción se contempla cuando hay falla respiratoria y el pronóstico de vida no es mayor a 2 años (Geller et al, 2009).

4.7 CORRELACIÓN ENTRE FENOTIPO Y GENOTIPO PARA FIBROSIS QUÍSTICA

La Fibrosis quística es producida por mutaciones en el gen CFTR, las cuales conllevan a un fenotipo clínico que se puede caracterizar según la severidad, los signos y síntomas y el curso de la enfermedad (Zielenski, 2000).

Como se ha enunciado previamente, el fenotipo clásico de FQ está dado por la presentación de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, insuficiencia pancreática exocrina y aumento de electrolitos en sudor. Sin embargo, la presentación clínica puede ser bastante variable entre los pacientes afectados por esta enfermedad, los cuales pueden presentar diversos grados de severidad en cuanto a la enfermedad pulmonar, algunos pueden no tener insuficiencia pancreática (15%), y presentar niveles limítrofes o normales para la prueba de electrolitos en sudor, además de presentar otras complicaciones en diversos órganos, como lo son el íleo meconial, diabetes, pancreatitis, etc. (Zielenski, 2000)

Para poder vislumbrar la relación entre las mutaciones en el gen CFTR y la presentación de Fibrosis Quística se han realizado diversos estudios, los cuales han permitido determinar algunos factores que pueden intervenir finalmente en la presentación de la enfermedad (Zielenski, 2000). De esta manera, el primer factor a considerar son las mutaciones en el gen CFTR.

El potencial de una mutación para contribuir con la severidad de la FQ depende de diversas características como el tipo de mutación, el mecanismo molecular por el cual causan defectos (Tabla 1), la posición en el gen, la cantidad total de proteína que se produzca, la presencia de alelos complejos y segundas mutaciones (Zielenski, 2000).

El tipo de la mutación se ha visto relacionado directamente con el fenotipo que se presenta, especialmente a nivel pancreático. Por ejemplo, mutaciones que implican cambios en el sitio de splicing, mutaciones nonsense o in frame se han relacionado con insuficiencia pancreática, y se han denominado *mutaciones severas*. Por el contrario, mutaciones de tipo missense se han visto correlacionadas con suficiencia pancreática, lo que las hace denominar *mutaciones leves* (Gallati, 2003).

Adicionalmente, respecto a la clase de mutaciones y el mecanismo molecular en el cual están implicadas (Tabla 1), se ha encontrado correlación entre el fenotipo a nivel pulmonar dado en término de pruebas de función respiratoria y la clase de las mutaciones a la que pertenecen aquellas que conforman el genotipo. Las mutaciones clase I y clase II se han relacionado significativamente con fenotipos más severos de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (De Gracia et al, 2005). Similarmente, pacientes que tienen genotipos compuestos por mutaciones de la Clase I, II o III, tienen una mayor tasa de mortalidad, menor edad promedio de muerte y menor grado de supervivencia con

respecto a aquellos cuyo genotipo está dado por mutaciones de otra Clase (McKone et al, 2003, Lai et al, 2004, McKone et al, 2006).

La posición de la mutación dentro de la proteína es igualmente importante. Mutaciones que se encuentran ubicadas en sitios críticos para la función del canal generarán consecuencias más significativas a nivel clínico, que las mutaciones que se pueden encontrar distribuidas en otros sitios de la proteína. Por ejemplo, la mutación p.F508del la cual se presenta en el dominio de unión a nucleótidos 1 (NBD1), genera cambios conformacionales que conllevan a la captura y degradación de la proteína en el retículo endoplásmico, además de cambios funcionales de este dominio, del cual depende la hidrólisis de ATP para posterior apertura del canal CFTR (Thomas et al, 1992, Skach, 2000).

Además de estas características, es importante tener en cuenta la cantidad de proteína que se produce, la cual se ha relacionado directamente con el fenotipo de los pacientes afectados por FQ (Tabla 3).

Por un lado, existen mutaciones que permiten el acceso de la proteína CFTR a la membrana apical de las células endoteliales de la vía respiratoria, como aquellas que pertenecen a la clase IV y V. Estas mutaciones permiten que haya actividad residual del canal, y que por tanto no se presente un fenotipo clínico severo en los pacientes que tienen estas mutaciones (Zielenski, 2000, Gallati, 2003). Se ha encontrado que pacientes

con Fibrosis quística que tengan al menos un 5-10% de proteína funcional, pueden tener un mejor curso de su enfermedad pulmonar (Crystal, 1999).

Por otro lado, en cuanto a la función pancreática se refiere, se sabe que con un porcentaje menor al 1 % de proteína CFTR funcional y con un porcentaje inferior a 5% de glándulas secretoras funcionales, hay síntomas asociados con insuficiencia pancreática exocrina (Stern, 1997).

Porcentaje de CFTR Normal Funcional	Manifestaciones Clínicas
< 1%	Deficiencia Pancreática Exocrina, además de las manifestaciones citadas para demás porcentajes
< 4.5%	Infección pulmonar progresiva, además de las manifestaciones citadas a continuación
< 5%	Niveles de electrolitos en Sudor anormales, además de las manifestaciones citadas por encima de este porcentaje
< 10%	Ausencia bilateral de vasos deferentes
Entre 10-49%	Anormalidad no Conocida
50-100	Ninguna anomalía conocida

Tabla 3. Relación entre Cantidad de Proteína CFTR Funcional y Manifestaciones Clínicas (Stern, 1997).

Finalmente, la modulación que pueda darse entre las dos mutaciones que conforman el genotipo de un paciente con Fibrosis Quística puede regular el fenotipo (Zielenski, 2000).

Respecto a este punto, Kerem y colaboradores postularon que aquellos quienes tienen

genotipos compuestos por una mutación leve y una severa, no presentaran insuficiencia pancreática, pues la mutación leve es dominante sobre la severa. (Kerem et al, 1989, Gallati, 2003).

Dentro de las mutaciones más estudiadas para los pacientes con Fibrosis Quística, se encuentra la mutación p. F508del. Con respecto a esta mutación se ha señalado que quienes son homocigotos sufren de una enfermedad más severa, tiene presentación temprana de los síntomas y alteración tanto pancreática como pulmonar (Kerem et al, 1990). El 99% de los pacientes homocigotos para esta mutación presentan insuficiencia pancreática exocrina (16). Sin embargo, dicha correlación no existe entre los pacientes con este genotipo y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Zielenski, 2000, Bronsveld et al, 2001, Gallati, 2003, McKone et al, 2006)

El estudio de gemelos tanto monocigotos como dicigotos ha demostrado que afectados con el mismo genotipo presentan diferencias significativas en cuanto a la severidad y presentación de la enfermedad pulmonar, aunque se muestra mayor concordancia entre los gemelos monocigotos, demostrando que existen diversos factores genéticos que pueden influenciar la enfermedad. (Mekus et al, 2000, Bronsveld et al, 2001)

Estos factores genéticos, o genes modificadores son el segundo factor a considerar para entender la presentación clínica heterogénea de los pacientes con Fibrosis Quística.

Se pueden considerar genes modificadores actuando en cada uno de los pasos dentro de la cascada de Patofisiología de la enfermedad Pulmonar en FQ propuesta por Ratjen (Ratjen, 2009). Teniendo en cuenta que la infección crónica es responsable del daño inflamatorio, el cual a su vez conlleva a la pérdida de la función pulmonar, se han realizado estudios sobre genes involucrados en infección crónica e inflamación (Mahadeva et al, 1998, Hull et al, 1998, Henry et al, 2001, Drumm et al, 2005, Corvol et al, 2007, Dorfman et al, 2008).

Por ejemplo, se ha concluido que genes que intervienen en el proceso de infección, como lo son el Gen de Lectina de Unión a Manosa (MBL2) y el Gen de la Oxido Nítrico Sintasa (NOS3), contienen polimorfismos que han sido asociados con disminución de la función pulmonar, mayor riesgo de muerte, y susceptibilidad a colonización bacteriana en pacientes afectados por Fibrosis Quística (Garred et al, 1999, Gabolde et al, 1999, Grasmann et al, 2003, Davies et al, 2004, Dorfman et al, 2008).

Dentro de los genes asociados con el proceso inflamatorio dado en estos pacientes, se ha señalado que ciertos polimorfismos del gen que codifica el Factor de Crecimiento Transformante Beta 1 (TGF- β 1) y del gen del Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α), están asociados directamente con disminución en la función pulmonar y severidad de la Fibrosis Quística (Davies et al, 2004, Drumm et al, 2005, Dorfman et al, 2008).

Sin embargo, pocos estudios se han realizado sobre posibles asociaciones de genes involucrados en procesos de señalización celular, implicados en el transporte, función, maduración y activación de la proteína CFTR, con el fenotipo de la Fibrosis Quística. Esto resulta de gran importancia dado que hay pacientes cuyo genotipo permite la formación residual de proteína CFTR, lo que podría conllevar a fenotipos intermedios, siempre y cuando se estimulara el correcto funcionamiento de esta proteína.

Dentro de los genes asociados a la función, maduración y activación de la proteína CFTR, así como al fenotipo de pacientes afectados por Fibrosis Quística y su respuesta al tratamiento, se encuentra en Gen del Receptor Beta 2 Adrenérgico (Busher et al, 2002, Naren et al, 2003, Taouil et al, 2003, Steagall et al, 2007).

4.8 RECEPTOR B2- ADRENÉRGICO

El receptor beta dos adrenérgico pertenece al grupo de receptores asociados a proteínas G (GPCRs), los cuales son caracterizados por tener siete dominios transmembranales, cuya estructura corresponde a hélices alfa. Su dominio extracelular corresponde al extremo amino-terminal, mientras que el dominio intracelular corresponde al extremo carboxi terminal (Johnson. 2006).

Este receptor es codificado por el gen ADRB2, el cual se encuentra en el cromosoma 5q31-q32, no tiene intrones y su tamaño es de 2.033bp (Kobilka et al, 1989). La transcripción y posterior traducción de este gen genera una proteína de 413 aminoácidos (Johnson, 2006, McGraw et al, 2005).

Esta proteína sufre tres diferentes modificaciones post-traduccionales: N-glicosilación, la cual es básica para la inserción del receptor en la membrana y el tráfico de agonistas, y se da en los aminoácidos 6,15 y 187. La palmitoilación que ancla el extremo carboxi a la membrana y se da a nivel del aminoácido 341 y la ubiquitinización, la cual permite el recambio y regulación negativa del receptor. (McGraw et al, 2005)

La expresión de este receptor se da en el músculo liso de la vía respiratoria, en las células endoteliales y epiteliales del pulmón, células tipo II y mastocitos, funcionando como aceptor de agonistas que permiten la broncodilatación del pulmón (Johnson, 2006).

4.8.1 Activación del Receptor β 2-Adrenérgico. El receptor β 2-Adrenérgico se encuentra asociado con proteínas triméricas de tipo Gs. Estas proteínas G estimuladoras están compuestas por tres subunidades: α , β , γ . El receptor β 2-Adrenérgico, en estado inactivo, está unido a la subunidad α de la proteína Gs. Una vez que el receptor está en contacto con un agonista y es activado, la proteína Gs es defosforilada y la subunidad alfa se separa

para quedar en contacto con la adenil ciclasa, enzima que cataliza la conversión de ATP a cAMP. Esta molécula actúa como un segundo mensajero, cuya función principal es activar la proteína-quinasa A (PKA) (Billington et al, 2003, McGraw et al, 2005, Johnson, 2006,).

Esta proteína-quinasa está compuesta por dos subunidades, una subunidad reguladora y otra subunidad catalítica. El cAMP tiene mayor afinidad por la primera, de tal manera que al unirse a ella, la su unidad catalítica de PKA queda expuesta y libre para actuar de diversas maneras. Por ejemplo, la PKA puede fosforilar receptores acoplados a proteínas Gq y a la Fosfolipasa C (PLC), y de esta manera inhibir la generación de fosfatidil inositol y el flujo de calcio. Adicionalmente, PKA puede actuar sobre canales iónicos, regulando su apertura, o sobre factores de transcripción de genes involucrados con el proceso de broncoconstricción celular (Billington et al, 2003).

Por otro lado Camp también ha sido asociado a procesos de remodelamiento celular. Se ha determinado que esta molécula puede estar involucrada en el proceso de inhibición de liberación de calcio desde las células (intracelular), en la reducción de la entrada de calcio a las células y en la inducción del secuestro de calcio intracelular, todo esto ayudando al relajamiento muscular de la vía respiratoria. (Johnson, 2001)

Aparte de su papel como intermediario en el proceso de broncodilatación, este mensajero está involucrado en el control de canales de intercambio iónico, como el canal CFTR, actuando como mediador de su activación (Busher et al, 2002).

4.8.2 Métodos de Regulación del Receptor β 2-Adrenérgico

4.8.2.1 Desensibilización: Mecanismo regulador de la Señalización. El proceso de desensibilización del receptor está asociado a activación del receptor β -2 Adrenérgico. Este proceso se lleva a cabo con el fin de prevenir la sobre-estimulación de receptores cuando pueda haber exceso de exposición a beta agonistas (Johnson, 2001).

Este proceso ocurre en tres pasos: Desacoplamiento de los receptores, internalización de los receptores no acoplados, y fosforilación de los receptores internalizados (Johnson, 2001).

Dicha fosforilación puede estar mediada por quinasas asociadas a receptores acoplados a proteínas G (GRKs) y arrestinas, o mediante fosforilación con protein quinasas (Kohout et al, 2003).

El primero de estos mecanismos involucra la unión de GRKs al receptor tras el cambio conformacional que éste ha adquirido por su activación. Una vez las GRKs se han unido y fosforilado parte de los loops intracitoplasmáticos del receptor, habilitan la unión

secuencial de las arrestinas, las cuales impiden la unión de otras proteínas Gs (Kohout et al, 2003). Este proceso disminuye cerca del 80% del proceso de señalización celular.

La segunda vía implica la fosforilación del receptor β 2-Adrenergico por proteínas-quinazas activadas en la cascada de señalización del mismo receptor, desarrollando un mecanismo de feedback negativo. En este caso, la PKA regula la exposición y activación del mismo receptor β 2-Adrenergico (Kohout et al, 2003, McGraw et al, 2005)

4.8.2.2_Regulación Negativa del Receptor: Mecanismo regulador del Número de

Receptores. Una vez se ha activado el receptor β 2-Adrenergico y se ha expuesto durante tiempo prolongado a β agonistas, se produce una pérdida de los receptores a nivel de la superficie apical de la membrana celular. Este proceso, al contrario del proceso de desensibilización, se lleva a cabo por mecanismos independientes a la fosforilación de los receptores (Johnson, 1998).

El proceso de regulación negativa involucra la internalización del receptor β 2 Adrenérgico vía endosomas. Estos endosomas guían el receptor hasta los lisosomas donde serán degradados o son reciclados y devueltos a la superficie celular (Billington et al, 2003).

4.8.3 Polimorfismos del Receptor β 2-Adrenérgico. El estudio del gen y la proteína del Receptor β 2-Adrenérgico ha permitido encontrar diversos polimorfismos distribuidos a lo largo de la proteína (Johnson, 2001, Billington et al, 2003). Hasta el momento se han

descrito cerca de 15 polimorfismos, sin embargo se ha encontrado que tres de ellos alteran el comportamiento del receptor luego de la exposición al agonista (Turki et al, 1995).

Estos polimorfismos implican cambios nucleotídicos en las posiciones 46 (A>G), 79 (C>G) y 491 (C>T) del ADN, generando cambios no sinónimos en los codones 16 (p.R16G), 27 (p.Q27E) y 164 (p.T164I) de la proteína (Johnson, 2001, Johnson, 2006).

El polimorfismo p.R16G ha sido ampliamente investigado tanto en estudios *in vitro* como en estudios *in vivo*. Dichas investigaciones han reportado relación entre el polimorfismo y aumento de la regulación negativa del receptor (Ligget, 1997), asociación en pacientes con este polimorfismo y el grado de severidad de asma (Turki et al, 1995, Ligget, 1997) y la presencia del polimorfismo y la severidad, el curso de la enfermedad y la respuesta a tratamiento para Fibrosis Quística (Johnson, 2006, Steagall et al, 2007).

La frecuencia del alelo R en población control es cercana a 0.5, mientras en los pacientes afectados por Fibrosis Quística la frecuencia es cercana a 0.3, mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) (Johnson, 2001, Steagall et al, 2007).

El polimorfismo p.Q27E ha mostrado un comportamiento opuesto al del polimorfismo p.R16G en estudios *in vitro*. Este se ha visto relacionado con una disminución en la

regulación negativa del receptor, generando mayor grado de receptores activos en la superficie celular (Ligget, 1997). Sin embargo, los estudios de asociación para asmáticos y para pacientes afectados por Fibrosis Quística, han demostrado que también existe diferencias significativas entre población control y pacientes respecto a este polimorfismo, demostrando frecuencias significativamente diferentes (Turki et al, 1995, Ligget, 1997, Busher et al, 2002, Steagall et al, 2007).

Las frecuencias encontradas en estudios previos para el alelo Q en población control oscilan entre 0.6 y 0.7, mientras que en población afectada está entre 0.4 y 0.5 (Busher et al, 2002, Steagall et al, 2007).

La mayoría de estudios de asociación realizados para estos polimorfismos, han resaltado la importancia de analizar los haplotipos respecto a estos alelos, más que los genotipos independientes, mostrando que hay, en el caso de la Fibrosis Quística, una mayor tendencia a fenotipos severos en pacientes p.R16R y p.E27E, los cuales están asociados a menores parámetros de función pulmonar (Steagall et al, 2007).

En cuando al polimorfismo p.T164I, cuya frecuencia reportada en población control es de 1%, se ha encontrado asociado a diferencias a nivel de respuesta a tratamiento, observando que genera una disminución en la cascada de señalización dada por una baja

en el acoplamiento del agonista con el receptor, y también disminuida activación de la adenil ciclasa (Ligget, 1997).

4.9 RELACIÓN FIBROSIS QUÍSTICA – RECEPTOR B2-ADRENÉRGICO

El canal CFTR es regulado por el cAMP intracelular y es activado por la fosforilación de su dominio regulador mediante protein-quinasas A/C. La activación de PKA o PKC está dada por la unión de su sitio regulador al cAMP, que libera el sitio catalítico de éstas. Este sitio catalítico es el responsable de fosforilar diversas proteínas para su activación, entre estas el canal CFTR (Naren et al, 2003).

Una de las vías estrechamente vinculadas con la formación del cAMP, es la cascada de señales desencadenada por la unión de agonistas al receptor β 2-Adrenérgico. Así, la ruta de señalización generada por la activación del receptor β 2-Adrenérgico, genera cAMP como segundo mensajero, que a su vez activa la PKA, y ésta fosforila canales como CFTR (Billington et al, 2003).

Es por esto mismo que este receptor ha sido evaluado en estudios de respuesta a tratamiento para enfermedades pulmonares como la Fibrosis Quística, asociándolo además con severidad de la enfermedad (Busher et al, 2002, Steagall et al, 2007).

Se ha visto una asociación significativa con el polimorfismo glicina en la posición 16 y la disminución en la función pulmonar de pacientes con fibrosis quística (Busher et al, 2002). El estudio molecular de varios polimorfismos del receptor, y la evaluación y comparación de los haplotipos con respecto a la severidad de la enfermedad, también ha demostrado una estrecha relación. (Busher et al, 2002, Steagall et al, 2007)

Sin ir más allá, estudios *in vitro* han demostrado el vínculo que existe entre el receptor beta dos adrenérgico y su activación, con la localización, función y maduración apropiada del canal CFTR (Taouil et al, 2003).

Es por todo esto que resulta muy importante el estudio de asociación de los polimorfismos para el receptor β 2-Adrenérgico en pacientes con Fibrosis Quística, ya que se podrían utilizar como medio pronostico para estos pacientes, además de sugerir una vía terapéutica alternativa para el manejo de pacientes con Fibrosis Quística que tengan menor producción de la proteína CFTR, mediando la vía de activación de este canal y mejorando significativamente su calidad de vida.

5 METODOLOGÍA

5.1 TIPO DE ESTUDIO

Este estudio es de tipo Caso- Control, el cual corresponde a una investigación con resultados a nivel epidemiológico y analítico, que estudia los polimorfismos del Receptor β 2 Adrenérgico en pacientes afectados por Fibrosis Quística y controles sanos sin esta enfermedad.

5.2 POBLACIÓN DE REFERENCIA

El análisis de polimorfismos del Receptor Beta 2 Adrenérgico se llevó a cabo en 70 pacientes afectados con Fibrosis Quística y 192 controles sanos para esta enfermedad. El cálculo de la muestra se realizó por medio del programa EpiInfo v. 6.0. Se estableció que la relación entre pacientes y controles para este estudio debía ser mínimo 1:2, dada la baja frecuencia del alelo I164. El poder estadístico alcanzado es de 80% y el nivel de confianza de 95%.

La relación entre pacientes y controles para este estudio caso-control

Los pacientes y los controles debían cumplir los siguientes criterios de inclusión, los cuales fueron propuestos al inicio del estudio.

5.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes afectados con Fibrosis Quística, que tengan estudio molecular en el cual se hayan identificado mutaciones en el gen CFTR en forma homocigota o heterocigota compuesta, asociados a un cuadro clínico compatible con la entidad y que ellos o sus representantes hayan aceptado mediante un consentimiento informado diligenciado en estudios previos, que su muestra sea empleada para otros análisis y que hayan dado su asentimiento telefónico para participar en este estudio (Anexo 1 y Anexo 2). Estos consentimientos y asentimientos fueron aprobados por el Comité de ética de la Universidad del Rosario.
- Controles sanos para Fibrosis Quística, con una edad entre 18-60 años, que hayan sido informados plenamente del estudio y sus objetivos, y que hayan aceptado mediante un consentimiento informado participar voluntariamente en la investigación, y ser evaluados molecularmente para el gen del receptor β -2 adrenérgico (Anexo 3). Este consentimiento fue aprobado por el Comité de ética de la Universidad del Rosario.

5.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Para este estudio se determinaron los siguientes criterios de exclusión para cada una de las poblaciones de referencia:

- Pacientes afectados por Fibrosis Quística que no acepten participar en el estudio.
- Controles sanos con antecedentes personales de Asma, Fibrosis Quística, Diabetes Mellitus, Enfermedad Pulmonar Crónica e Hipertensión.

Para poder determinar el estado de salud de los controles se realizó una encuesta personal, buscando determinar sus antecedentes.

5.5 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La metodología general (Fig. 3) fue escogida para lograr los objetivos de genotipificación de los tres polimorfismos (p.R16G, p.Q27E y p.T164I) en población control y en los pacientes afectados por Fibrosis Quística. Sin embargo, durante el proceso de estandarización surgieron algunas modificaciones a los procedimientos sugeridos al principio de esta investigación.

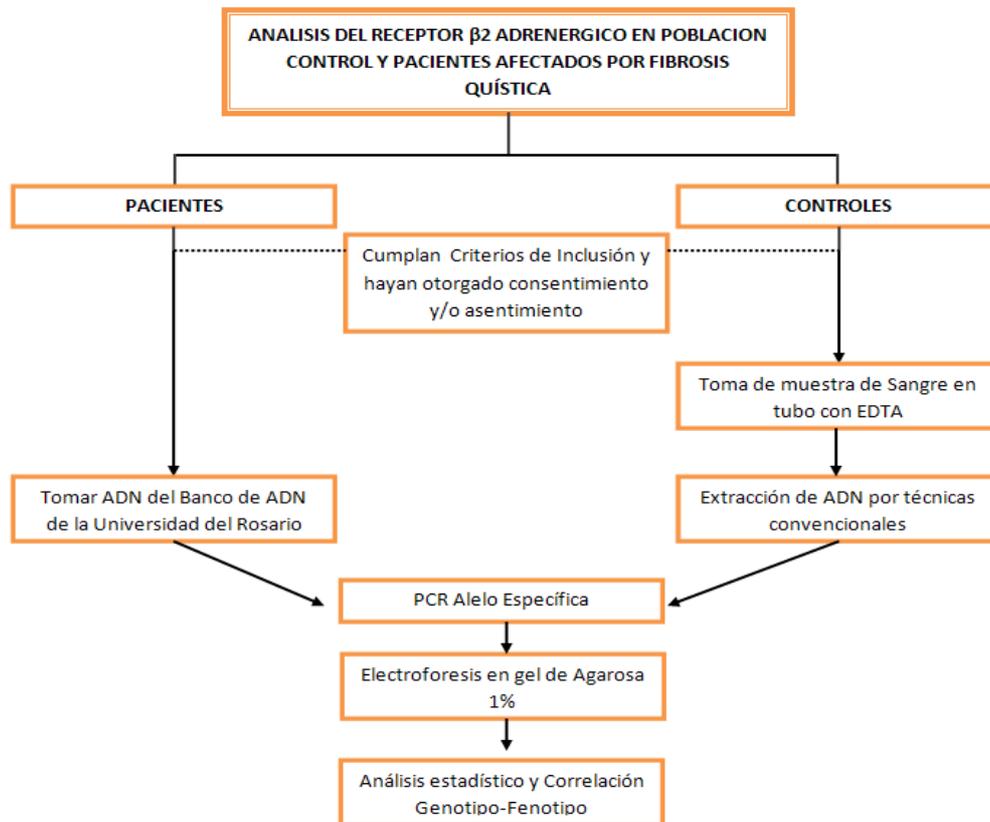


Figura 3. Procedimiento Experimental Sugerido para Genotipificación y Análisis de Población Control y Pacientes Afectados por Fibrosis Quística.

5.5.1 Estandarización de la Metodología Experimental

5.5.1.1 Extracción de ADN. Para las personas afectadas se contaba con el banco de ADN de la Unidad de Genética de la Universidad del Rosario; por lo tanto los procesos de toma de muestra y extracción de ADN en esta población no fueron necesarios.

En la población control, de quien se obtenía el consentimiento informado para la participación en este estudio, se realizó toma de muestra de sangre de aproximadamente 3 ml en tubo con EDTA. A partir de esta muestra, se realizó extracción de ADN por Salting out o PROBE.

Inicialmente la extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo de la técnica Salting out modificado (Anexo 4). Mediante este procedimiento se obtuvo ADN de baja calidad, que al visualizar en el gel de agarosa al 1% mostraba barrido y baja definición de la banda por lo cual se optó por la realización de la extracción de ADN mediante la técnica PROBE (Anexo 5).

La técnica PROBE permitió la obtención de ADN sin evidencia de degradación. Sin embargo, esta técnica requiere de un mayor volumen de sangre (2 ml).

5.5.1.2 PCR Alelo Específica. Existen diversas metodologías moleculares para la identificación de SNPs en ADN. Entre los más usados están el uso de enzimas de restricción (RFLPs), la creación de sitios de restricción (ACRS), la mutagénesis sitio dirigida y la PCR alelo específica.

Para el estudio de los polimorfismos p.R16G, p.Q27E y p.T164I del receptor β 2-Adrenérgico se realizó el análisis de la secuencia de ADN donde están los polimorfismos mediante el programa BioEdit, encontrando que la región donde se encuentran estas

variantes no es reconocida por enzimas de restricción, descartando entonces el uso de RFLPs.

Así mismo, anteriores publicaciones realizaban la identificación de estos polimorfismos por medio de PCR- Alelo específica o la creación de sitios de restricción. Dada la complejidad de esta última metodología, se eligió la realización de PCR-Alelo específica.

Para esta amplificación se han descrito diversos primers en la literatura, sin embargo al realizar el estudio de complementariedad por medio de la herramienta BLASTn, se encontró que había 100% de coincidencia con los primers reportados por Turki, y colaboradores (Turki et al, 1995), por lo cual estos fueron los empleados en el proceso de la PCR (Tabla 4).

PRIMER	Polimorfismo p.R16G	Polimorfismo p.Q27E	Polimorfismo p.T164I
Primer 1 (Forward)	5'-CTTCTTGCTGGCGGCACCCAAT <u>A</u> -3'	5'-GGACCACGACGTCACGCAG <u>C</u> -3'	5'-TGGATTGTGTCAGGCCTTA <u>I</u> -3'
Primer 2 (Forward)	5'-CTTCTTGCTGGCGGCACCCAAT <u>G</u> -3'	5'-GGACCACGACGTCACGCAG <u>G</u> -3'	5'-TGGATTGTGTCAGGCCTTA <u>C</u> -3'
Primer (Reverse)	5'-CCAATTTAGGAGGATGTAAACTTC-3'	5'-ACAATCCACACCATCAGAAT-3'	5'-CACAGCAGTTTATTTCTTT-3'

Tabla 4. Primers empleados para la PCR Alelo Específica e Identificación de los polimorfismos p.R16G, p.Q27E y p.T164I del gen ADRB2 (Turki et al, 1995).

- **Estandarización**

El procedimiento de estandarización de la PCR para cada uno de los polimorfismos inició con la realización de escalera de temperatura de anillaje y empleando Go Taq Green Master Mix de Promega. Este proceso se llevó a cabo empleando muestras control

previamente secuenciadas por el Doctor Marc Vía, investigador y docente de la División de Ciencias Farmacéuticas y Farmacogenética, Medicina Pulmonar y Cuidado Critico y Farmacología Clínica de la Universidad de California, San Francisco.

Para los tres polimorfismos se probaron temperaturas del rango 59°C a 62 °C, con variación de un grado, obteniendo amplificación para los polimorfismos p.R16G y p.Q27E a 61°C, con las bandas esperadas de 913 bp y 442bp (Tabla 5). Sin embargo, se evidenciaba barrido en el corrido electroforético, y las bandas obtenidas no eran nítidas.

Para confirmar el genotipo obtenido, se realizó un nuevo proceso de amplificación sobre las mismas muestras control, encontrando resultados divergentes.

Debido a la baja reproducibilidad de la amplificación con estas condiciones se decidió realizar la PCR empleando componentes , dado que al emplear esta Master Mix se reducían las posibilidades de manipulación de los diversos factores importantes para la amplificación como lo son la concentración de Cloruro de Magnesio y de la Taq polimerasa.

- **Estandarización de PCR por Componentes**
 - **PCR Alelo Específica: Polimorfismo p.R16G**

Para este polimorfismo se mantuvieron las condiciones de amplificación empleadas inicialmente con la Master Mix (Tabla 5) y se realizó escalera de MgCl₂, evaluando amplificación a 1 mM, 1.2 mM y 1.5 mM. Bajo estas condiciones se encontraron bandas tenues a 1.2 mM de MgCl₂, y bandas de mayor intensidad y nitidez a 1.5 mM.

	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización Inicial	94 °C	5 ´
Desnaturalización	94 °C	45 ´´
Anillaje	61 °C	45 ´´
Extensión	72 °C	45 ´´
Extensión Final	72 °C	10 ´

Tabla 5. Condiciones de Amplificación de PCR para los polimorfismos p.R16G y p.Q27E.

Una vez halladas las condiciones de amplificación, se probaron los controles secuenciados. Los resultados no eran reproducibles.

Por esta razón se hizo entonces necesaria la evaluación de otros componentes de la PCR, lo cual fue recomendado por Newton y cols, y Sarkar y cols (Newton et al, 1989, Sarkar et al, 1990). Los primers se probaron a dos concentraciones diferentes (0.04 pM y 0.08 pM) encontrando amplificación para dos de los tres controles secuenciados con 0.08 pM de cebador.

La amplificación preferencial de dos controles sugirió la importancia de la concentración de ADN para obtener amplificación de este polimorfismo, ya que los controles amplificados estaban a una concentración inicial de 80 ng/μl y 300 ng/μl mientras el control del cual no se obtuvo amplificación tenía una concentración inicial de 25 ng/ μl.

De esta manera, se hizo necesario realizar una escalera de ADN a partir de los controles para determinar cuál era la concentración mínima requerida para la amplificación, obteniendo que la concentración final óptima era de 8 ng/ μl (Tabla 6).

Así, se requirió la cuantificación de la concentración de ADN en las muestras y controles a emplear.

Concentración final de ADN	Primer 0.08 pM
	Concentración MgCl ₂ (1.5 mM)
2 ng/μl	-
4 ng/μl	-
5 ng/μl	-
6 ng/μl	-
7 ng/ μl	+/-
8 ng/ μl	+
10 ng/ μl	+
20 ng/ μl	+

Tabla 6. Estandarización de PCR Alelo específica por Componentes: Prueba con diluciones de ADN. Resultado + y – según se evidencia amplificación. +/- una amplificación dudosa

Obteniendo los resultados de esa prueba de estandarización, se lograron las condiciones finales de amplificación de la PCR Alelo específica para el polimorfismo 16 (Tabla 7) evidenciando la gran importancia de la calidad y concentración de ADN para esta metodología.

Componente	Concentración Final
Buffer	2 X
Primer 1	0.08 pM
Primer 2	0.08 pM
dNTP's	2 mM
MgCl ₂	1.5 mM
Taq Polimerasa	1.2 U
ADN	8 ng/ µl
Volumen Final	20 µl

Tabla 7. Estandarización de PCR Alelo específica por Componentes para p.R16G: Concentraciones Finales

- **PCR Alelo Específica: Polimorfismo p.Q27E**

El proceso de estandarización de la PCR para este polimorfismo siguió el mismo protocolo realizado para el polimorfismo p.R16G.

La escalera de temperatura permitió determinar que las condiciones de amplificación podían ser iguales a las manejadas para el polimorfismo anterior (Tabla 5). Adicionalmente, la concentración de Cloruro de Magnesio sería de 1.5 mM.

Teniendo en cuenta las variables adicionales como concentración de primers y ADN, se realizó la amplificación como se hizo inicialmente para p.R16G, obteniendo la banda esperada de 442 bp con 0.04 pM de primers y 1 ng/ µl de ADN (Tabla 8).

Componente	Concentración Final
Buffer	2 X
Primer 1	0.04 pM
Primer 2	0.04 pM
dNTP's	2 mM
MgCl ₂	1.5 mM
Taq Polimerasa	1.2 U
ADN	1 ng/ µl
Volumen Final	20 µl

Tabla 8. Estandarización de PCR Alelo específica por Componentes para p.Q27E: Concentraciones Finales

▪ PCR Alelo Específica: Polimorfismo p.T164I

Así como se evidenció con las pruebas iniciales realizadas con Master Mix, la escalera de temperatura para la amplificación del polimorfismo p.T164I difiere con respecto a la amplificación de los otros dos polimorfismos, esto debido especialmente a la secuencia de los primers. Para este caso, se contemplaron temperaturas de anillaje inferiores, evaluando el rango de 56°C a 61 °C.

Este procedimiento permitió determinar las condiciones de la PCR como se enuncian en la Tabla 9.

	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización Inicial	94 °C	5 ´
Desnaturalización	94 °C	45 ´´
Anillaje	57 °C	45 ´´
Extensión	72 °C	45 ´´
Extensión Final	72 °C	10 ´

Tabla 9. Condiciones de Amplificación de PCR para el polimorfismo p.T164I.

La escalera de Cloruro, realizada de la misma manera que para los anteriores polimorfismos, confirmó que la concentración óptima de Cloruro de Magnesio sería de 1.5 mM (Tabla 10).

Al realizar la PCR bajo estas condiciones, se pudo determinar que los controles amplificaban siempre y cuando hubiese una cantidad de ADN igual a la manejada en el polimorfismo 16. Por este motivo, la concentración mínima para lograr evidenciar la banda de 662 bp fue de 8 ng/ μ l (Tabla 10).

Componente	Concentración Final
Buffer	2 X
Primer 1	0.04 μ M
Primer 2	0.04 μ M
dNTP's	2 mM
MgCl ₂	1.5 mM
Taq Polimerasa	1.2 U
ADN	8 ng/ μ l
Volumen Final	20 μ l

Tabla 10. Estandarización de PCR Alelo específica por Componentes para p.T164I: Concentraciones Finales

5.5.1.3 Análisis estadístico y Correlación Genotipo-Fenotipo. El análisis estadístico se basó en la comparación univariada entre grupos mediante el test de ji-cuadrado de Pearson o el test exacto de Fisher para variables categóricas, mediante el programa EPIDAT v. 3.1. Las variables clínicas analizadas para el grupo de pacientes con Fibrosis Quística (Bronquiectasias, Pólipos, Colonización por *P. aeruginosa* o *S. aureus*,

Compromiso pulmonar, sinusitis y presentación clínica de Fibrosis Quística Típica) se compararon con la información genética obtenida mediante las mismas herramientas para determinar si había significancia, en cuyo caso los valores de p debían ser superiores a 0.05 y asociación, la cual se determinaba mediante el valor del OR cuyo valor debía ser mayor a 1 y cuyo intervalo de confianza no debía contener a 1 para establecer alguna asociación positiva.

Para el análisis de los haplotipos se infirió el más probable para cada individuo mediante el programa Arlequin v. 3.1 para inferencia de haplotipos a partir de fase gamética desconocida según el algoritmo de máxima probabilidad EM descrito por Excoffier, y cols. (Excoffier et al, 1995).

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS POBLACIONES ANALIZADAS

Se analizaron en total 192 controles sanos y 70 pacientes afectados por Fibrosis Quística, quienes tenían diagnóstico molecular confirmado mediante la detección de las mutaciones más comunes en el gen CFTR (Tabla 12).

De la población control se encontró que la edad estuvo dentro del rango de 18 y 54 años y su promedio fue de 21.26+/-5.3 años. Esta población estuvo compuesta por 105 mujeres y 87 hombres.

La edad de los pacientes osciló entre 0.5 y 20 años con un promedio de 5.8+/-4.93 y estuvo compuesta por 45 mujeres y 26 hombres.

El grupo de pacientes afectados por Fibrosis Quística fue clasificado según diversas variables clínicas asociadas al compromiso de la vía aérea, que incluían el puntaje clínico de Shwachman las cuales estaban registradas en su historia médica (Tabla 11). Estas variables fueron tomadas en cuenta más adelante para determinar el grado de asociación entre el genotipo del receptor Beta 2 Adrenérgico y el fenotipo de los pacientes.

Variable Clínica	No de Pacientes (Porcentaje)
Fibrosis Quística Clásica	46 (65.71%)
Colonización <i>P. aeruginosa</i>	19 (27.14%)
Colonización <i>S. aureus</i>	19 (27.14%)
Sinusitis	15 (21.42%)
Polipos	6 (8.57%)
Bronquiectasias	11 (15.71%)

Tabla 11. Variables Clínicas asociadas a Compromiso de la Vía Respiratoria de los pacientes con FQ (Mateus, 2005).

Adicionalmente en éste grupo se encontró una amplia gama de mutaciones del gen CFTR, distribuidas en 21 genotipos distintos. Estas también fueron analizadas bajo su relación con el genotipo del Receptor Beta 2 Adrenérgico y se enuncian en la Tabla 12.

Mutación	Frecuencia
p.F508del	0.593
G542X	0.085
621+1G->T	0.064
1811+1,6kb A>G	0.035
R334W	0.014
W1282X	0.007
S549N	0.007
R1162X	0.021
S549R	0.007
3120+1G>A	0.007
Desconocida	0.157

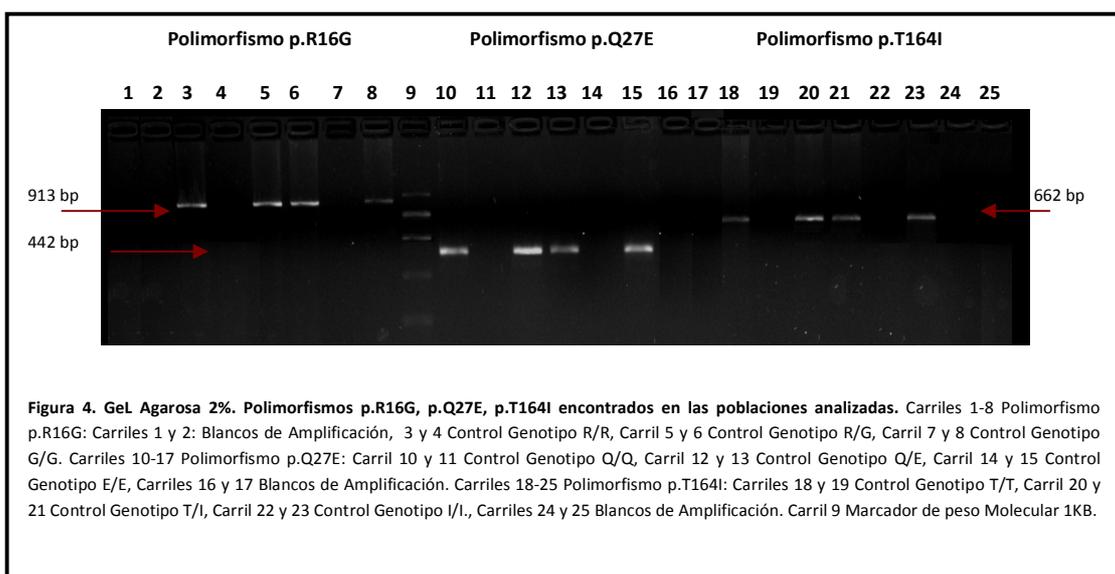
Tabla 12. Mutaciones encontradas en la Población de Pacientes con FQ (Mateus, 2005)

Es importante tener en cuenta que las mutaciones denominadas como desconocidas son mutaciones no encontradas bajo el estudio de las mutaciones más frecuentes en la población colombiana las cuales incluyen: 175insT, CFTRdele 2,3, E60X, G85E, 394delTT, R117H, Y122X, I148T, 711+1G>T, 1078delT, R334W, R347P, A455E, I507del, 1717-1G>A,

S549N, G551D, R553X, R560T, 1898+1G>A, 2143delT, 2183AA>G, 2184delA, 2789+5G>A, 3120+1G>A, 3272-26A>G, Y1092X, R1162X, 3659delC, 3849+10kbC>T, 3905insT, S1251N, W1282X, N1303K p.F508del, G542X, 621+1G->T y 1811+1.6KBA>G. Los pacientes seleccionados eran homocigotos o heterocigotos para mutaciones en el gen CFTR (Mateus, 2005).

6.2 ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS p.R16G, p.Q27E Y p.T164I DEL RECEPTOR B2-ADRENÉRGICO

Se realizó el estudio molecular de los polimorfismos p.R16G, p.Q27E y p.T164I del Receptor β 2-Adrenérgico siguiendo la metodología enunciada anteriormente, lo cual permitió determinar de manera directa el genotipo de las personas analizadas en este estudio (Fig. 4).



En la población estudiada, compuesta por 192 individuos sanos y 70 pacientes afectados por Fibrosis Quística, se encontró que la frecuencia del genotipo homocigoto R/R era igual en las dos poblaciones (0.17). Sin embargo, en la población de pacientes fue relativamente más alta la frecuencia del genotipo heterocigoto R/G en comparación con la población control (0.60 vs 0.49) y más baja la frecuencia del genotipo homocigoto G/G (0.23 vs 0.34). Al analizar los datos en conjunto para este polimorfismo por medio del programa SPSS y EPIDAT versión 3.1 mediante la prueba de ji-cuadrado no se evidencian diferencias significativas entre las dos poblaciones, encontrando un valor de $p=0.201$ (Figura 5).

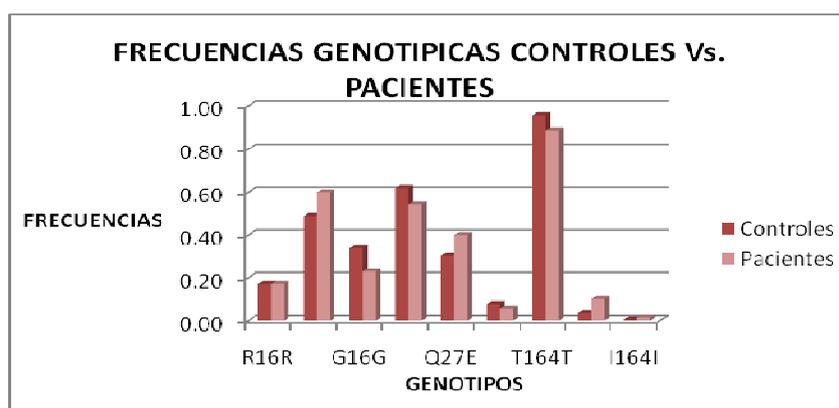


Figura 5. Frecuencias Genotípicas en Población Control y en Pacientes.

Los resultados para el polimorfismo p.Q27E mostraron que en ambas poblaciones, había prevalencia del Q/Q, aunque en los controles éste genotipo fue más frecuente en comparación con la población de pacientes afectados (0.62 vs 0.54). Por el contrario, el genotipo heterocigoto Q/E fue más frecuente en los pacientes que en los controles (0.40

vs 0.30) y la frecuencia del genotipo homocigoto E/E fue relativamente similar entre las dos poblaciones (0.08 vs 0.06).

Al comparar estadísticamente las frecuencias genotípicas encontradas en las dos poblaciones para el polimorfismo p.Q27E, no se encontró una diferencia significativa entre ellas ($p=0.4741$).

El estudio del polimorfismo p.T164I demostró el predominio del genotipo homocigoto T/T en ambas poblaciones, siendo mayor la frecuencia de éste en la población control (0.96 vs 0.89). Esta diferencia se ve compensada en el aumento del número de heterocigotos p.T164I en los pacientes, cuya frecuencia es evidentemente superior a la encontrada en los controles (0.10 vs 0.04).

La frecuencia del genotipo homocigoto I/I encontrada en la población control fue la mitad de la frecuencia encontrada en los pacientes.

Estas frecuencias genotípicas no mostraron diferencias estadísticamente significativas al compararlas mediante la prueba de ji-cuadrado ($p=0.127$).

Con la información genotípica y mediante el uso del programa GenePop v.3.4, se pudo determinar rápidamente la frecuencia alélica de las variantes en las dos poblaciones y la evaluación de la diferenciación génica entre ellas (Fig. 6).

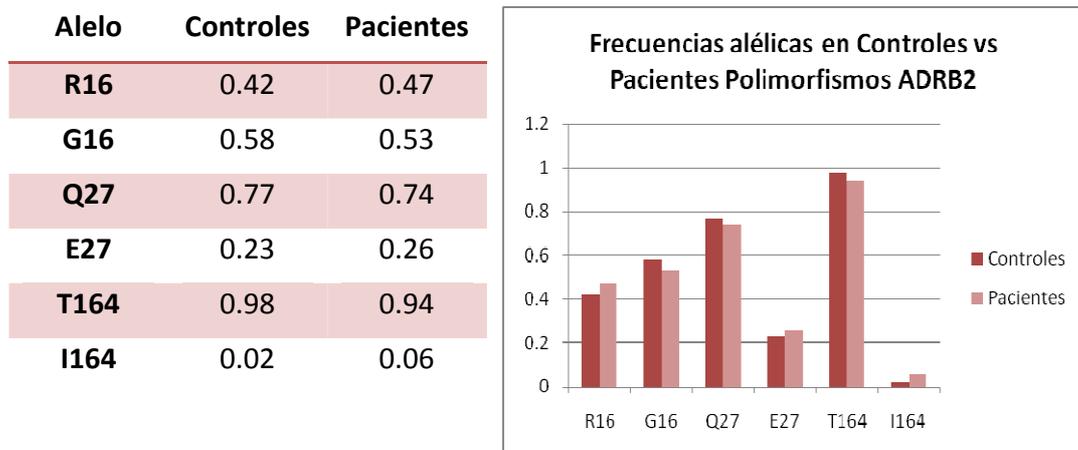


Figura 6. Distribución de los alelos polimórficos p.R16G, p.Q27E y p.T164I en Controles y Pacientes afectados por FQ.

Los resultados mostraron que la frecuencia de los alelos G16 y Q27 en las dos poblaciones no presentaba diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

Busher y cols. (Busher et al, 2002) y Steagall y cols. (Steagall et al, 2007) han reportado diferencias en la distribución alélica para estos dos polimorfismos. La comparación estadística de los datos obtenidos por estos autores y los reportados en el presente estudio, para estos dos polimorfismos, en los pacientes afectados por Fibrosis Quística muestra diferencias significativas respecto a aquellos analizados por Steagall y cols. ($p = 0.016$).

Por otro lado, el análisis del tercer polimorfismo mostró que la frecuencia del alelo T164 fue mayor en las dos poblaciones analizadas, en comparación con la frecuencia del alelo I164. Sin embargo, ésta última fue evidentemente superior en la población de pacientes

afectados. El análisis estadístico de estos resultados corroboró la diferencia significativa entre las dos poblaciones para el polimorfismo p.T164I ($p = 0.0231$).

Busher y cols. hicieron el análisis de este polimorfismo en dos poblaciones, una población control y una de pacientes afectados por Fibrosis Quística, encontrando frecuencias por debajo del 5% y las cuales no eran diferentes entre ellas (Busher et al, 2002). Estos resultados fueron estadísticamente diferentes a los encontrados en el presente estudio ($p = 0.0316$).

Adicionalmente, a partir de las frecuencias genotípicas y alélicas, y empleando la opción de Prueba para el Equilibrio de Hardy-Weinberg del programa GenePop, se determinó que las dos poblaciones estaban en equilibrio ($p > 0.05$). Este análisis se realizó por población y por locus.

En anteriores poblaciones se ha descrito desequilibrio de ligamiento ente los loci 16 y 27 del Receptor Beta 2-Adrenérgico dada la ausencia de los genotipos homocigotos R/R y E/E (Busher et al, 2002). Teniendo en cuenta éstos datos se decidió realizar la prueba de desequilibrio genotípico para evaluar la posibilidad de encontrar desequilibrio de ligamiento. Este análisis demostró desequilibrio para los loci p.R16G y p.Q27E en la población control ($p = 0.00062$).

6.3 ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS PARA LA POBLACIÓN CONTROL Y DE PACIENTES AFECTADOS POR FIBROSIS QUÍSTICA

Diversas publicaciones han demostrado que el efecto del Receptor Beta 2 Adrenérgico como gen modificador de enfermedades con implicaciones pulmonares como Fibrosis Quística y Asma no radica en el genotipo particular de un individuo, sino en su haplotipo (Steagall et al, 2007, Thakkinstian et al, 2005).

Propuesto esto, se quiso realizar el análisis de haplotipos para los pacientes y controles y de esta manera determinar si existe o no correlación entre un haplotipo particular y la severidad de la enfermedad en los pacientes. Sin embargo, dado que no se contaba con los padres de cada uno de los participantes, se utilizó la herramienta de Inferencia de Haplotipos de Arlequin v. 3.1, la cual por medio del algoritmo EM busca determinar los haplotipos más probables a partir de datos genotípicos multilocus cuando la fase gamética es desconocida.

Siguiendo esta metodología se encontraron los haplotipos más probables para cada individuo y cada población. Las frecuencias se observan a continuación:

HAPLOTIPOS MÁS PROBABLES			
POBLACION CONTROL	FRECUENCIA	PACIENTES AFECTADOS	FRECUENCIA
R16 Q27 T164	0.378	G16 Q27 T164	0.362
G16 Q27 T164	0.369	R16 Q27 T164	0.343
G16 E27 T164	0.191	G16 E27 T164	0.141
R16 E27 T164	0.038	R16 E27 T164	0.090
G16 Q27 I164*	0.023	R16 Q27 I164*	0.038
		G16 E27 I164*	0.026

Tabla 13. Lista de Haplotipos Más Probables y sus frecuencias encontradas mediante Arlequin v.3.1. (*) Haplotipos encontrados exclusivamente en una población.

De acuerdo a los hallazgos se encontraron 5 haplotipos en la población control, de los cuales el más frecuente fue el compuesto por Arginina en el codón 16, Glutamina en el codón 27, y Threonina en el codón 164 (R16 Q27 T164); además se encontró que el haplotipo menos frecuente era el compuesto por Glicina, Glutamina e Isoleucina (G16 Q27 I164). Adicionalmente, en ésta población se encontró el haplotipo conformado por Glicina, Glutamina e Isoleucina (G16 Q27 I164) con una frecuencia de 0.023, el cual no se encontró en la población de pacientes (Fig. 7).

En general, en la población control se encontró que los menos frecuentes involucran cambios en la posición 27 y 164, y que el orden de frecuencia de mayor a menor es R16 Q27 T164> G16 Q27 T164> G16 E27 T164> R16 E27 T164> G16 Q27 I164.

Dentro de la población de pacientes se hallaron 6 haplotipos de los cuales el más frecuente fue el compuesto por Glicina, Glutamina y Threonina (G16 Q27 T164). Además, se hallaron los haplotipos R16 Q27 I164 y G16 E27 I164, los cuales no se encontraron en la

población de control y que corresponde a los menos frecuentes dentro de este grupo (Fig 7).

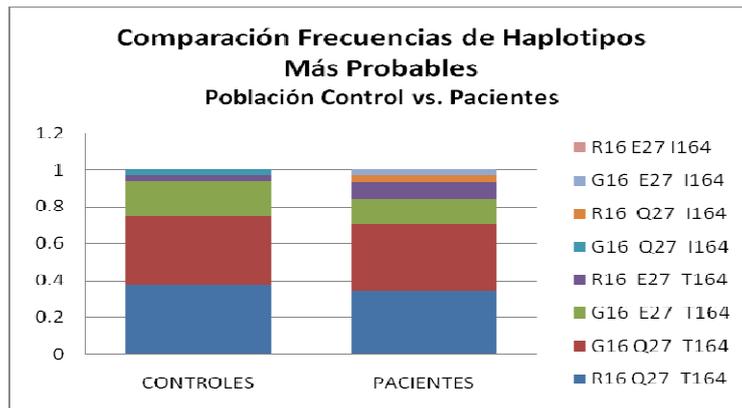


Figura 7. Distribución de Haplotipos en la Población control y de pacientes Afectados por FQ.

El análisis estadístico mediante la prueba de ji-cuadrado comparando el número de individuos encontrados con cada haplotipo entre la población control y la de pacientes afectados por Fibrosis Quística demostró diferencias estadísticas significativas, con un valor de $p = 0.0183$.

Adicionalmente, se determinó que los haplotipos G16E27I164 (OR= 12.7, IC95% 1.93-139) y R16Q27I164 (OR= 15.4, IC95% 1.56-120) están asociados con la población de pacientes con Fibrosis Quística.

6.4 CORRELACIÓN GENOTIPO DEL RECEPTOR BETA 2 ADRENÉRGICO -FENOTIPO PACIENTES AFECTADOS POR FIBROSIS QUÍSTICA

6.4.1 Alelos Polimórficos, Genotipo y Haplotipos vs. Variables Clínicas. Los pacientes afectados por Fibrosis Quística fueron clasificados según diversas variables clínicas las cuales se escogieron de acuerdo a su importancia en el desarrollo de la afección pulmonar para determinar la influencia o asociación del genotipo del receptor Beta-2 Adrenérgico con el desarrollo o severidad de esta enfermedad.

Las variables consideradas fueron: Colonización por *Pseudomonas aeruginosa*, Colonización por *Staphylococcus aureus*, Sinusitis, Bronquiectasias y Polipos (Tabla 11).

Adicionalmente se considero como una variable clínica el compromiso pulmonar, el cual se definió bajo lo descrito en la historia clínica del paciente que reportara alguna complicación asociada.

Con base en estas variables clínicas se realizó la comparación estadística del número de individuos encontrados en cada una respecto a los alelos de cada uno de los polimorfismos que portaban, al genotipo y al haplotipo.

En análisis de ji-cuadrado y de asociación mediante cálculo de OR para los alelos del polimorfismo 16 arrojó valores sugestivos de asociación para Colonización por *P.*

aeruginosa (OR = 1.60, IC 95% 0.7-3.6), Sinusitis (OR = 1.06, IC 95% 0.4-2.4), Polipos (OR = 1.10, IC 95% 0.3-3.6) y Bronquiectasias (OR = 1.11, IC 95% 0.4-2.8).

ALELO	VARIABLE CLÍNICA	p	OR
ALELO POLIMORFISMO 16 (R/G)	Colonización <i>P. aeruginosa</i>	0.26	1.60
	Colonización <i>S. aureus</i>	0.61	0.81
	Sinusitis	0.89	1.06
	Pólipos	0.88	1.10
	Bronquiectasias	0.83	1.11
	Compromiso pulmonar	0.91	0.89
ALELO POLIMORFISMO27 (Q/E)	Colonización <i>P. aeruginosa</i>	0.18	2.01
	Colonización <i>S. aureus</i>	0.39	1.54
	Sinusitis	0.98	1.01
	Pólipos	0.10	0.36
	Bronquiectasias	0.59	0.74
	Compromiso pulmonar	0.63	0.59
ALELO POLIMORFISMO 164 (T/I)	Colonización <i>P. aeruginosa</i>	0.47	0.59
	Colonización <i>S. aureus</i>	0.14	0.34
	Sinusitis	0.78	1.27
	Pólipos	0.24	0.37
	Bronquiectasias	0.27	0.43
	Compromiso pulmonar	0.56	1.92

Tabla 14. Análisis estadístico en relación a variables clínicas y alelos polimórficos.

El análisis estadístico para los alelos del polimorfismo 27 no mostró diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, llaman la atención los valores del OR obtenidos al analizar la Colonización por *Pseudomonas aeruginosa*, el cual es igual a 2 (IC

95% 0.7-5.6), para Colonización *S. aureus* (IC 95% 0.6-4.17) y Sinusitis (IC 95% 0.3-2.7), cuyo valor fue superior a 1.

El resultado encontrado para este polimorfismo y la presencia de pólipos (OR=0.39 IC95% 0.56-4.1) sugiere un efecto protector.

Finalmente, al analizar los alelos del polimorfismo 164 no se encontró ningún valor de p menor a 0.05 (Tabla 14). En cuanto a los valores de OR se encontró valores superiores a 1 para Sinusitis (IC 95% 0.2-6.7) y Compromiso Pulmonar (IC 95% 0.2-18)

Adicionalmente, y dado que el posible efecto modificador del Receptor Beta 2 Adrenérgico está dado por el genotipo de los alelos polimórficos (Busher et al, 2002), se realizó el mismo análisis antes mencionado comparando los genotipos de cada polimorfismo con respecto al fenotipo de los pacientes. Los resultados de éste análisis no demostraron diferencias significativas en cuanto a la distribución de los genotipos respecto a cada variable clínica, exceptuando la comparación del número de individuos con Fibrosis Quística que habían desarrollado Pólipos nasales y los que no, con respecto al genotipo del polimorfismo p.Q27E ($p=0.0099$).

Además de obtener este resultado se encontró que es 17.6 veces más probable que los pacientes afectados por Fibrosis Quística homocigotos para Glutamato en la posición 27 desarrollen Pólipos nasales (IC 95% 1.28-272), en comparación de los pacientes con el

genotipo heterocigoto T/I que tienen una probabilidad 2.6 veces mayor que los que tienen otro genotipo (IC 95% 0.3-43).

Con respecto a desarrollo de Bronquiectasias se determinó que los pacientes con genotipo heterocigoto T/I podrían tener un riesgo 3.1 veces mayor de producirlas en comparación de aquellos homocigotos T/T o I/I (IC 95% 0.3-53).

Respecto a éste polimorfismo se encontró que también puede estar involucrado en el proceso de Colonización por *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, elevando el riesgo de los pacientes afectados por Fibrosis Quística a 2.2 (IC 95% 0.27-39), y 2.6 (IC 95% 0.3-43), veces más cuando éstos son homocigotos I164I. Este genotipo también está implicado en el desarrollo de Sinusitis (OR=3.13, IC 95% 0.3-3.1).

Así mismo, se realizó el análisis estadístico para evaluar la distribución y asociación de los haplotipos con las variables clínicas de los pacientes con Fibrosis Quística.

Los resultados demostraron diferencias significativas en la distribución de los diferentes haplotipos exclusivamente en los pacientes con y sin Pólipos nasales ($p=0.0386$). Dentro de este grupo de personas se encontró un OR sugestivo de asociación con el haplotipo R16E27T164 (OR= 7.66, IC 95% 1.04-71).

Igualmente, en el grupo de pacientes con Bronquiectasias se encontró que es tres veces más probable el desarrollo de ésta condición al tener los G16 Q27 T164 y G16 E27 I164.

En las demás variables clínicas no se encontraron valores estadísticos que indiquen alguna asociación.

6.4.2 Alelos Polimórficos, Genotipos y Haplotipos vs. Fibrosis Quística Clásica y No Clásica. Los pacientes con Fibrosis Quística fueron clasificados según el tipo de Fibrosis Quística que tenían bajo los argumentos clínicos registrados en la historia médica; aquellos pacientes que tuvieran Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, Electrolitos en Sudor aumentados e Insuficiencia Pancreática Exocrina fueron incluidos en el grupo de pacientes con Fibrosis Quística Clásica, el resto pertenecía al grupo de Fibrosis Quística No Clásica.

En el primer grupo se encontraron 46 pacientes (66%), en el segundo grupo se encontraron 7 (10%) y el resto de pacientes no se incluyeron en ésta fenotipificación puesto que no se contaba con la historia clínica completa que aclarara la triada clásica.

El análisis del ji-cuadrado para los alelos polimórficos buscaba ver si la distribución alélica era similar entre el grupo de los pacientes con Fibrosis Quística Clásica y No Clásica. Este cálculo permitió ver que la única diferencia estadísticamente significativa que existe con respecto a estos dos grupos se da con respecto al polimorfismo 164, en el cual se obtuvo

un p igual a 0.0054, encontrando que el 90% de los pacientes con Fibrosis Quística Clásica tiene el alelo Treonina, mientras en el grupo de los pacientes con Fibrosis Quística No clásica fue el 100%.

Adicionalmente, se encontró que la frecuencia del alelo Glutamina en pacientes con Fibrosis Quística No Clásica es 2.86 veces mayor que en pacientes con Fibrosis Quística Clásica, aunque no se alcanza la significancia (IC95% 0.02-1.75).

Respecto a los genotipos se comprobó la hipótesis nula referente a que la distribución genotípica entre los dos grupos de pacientes era igual (no habían diferencias estadísticamente significativas) para los tres polimorfismos, puesto que en ningún caso se encontró un valor de p significativo ($p > 0.05$).

La distribución de los haplotipos se analizó entre los dos grupos, encontrando que ésta no representaba ninguna diferencia en particular.

6.4.3 Alelos Polimórficos, Genotipos y Haplotipos vs. Mutaciones en CFTR. Los pacientes con Fibrosis Quística han demostrado gran variabilidad fenotípica a pesar de tener el mismo genotipo, lo cual ha sido ampliamente observado en aquellos pacientes homocigotos para la mutación p.F508del. Estos pacientes pueden tener un grado diferente de expresión de la proteína CFTR lo que hace que sea muy heterogénea su presentación clínica.

Dado que se está evaluando la asociación de dos proteínas interactuando, el Receptor Beta 2 Adrenérgico y el Canal CFTR, se quiso determinar si existe alguna asociación entre los pacientes con Fibrosis Quística Homocigotos para la mutación p.F508del y los heterocigotos portadores de ésta mutación respecto a los alelos polimórficos, genotipos y haplotipos del Receptor Beta 2 Adrenérgico; es decir si estos dos locus están en desequilibrio de ligamiento sin ligamiento.

Dentro del grupo de pacientes con Fibrosis Quística se encontraron diversos genotipos respecto a las mutaciones en el gen CFTR, incluyendo las mutaciones p.F508del, G542X, N1303K, W1282X, S549N, 621+1G->T, R334W, R1162X, 1811+1.6KbA>G, 3120+1G>A y S549R. De éste grupo 38.6% eran homocigotos para la mutación p.F508del, el 41.4% eran heterocigotos que incluían ésta mutación, y el resto eran pacientes con otros genotipos que no involucraban ésta mutación.

Así, se dividieron los pacientes entre homocigotos para p.F508del, heterocigotos con esta mutación, y otros genotipos, y se compararon con los alelos, genotipos y haplotipos encontrados para el Receptor Beta 2 Adrenérgico, encontrando que no existe ningún tipo de asociación entre estos dos loci ($p > 0.05$).

7 DISCUSIÓN

Los genes modificadores han sido uno de los puntos más analizados para dar explicación a enfermedades hereditarias cuya presentación es heterogénea y compleja.

La Fibrosis Quística, enfermedad caracterizada dentro de las patologías mendelianas heredadas de manera autosómica recesiva, ha demostrado que la simplicidad de este tipo de herencia no es tan clara y que el estado pulmonar de un paciente afectado por ésta enfermedad no depende exclusivamente de las mutaciones que presente en el gen CFTR. Es por esto que se ha recurrido a proponer diferentes genes que por su localización o función podrían intervenir en la presentación clínica de dichas personas.

Dentro de estos genes se ha estudiado el gen del Receptor Beta 2 Adrenérgico, cuya ubicación yace principalmente en los bronquios, vasos sanguíneos, hígado, tracto gastrointestinal y músculo esquelético y cuya activación permite la broncodilatación.

Diversos estudios se han realizado para establecer la posible relación entre los polimorfismos de este receptor y enfermedades con compromiso pulmonar como Asma y Fibrosis Quística. Por ejemplo, Ligget y colaboradores realizaron estudios *in vitro* demostrando que polimorfismos de este receptor pueden ser responsables de la diferente respuesta a tratamiento dependiendo del genotipo; además, sus estudios caso-

control demostraron que no existe asociación entre asma y polimorfismos del gen del Receptor Beta 2 Adrenérgico pero si con la severidad de la enfermedad y las condición del paciente evaluado a través de pruebas funcionales como PEFV, FEV1, FVC, etc (Ligget, 1997).

En el estudio caso-control publicado por Busher y colaboradores en el año 2002 se propone el gen ADRB como modificador de la Fibrosis Quística, encontrando una mayor frecuencia del alelo R16 en los pacientes afectados por Fibrosis Quística. Además se reportó una asociación entre el alelo G16 y un peor curso de la enfermedad y mayor compromiso pulmonar (valores inferiores de FEV1) (Busher et al, 2002).

En estudios adicionales realizados por Steagall y colaboradores se observó una mayor frecuencia de los alelos polimórficos G16 y E27 en los pacientes que en los controles, y que además el haplotipo G16/E27 parecía tener implicaciones en cuanto a la respuesta al tratamiento de los pacientes mejorando su estado pulmonar (Steagall et al, 2007).

Estos resultados marcaron la pauta para querer determinar si en pacientes colombianos afectados por Fibrosis Quística hay asociación de los polimorfismos de ADBR2 con la enfermedad y su severidad.

- **GENÉTICA DE POBLACIONES: DISTRIBUCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS p.R16G, p.Q27E Y p.T164I DEL RECEPTOR BETA 2 ADRENÉRGICO**

En el presente estudio se logró determinar las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de tres polimorfismos del gen ADRB2 (p.R16G, p.Q27E y p.T164I) en una población control sana para Fibrosis Quística y un grupo de pacientes colombianos afectados por Fibrosis Quística.

La determinación de los genotipos para las dos poblaciones analizadas se realizó por conteo directo, y se verificó mediante el análisis de diferenciación genotípica entre poblaciones en GenePop v. 3.4. Adicionalmente, se pudo determinar mediante la prueba de equilibrio de Hardy Weinberg que la población estaba en equilibrio, es decir que el número de individuos observado para cada genotipo no era significativamente diferente al número de individuos esperado.

Las frecuencias genotípicas encontradas para el polimorfismo p.R16G permitieron determinar que es más frecuente el genotipo heterocigoto R/G en las dos poblaciones estudiadas representando el 60% en la población de pacientes y el 49% en los controles, seguidas del genotipo homocigoto G/G el cual se encontró en el 34% de la población de controles y en un 23% de los pacientes con Fibrosis Quística. Por lo tanto, el genotipo homocigoto R/R fue el menos frecuente encontrándose en el 17% de los dos grupos estudiados. Dada la similar distribución genotípica para este polimorfismo no se

encontraron diferencias significativas entre los dos grupos, permitiendo concluir que no existe una asociación entre un genotipo particular para este locus del Receptor Beta 2 Adrenérgico y los pacientes con FQ ($p > 0.05$) (Fig. 5).

El análisis estadístico realizado para comparar estos resultados frente a los obtenidos previamente en otras poblaciones control permitió determinar que no existen diferencias significativas en la distribución genotípica de este polimorfismo, observando la misma distribución de genotipos respecto a sus frecuencias (R/G > G/G > R/R). Sin embargo, en los pacientes afectados por FQ, los resultados son diferentes.

El estudio realizado por Busher y cols. encontró que el genotipo más frecuente después del heterocigoto R/G el cual representaba el 48% de la población de afectados, era el genotipo R/R, el cual se encontraba en el 37% de los pacientes. El genotipo G/G se hallaba, por defecto, en el 15% de ellos (Fig. 8).

A partir de estos resultados se hace obvia la diferencia hallada entre sus pacientes y los analizados en el presente estudio ($p < 0.05$), dado que la frecuencia del genotipo homocigoto R/R en nuestra población de afectados es la mitad de la encontrada en la población analizada por Busher (Busher et al, 2002).

La frecuencia del genotipo R/R en esa población la explican bajo el argumento de que el alelo G16 está asociado a fenotipos más severos de FQ y por ende a muerte temprana, lo

cual disminuye su frecuencia en esta población de pacientes cuya edad promedio es de 13 años. Sin embargo, los resultados encontrados por Steagall y cols. quienes estudiaron pacientes con edad promedio de 30 años no concuerdan con esta presunción (Steagall et al, 2007).

El estudio realizado por Steagall determinó que los genotipos más comunes en los pacientes con Fibrosis Quística eran en su orden G/G (47.7%) > R/G (44.5%)> R/R (7.7%), lo cual le permitió concluir que el alelo G16 podría estar influenciando la función pulmonar de los pacientes (Steagall et al, 2007).

Es importante señalar que estos dos trabajos han estudiado pacientes y población control caucásica, lo cual elimina la posibilidad de atribuir la diferencia de sus resultados al origen étnico de las poblaciones, al cual se han atribuido las divergencias halladas en grupos poblacionales estudiados para polimorfismos del Receptor Beta 2 Adrenérgico(Drysdale et al, 2000).

Estos resultados opuestos señalan que puede haber un sesgo en el estudio que no permite tener resultados unificados, como por el hecho de no tener en cuenta la composición genotípica en el gen CFTR de los pacientes, tener pacientes en diferentes condiciones de tratamiento y de un centro de atención que evita ver la amplia heterogeneidad genética que hay en el gen ADRB2. La otra posibilidad es que existan otros factores implicados en el curso de la enfermedad pulmonar asociada a la Fibrosis

Quística, que no aseguran una relación directa entre el genotipo del polimorfismo p.R16G y el curso de la enfermedad.

Los resultados de Steagall y cols. versus los hallados en el presente estudio revelan diferencias estadísticamente significativas ($p= 0.001$), debidas principalmente a la frecuencia del genotipo homocigoto G/G encontrada en esa población, la cual se encontró tres veces más que en la población de pacientes colombianos (Fig. 8).

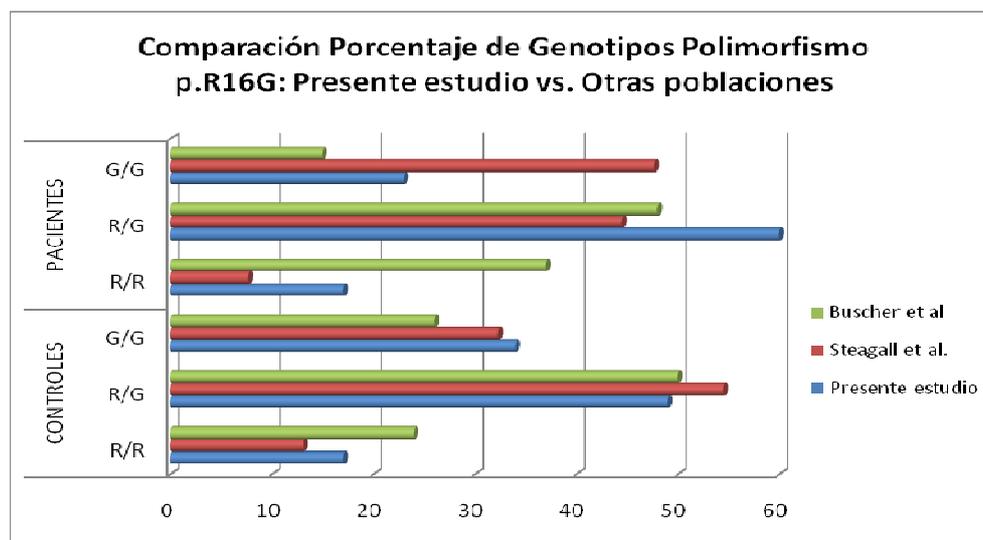


Figura 8. Porcentajes hallados para los genotipos del polimorfismo p.R16G en tres poblaciones analizadas (Buscher et al, 2002, Steagall et al, 2007).

Las diferencias encontradas entre el presente estudio y los otros trabajos publicados con anterioridad pueden deberse a sesgos de selección inherentes de cada estudio, estratificación poblacional, al número de pacientes analizados en otros estudios el cual supera en casi el doble el número de pacientes de ésta investigación aumentando la

probabilidad de encontrar otros genotipos o a ligamiento de mutaciones en CFTR y polimorfismos del receptor Beta 2 Adrenérgico (lo cual se discutirá en breve).

Estos resultados son comparables con los estudios de Buscher y cols. (Buscher et al, 2002) y Steagall y cols. (Steagall et al, 2007), quienes buscaban determinar si los polimorfismos del receptor Beta 2 Adrenérgico contribuyen al estado de enfermedad y curso de la Fibrosis Quística, incluyendo al polimorfismo p.Q27E.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos para los controles, solo se puede realizar comparando con los datos de Steagall, dado que los datos de Buscher no son explícitos en éste caso.

Steagall y cols. (Steagall et al, 2007) encontraron que el 90% de su población control estaba compuesta la mitad del genotipo Q/Q y la otra mitad genotipo Q/E, y solo el 10% tenía el genotipo E/E. Estos resultados son estadísticamente diferentes de los encontrados en este estudio ($p= 0.0127$), dado principalmente por la diferencia en la distribución del genotipo Q/Q, que en nuestra población se encontró en el 62% de las personas estudiadas, mientras en el estudio de Steagall se encontró en el 45%, sobrellevando la diferencia con el aumento de la frecuencia del genotipo Q/E.

Steagall y cols. tenían en total 130 controles, que en comparación con la población analizada en este estudio no sugiere algún sesgo de selección. Estas diferencias pueden

deberse a características poblacionales inherentes, con predominio del alelo Q en nuestra población.

En los pacientes analizados en el estudio de Busher y cols. (Busher et al, 2002) y en el de Steagall y cols. (Steagall et al, 2007) se encontró que aproximadamente el 48% de ellos eran genotípicamente Q/E, seguido de Q/Q (37%) y Q/E (15%) en la población de pacientes analizada por Busher y cols, mientras que para los individuos analizados por Steagall y cols., fue más frecuente el genotipo E/E (29%) y finalmente Q/Q (23%).

El análisis estadístico realizado para comparar los resultados de estos dos estudios previos y el presente permitió determinar que existen diferencias significativas en la distribución de genotipos del polimorfismo p.Q27E entre pacientes de las diferentes poblaciones ($p < 0.05$).

Dado que los genotipos y sus frecuencias son la consecuencia de las combinaciones de los alelos presentes en una población, los resultados de éste estudio demuestran la prevalencia del alelo Q en los pacientes colombianos, la cual es muy superior a la frecuencia del alelo E, caso contrario a los estudios realizados previamente en población caucásica que muestran que las frecuencias de los dos alelos son semejantes.

El polimorfismo p.T164I no ha sido estudiado ampliamente como los otros dos dada su baja distribución alélica en las diferentes poblaciones, sin embargo, su importancia funcional demostrada *in vitro* e *in vivo* lo hace relevante para el estudio del Receptor Beta 2 Adrenérgico como modificador de la Fibrosis Quística (Ligget, 1997).

En el análisis del polimorfismo p.T164I se encontró que el genotipo T/T es el más frecuente en las dos poblaciones analizadas, lo cual se suponía dada la baja frecuencia reportada para el alelo I164 en previos estudios (Ligget et al, 1997, Busher et al, 2002, Steagall et al, 2007). Además, el análisis estadístico mediante la prueba de ji-cuadrado demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos.

Buscher y cols., reportaron una frecuencia de 0.96 para el genotipo T/T en los pacientes, mientras que en nuestra población su frecuencia fue de 0.89. Esto indirectamente significa que hay un aumento de la frecuencia del alelo I164 en nuestra población, dado por el evento de haber encontrado un individuo homocigoto I/I entre los 70 analizados. Este genotipo no ha sido hallado en ninguna población estudiada hasta ahora.

La frecuencia de éste genotipo estimado matemáticamente bajo la frecuencia hallada del alelo I164 en los pacientes de Busher y cols. es de 0.0004, en nuestra población fue de 0.1. Estas diferencias fueron diferentes estadísticamente ($p= 0.031$).

Adicionalmente, y dado que no se ha reportado anteriormente la existencia de un individuo homocigoto p.1164I, y a pesar de haber verificado molecularmente este genotipo por duplicado, se recomienda la secuenciación de dicha muestra para terminar de confirmar estas conclusiones.

Respecto a las frecuencias alélicas encontradas en este estudio para los tres polimorfismos se determinó que había prevalencia de los alelos G16, Q27 y T164 en las dos poblaciones analizadas.

Las frecuencias de los alelos R16 y G16 encontradas en la población control no fueron estadísticamente diferentes a las encontradas en otras poblaciones. Sin embargo, en los pacientes se encontró que había diferencias significativas en la frecuencia de estos polimorfismos respecto a lo publicado por Steagall y cols, quienes tenían una frecuencia tres veces mayor del alelo G16 en los pacientes.

En ese trabajo se realizó un estudio caso-control pareado con 130 individuos de cada muestra poblacional cuyos resultados han demostrado diferencias con los otros trabajos publicados.

En previos reportes se ha concluido que hay diferencias en la frecuencia de los alelos polimórficos para el Receptor Beta 2 Adrenérgico según el origen étnico (Drysdale et al, 2000). A pesar que en la investigación de Steagall y cols. se hayan analizado pacientes de

origen caucásico y en la presente investigación se estudien pacientes étnicamente mezclados, al no encontrar diferencias entre las frecuencias de los controles de este estudio y los demás, sugiere que esta no es causa de la diferencia hallada entre estas dos investigaciones, a menos que los polimorfismos del receptor Beta 2 Adrenérgico estén en desequilibrio de ligamiento con mutaciones en CFTR.

Es de resaltar que las observaciones de Steagall y cols. van en contravía comparando con lo reportado por Busher y cols., quienes concluyen que el alelo G16 está asociado con el curso y severidad de la enfermedad pulmonar en los pacientes con Fibrosis Quística, y que el hecho de encontrar aumentada la frecuencia del alelo R16 en su población de pacientes se debe a la mortalidad temprana de los pacientes G16G. Sin embargo, Steagall estudia pacientes con promedio de edad de 30 años, mientras Busher tiene pacientes alrededor de 13 años. Estos resultados sugieren que existe un sesgo de selección de muestra, y que debía ampliarse o bien el número de pacientes y de controles o aumentar la relación de controles: pacientes.

En el presente estudio se analizaron 70 pacientes: 192 controles alcanzando un poder de 83%. Estos dos grupos fueron obtenidos del mismo centro asistencial. Los pacientes cuyo ADN pertenece al banco de ADN de la Universidad del Rosario pertenecen a diferentes regiones del país y representan gran variabilidad genética en el gen CFTR.

Por lo tanto, con lo encontrado para el polimorfismo 16 en nuestra población se puede afirmar que no existe relación entre los alelos del polimorfismo 16 y la Fibrosis Quística, y que al contrario de lo reportado para otras poblaciones se encuentra con más frecuencia el alelo G16. En cierta forma esto es de esperarse, ya que no existe una relación causal entre polimorfismos del Receptor Beta Dos Adrenérgico y la Fibrosis Quística, sin embargo esto no descarta que no funcione como modificador de la enfermedad.

Respecto al polimorfismo Q27E se encontró mayor frecuencia del alelo silvestre en las dos poblaciones sin encontrar diferencias significativas entre ellas. La comparación estadística de los datos obtenidos por estudios previos respecto a este trabajo permitió determinar que las frecuencias en las poblaciones no afectadas por Fibrosis Quística son similares y que la frecuencia de estos alelos en la población de pacientes fue semejante a la publicada por Busher y cols (Busher et al, 2002). No obstante, la frecuencia reportada por Steagall y cols. si fue significativamente diferente a la reportada en este estudio ($p < 0.05$). Se puede decir que esta diferencia se ha dado principalmente porque en dicha publicación encontraron mayor frecuencia del alelo E27 en los pacientes afectados contrario a lo que encontraron en los controles cuyo alelo más frecuente fue el silvestre. En nuestra población se encontró de dos a tres veces más el alelo Q27 en ambas poblaciones. Esta observación ha sido compartida por otras publicaciones (Drysdale et al, 2000, Busher et al, 2002, Hart et al, 2005).

Las razones por las cuales se puede haber dado esta diferencia pueden ser las mismas anteriormente discutidas para el polimorfismo R16G.

En resumen, el polimorfismo 27 no se encontró asociado con la Fibrosis Quística dado que la frecuencia del alelo Q27 fue mayor a la del alelo E27 y similar en las dos poblaciones analizadas.

El estudio del polimorfismo p.T164I se ha centrado hasta el momento es la relevancia que tiene en cuanto a la respuesta al tratamiento de pacientes asmáticos. Exclusivamente, Buscher y cols. determinaron la frecuencia alélica para este locus en población sana y con Fibrosis Quística, encontrando que la frecuencia del alelo I164 era inferior al 5%, tal como lo habían descrito previas publicaciones (Reishaus et al, 1993, Busher et al, 2002).

En el presente estudio, el análisis de esta variante permitió determinar que en las poblaciones analizadas existe diferencia en la distribución alélica de este locus, dada principalmente por la frecuencia del alelo I164, el cual es más común en la población de pacientes afectados por Fibrosis Quística (0.06 vs 0.02), siendo superior a la reportada en anteriores publicaciones para cualquier población analizada (Reishaus et al, 1993, Johnson, 1998, Busher et al, 2002).

El aumento en la frecuencia de este alelo en la población de afectados se debe principalmente a la existencia del genotipo I/I en un paciente, lo cual aumentó en un 1% la

frecuencia de este alelo respecto a las demás poblaciones que no han reportado ningún individuo con este genotipo. Este resultado presupone una asociación entre los pacientes afectados con Fibrosis Quística y el polimorfismo p.T164I ($p= 0.02$ OR=0.35) como agente protector, sin embargo esta asociación no se comprobó estadísticamente.

A pesar de las diferencias encontradas entre nuestras poblaciones, no se encontró diferencia significativa frente a las frecuencias publicadas por Busher ($p=0.228$), sin embargo, es posible que incrementando la muestra de pacientes colombianos se aumente la frecuencia del polimorfismo y se marquen diferencias que pueden tener un origen étnico particular o se normalice la frecuencia frente a las demás poblaciones.

A partir de los 2 alelos posibles en cada uno de los 3 locus analizados se pueden obtener 8 haplotipos: R16 Q27 T164, R16 E27 T164, G16 Q27 T164, G16 E27 T164, G16 Q27 I164, G16 E27 I164, R16 Q27 I164 y R16 E27 I164; De estas posibilidades, y determinando por medio del programa Arlequin v. 3.1 los haplotipos más probables de acuerdo a la información genotípica de cada individuo, se encontró que en la población control existen 5 de los 8 haplotipos posibles en los cuales el más frecuente estaba compuesto de los tres alelos "silvestres" y el menos frecuente el conformado por los alelos polimórficos. En esta población no se encontraron los haplotipos G16 E27 I164, R16 Q27 I164 y R16 E27 I164.

El haplotipo G16 E27 I164 no fue hallado en la población dado que no se encontró ningún individuo homocigoto G/G y E/E como se ha reportado anteriormente (Busher et al, 2002), dado por desequilibrio de ligamiento en estos loci y demostrado por el análisis realizado en Genepop que sugiere que los genotipos sobre el locus p.R16G no son independientes de los genotipos sobre el locus p.Q27E en esta población. Adicionalmente, los individuos heterocigotos que tenían en el locus p.T164I el alelo I164, tuvieron el haplotipo G16 Q27 I164 como el más probable.

El haplotipo R16 Q27 I164 podría haberse presentando en los dos individuos heterocigotos hallados para los loci p.R16G y p.T164I, sin embargo, la probabilidad de los haplotipos conformados por R16 Q27 T164 y G16 Q27 T164 fue mayor.

El haplotipo R16 E27 I164 no se halló en la población ya que no se encontró ningún individuo con el alelo E27 y el alelo I164, lo cual podría significar un desequilibrio de ligamiento entre estos dos loci. Esta hipótesis no se ha validado de manera estadística ($p = 0.8$) y es refutable al considerar los resultados de los pacientes.

En los pacientes afectados por Fibrosis Quística se encontraron seis de los haplotipos posibles, que de más frecuente a menos frecuente son: G16 Q27 T164, R16 Q27 T164, G16 E27 T164, R16 E27 T164, R16 Q27 I164 y G16 E27 I164 (Tabla 13); De estos haplotipos los dos últimos no fueron encontrados en los controles, lo cual sugiere una asociación entre

estos haplotipos y la enfermedad demostrada en la prueba de ji-cuadrado y el test exacto de Fisher ($p = 0.0183$).

En análisis estadístico demuestra que es 12 veces más probable encontrar el haplotipo G16 E27 I164 en un paciente con FQ que en una persona sana, al igual que casi dieciséis veces encontrar el haplotipo R16 Q27 I164. Este hallazgo es reportado por primera vez para los pacientes con Fibrosis Quística puesto que no se ha analizado previamente los haplotipos de los polimorfismos del gen ADRB2 en ésta población, sin embargo este estudio si se ha realizado en pacientes asmáticos, encontrando mayor prevalencia del haplotipo G16 Q27 en pacientes con asma más severa, insinuando que estas variantes pueden estar asociadas al estado y severidad de la enfermedad pulmonar.

En el caso de los pacientes con FQ (como se discute a continuación) se encontraron valores de OR altos pero no significativos respecto a este haplotipo y el desarrollo de bronquiectasias y Fibrosis Quística Clásica.

En este estudio se evidencia la asociación por lo tanto es muy importante tener en cuenta estas variantes en conjunto, que aparte de estar involucradas con mayores grados de severidad se han asociado con la respuesta al tratamiento.

A estas diferencias se suma el hecho de no encontrar en los pacientes el haplotipo G16 Q27 I164 hallado en los controles. Este haplotipo si se hubiera podido encontrar en esta

población dado que se contaba con pacientes R/R Q/Q T/I, G/G Q/E T/I, R/G Q/E T/I y R/G Q/E I/I. Sin embargo, el hecho de encontrar como más probable otro haplotipo puede ser explicado por que es más posible encontrar los haplotipos que involucren menos cambios a partir de los alelos normales, es decir, es más factible pensar en encontrar haplotipos formados por los alelos R16 Q27 T164 y su homólogo igual o con un solo cambio de un alelo, que haplotipos con más de un cambio en cada cromosoma.

De estos resultados se puede concluir que existen diferencias significativas entre los haplotipos encontrados en los pacientes y los controles, con asociación de los haplotipos G16 E27 I164 y R16 Q27 I164 y la Fibrosis Quística.

- **CORRELACIÓN POLIMORFISMOS DEL RECEPTOR BETA 2 ADRENÉRGICO Y FENOTIPO DE LOS PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA**

El receptor Beta 2 Adrenérgico ha sido estudiado como modificador de la enfermedad pulmonar de los pacientes con Fibrosis Quística. Los polimorfismos más comunes de su gen, p.R16G, p.Q27E y p.T164I han sido asociados directamente con la respuesta a tratamiento y el curso y severidad de la enfermedad pulmonar (Liggett, 1997, Busher et al, 2002, Drumm et al, 2005, Steagall et al, 2007).

En el presente estudio, hasta el momento, se ha determinado que de los tres polimorfismos estudiados el alelo I164 está asociado con la Fibrosis Quística. Sin embargo,

para evaluar la relación entre los pacientes con Fibrosis Quística y estas variantes génicas, se hizo necesario tener variables clínicas cualitativas que se pudieran relacionar con el curso de la enfermedad pulmonar presente en los pacientes.

El análisis de las variables clínicas demostró que aquellos pacientes con el genotipo E/E tiene 18 veces más posibilidades de desarrollar pólipos nasales de aquellos que tienen otro genotipo en esta posición, demostrando asociación estadísticamente significativa. Sin embargo, a pesar de que en el análisis de las variables clínicas se encontró que existe el doble de probabilidad de que aquellos pacientes con Fibrosis Quística que tienen el genotipo homocigoto E/E desarrollen la Colonización por *P. aeruginosa* estos datos no se consideran estadísticamente significativos. Esto pudo ser dado por el número de pacientes dentro de cada categoría clínica lo que hace que exista una alta posibilidad de que no se esté representando a la población afectada en un amplio rango, y por lo cual no se hace posible asegurar esta asociación.

Al analizar las asociaciones halladas para los haplotipos R16 Q27 T164 y G16 E27 I164 con el desarrollo de pólipos, y del haplotipo G16 Q27 T164 con el desarrollo de bronquiectasias, se presenta el mismo fenómeno que en el caso anterior, los valores del OR eran altos pero no significativos.

Los pacientes con Fibrosis Quística fueron entonces subdivididos entre aquellos con la triada clásica de la FQ y aquellos que no tenían FQ clásica para determinar si existía alguna

asociación alélica, genotípica o haplotípica y esta condición. Los resultados mostraron que es significativamente mayor la frecuencia del alelo I164 en los pacientes con Fibrosis Quística clásica que en los pacientes con Fibrosis Quística No Clásica ($p=0.0054$). Si se tiene en cuenta que la distinción entre los pacientes con FQ clásica y no clásica se realizó bajo el parámetro de tener o no la triada clásica de la enfermedad y que todos los pacientes considerados acá como con FQ clásica tienen compromiso pulmonar, se puede sugerir que este alelo está involucrado directamente con el grado de afección de la vía respiratoria de los pacientes, lo cual debe ser confirmado con pruebas de función pulmonar y otros exámenes paraclínicos. Adicionalmente, como se ha reportado previamente, se ha relacionado este polimorfismo con menor grado de respuesta a broncodilatadores, lo cual es de gran importancia en el manejo de estos pacientes y debería tenerse en cuenta para mirar otras vías de tratamiento (Ligget, 1997).

Este alelo no ha sido estudiado con anterioridad en estudios caso control, debido a la baja frecuencia de éste en la población. Sin embargo, ésta premisa no ocurrió en la población colombiana cuya frecuencia fue superior al 1% reportada previamente.

Hasta donde llega la investigación previa a este estudio se puede afirmar que éste el primer reporte que llega a esta conclusión.

Adicionalmente, en este grupo de pacientes se encontró que es 2.4 veces más probable encontrar el haplotipo G16 Q27 T164 en los pacientes con Fibrosis Quística clásica que en

los pacientes con Fibrosis Quística clásica, sin embargo, este valor no alcanzó la significancia estadística requerida, y merece evaluarlo en una población mayor de pacientes.

Es importante tener en cuenta que estos pacientes con este haplotipo han sido encontrados con mayor frecuencia entre el grupo de pacientes colombianos, y que este haplotipo precisamente ha sido vinculado con una mayor respuesta a tratamiento dado un posible efecto protector del alelo Q27 y el menor grado de desensibilización del alelo G16, características atribuidas en estudios previos (Steagall et al, 2007).

- **ANÁLISIS DE LOCI GEN ADRB2 Y GEN CFTR: DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO**

En anteriores publicaciones se había descrito la posibilidad de tener dos loci del gen ADRB2 en desequilibrio de ligamiento, ya que no se ha encontrado individuos homocigotos R/R y E/E (Busher et al, 2002). Con este antecedente se intento probar esta hipótesis mediante el análisis de desequilibrio de ligamiento del programa Genepop v.3.4. Este análisis se realizo para cada población y los diferentes loci, encontrando que existe desequilibrio de ligamiento entre el locus p.R16G y p.Q27E en los controles. Este resultado se comprobó al detalle al no encontrar ningún individuo con los genotipos R/R y E/E. Este resultado siguió el mismo comportamiento en los pacientes, sin embargo la muestra no permitió determinar la diferencia estadística esperada.

Finalmente, se realizó el análisis estadístico mediante la prueba de Fisher para determinar si existía alguna diferencia en la distribución alélica, genotípica o haplotípica de los polimorfismos del receptor Beta 2 adrenérgico y el genotipo de los pacientes en el gen CFTR, con el fin de evidenciar alguna asociación de loci o desequilibrio de ligamiento sin ligamiento, en dado caso que existiera. Los resultados no demostraron ninguna diferencia significativa en cuanto a esta distribución, por lo cual se rechazó esta hipótesis.

8 CONCLUSIONES

- Los pacientes afectados por Fibrosis Quística y los controles no presentan diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la distribución genotípica de los polimorfismos del receptor $\beta 2$ Adrenérgico, siendo los genotipos R/G, Q/Q y T/T los más frecuentes en las dos poblaciones.
- Los alelos G16, Q27 y T164 son los más frecuentes en los pacientes afectados por Fibrosis Quística y los controles, sin embargo el análisis de la última variante demuestra diferencia estadística en la distribución del alelo I164, el cual es más común en la población de pacientes afectados por Fibrosis Quística sin alcanzar asociación (OR no significativo).
- Los haplotipos G16 E27 I164 y R16 Q27 I164 alcanzaron un grado alto de asociación con los pacientes con Fibrosis Quística.
- El genotipo E/E y el haplotipo R16 E27 T164 están asociado con el desarrollo de pólipos en los pacientes con Fibrosis Quística.
- El haplotipo G16 Q27 T164 es el más frecuente en la población de pacientes colombianos afectados por Fibrosis Quística, y puede ser útil en el manejo de tratamiento individualizado de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica mediante broncodilatadores individualizando su manejo.
- Los resultados obtenidos en este estudio difieren significativamente de los reportados en otras publicaciones, especialmente para los pacientes con Fibrosis Quística, demostrando el grado de importancia en el origen étnico y la estratificación poblacional.

- Los loci p.R16G y p.Q27E del Receptor β 2 adrenérgico se encuentran en desequilibrio de ligamiento.
- En el presente estudio se reportan por primera vez los haplotipos asociados a los pacientes con Fibrosis Quística.

9 RECOMENDACIONES

- **RECOMENDACIONES TÉCNICAS**

- La PCR Alelo específica requiere de altas concentraciones de ADN con alto grado de pureza, el manejo de componentes que permitan variabilidad y ensayos múltiples a diferentes concentraciones, especialmente variando concentración de Cloruro de Magnesio, ADN y primers. Adicionalmente requiere un alto grado de precisión, y para que los resultados sean repetibles deben manejarse y controlarse la mayor cantidad de variables técnicas posibles (pipetas, termocicladores, etc)
- Se recomienda empezar por escalera de Cloruro de Magnesio y Temperaturas, Probar controles secuenciados a diferentes concentraciones de ADN y minimizar errores de genotipificación por exceso o defecto, y si es necesario, corregir la concentración de los primers.

- **RECOMENDACIONES PARA EL FUTURO**

- Repetir el estudio aumentado significativamente la muestra de pacientes afectados para corroborar o descartar asociaciones y confirmar la predominancia de los genotipos, alelos y haplotipos hallados en éste estudio.

- Evaluar la condición específica de la vía respiratoria de los pacientes mediante pruebas de función pulmonar y relacionarlas con la información genética del gen ADRB2.
- Evaluar el grado de respuesta al tratamiento de los pacientes con el haplotipo G16 Q27 T164, y aquellos con haplotipos diferentes.

BIBLIOGRAFIA

1. Billington, C., Penn, R. *Signaling and Regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle*. Respir Res 2003; 4:2.
2. Bronsveld, I., Mekus, F., Bijman, J., Manfred, B., De Jonge, H.R., Laabs, U., Halley, D.J., Ellemunter, H., Mastella, G., Thomas, S., Veeze, H.J., Tümmler, B. *Chloride conductance and genetic background modulate the cystic fibrosis phenotype of $\Delta F508$ homozygous twins and siblings*. J Clin Invest 2001; 108: 1705-1715.
3. Busher R., Eilmes, K.J., Grasemann, H., Torres, B., Knauer, N., Sroka, K., Ratjen, F. *$\beta 2$ adrenoceptor gene polymorphisms in cystic fibrosis lung disease*. Pharmacogenetics 2002; 12: 347-353.
4. Collins, Francis. *Cystic Fibrosis: Molecular Biology and Therapeutic Implications*. Science 1992; 256: 774-779.
5. Corvol, H., Nathan, N., Charlier, C., Chadelat, K., Le Rouzic, P., Tabary, O., Fauroux, B., Henrion-Caude, A., Feingold, J., Boelle, P. Clement, A. *Glucocorticoid receptor gene polymorphisms associated with progression of lung disease in young patients with cystic fibrosis*. Respir Res 2007, 8:88.
6. Crystal, R. *Bad for cats, good for humans? Modified feline immunodeficiency virus for gene therapy*. J Clin Invest 1999; 104:11:1491-1492.
7. Davies. J.C., Turner, M.W., Klein, N. *Impaired pulmonary status in cystic fibrosis adults with two mutated MBL-2 alleles*. Eur Respir J 2004; 24: 798–804.

8. Davis, Pamela. *Cystic Fibrosis Since 1938*. Am J Respir Crit Care Med 2006; 173: 475-482.
9. De Gracia, J., Alvarez, A., Casals, T., Gatner, S., Vendrell, M., De la Rosa, D., Guarner, L. *Genotype-Phenotype correlation for pulmonary function in cystic fibrosis*. Thorax 2005;60:558-563.
10. Dorfman, R., Sandford, A., Taylor, C., Huang, B., Frangolias, D., Wang, Y., Sang, R., Pereira, L., Sun, L., Berthiaume, Y., Tsui, L., Paré, P., Durie, P., Corey, M., Zielenski, J. *Complex two-gen modulation of lung disease severity in children with cystic fibrosis*. J Clin Invest 2008; 118: 1040-1049.
11. Drumm, M., Konstan, M.W., Schluchter, M.D, Pace, R., Handlerm A., Zous, F., Zariwala, M., Fargo, D., Xu, A., Dunn, J.M., Darrah, R.J., Dorfman, R., Sandford, A., Corey, M., Zielenski, J., Durie, P., Goddard, k., Yankaskasm J.R., Wright, F.A., Knowles, M.R. *Genetic Modifiers of Lung Disease in Cystic Fibrosis*. NEJM 2005; 353;14.
12. Drysdale, C.M., McGraw, D.W., Stack, C.B., Stephens, J.C., Judson, R.S., Nandabalan, K., Arnold, K., Ruamo, G., Liggett, S.B. *Complex promoter and coding β 2-adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict in vivo responsiveness*. PNAS 2000; 97:19:10483-10488.
13. Excoffier, L., Slatkin, M. *Maximum-Likelihood Estimation of Molecular Haplotype Frequencies in a Diploid Population*. Mol. Biol. Evol. 1995; 12(5):921-927.

14. Gabolde, M., Guilloud-Bataille, M., Feingold, J., Besmond, C. *Association of variant alleles of mannose binding lectin with severity of pulmonary disease in cystic fibrosis: cohort study.* BMJ 1999; 319: 1166-7.
15. Gallati, Sabina. *Genetics of Cystic Fibrosis.* Semin Respir Crit Care Med 2003; 24: 629-638.
16. Garred, P., Pressler, T., Madsen, H.O., Frederiksen, B., Svejgaard, A., Hoiby, N., Schwartz, M., Koch, C. *Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis.* J. Clin. Invest 1999; 104:431-437.
17. Geller, D., Rubin, B. *Respiratory Care and Cystic Fibrosis.* Respir Care 2009;54(6): 796-800.
18. Gibson LE, Cooke RE. *A test for concentration of electrolytes in sweat in Cystic Fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis.* Pediatrics 1959; 23: 545-549.
19. Grasemann, H., Van's Gravesande, K.S., Buscher, R., Knauer, N., Silverman, E.S., Palmer, L.J., Drazen, J.M., Ratjen, F. *Endothelial Nitric Oxide Synthase Variants in Cystic Fibrosis Lung Disease.* Am J Respir Crit Care Med 2003;167: 390–394.
20. Hart, M., Konstan, M.W., Darrahm R.J., Schluchter, M.D., Isser, A., Xue, L., Londono, D., Goddard, K., Drumm, M.L. *Beta 2 adrenergic polymorphisms in Cystic Fibrosis.* Ped Pulmunol 2005; 39: 544-550.

21. Henry, M.T., Cave, S., Rendall, J., O'Connor, C., Morgan, K., FitzGerald, M., Kalsheker, N. *An alpha1-antitrypsin enhancer polymorphism is a genetic modifier of pulmonary outcome in cystic fibrosis.* Eur J Hum Genet 2001; 9, 273 ± 278.
22. Hull, J., Thomson, A.H. *Contribution of genetic factors other than CFTR to disease severity in cystic fibrosis.* Thorax 1998;53: 1018–1021.
23. Jay, M., Mateus, H., Fonseca, D., Restrepo, C., Keyeux, G. *PCR Heteroduplex por Agrupamiento: Implementación de un método de identificación de portadores de la mutación más común Causal de Fibrosis Quística en Colombia.* Colomb Méd 2006; 37(3):176-182.
24. Johnson, M. *Molecular mechanisms of b2-adrenergic receptor function, response, and regulation.* J Allergy Clin Immunol 2006; 117: 1: 18-24.
25. Johnson, M. *The β-adrenoceptor.* Am J Respir Crit Care Med 1998; 158: S146–S153.
26. Johnson, M., *Beta 2 adrenoceptors: Mechanisms of action of β2-Agonists.* Ped Respir Rev. 2001; 2: 1:57-62.
27. Karczeskia, B., Cuttinga, G. *Diagnosis of Cystic Fibrosis, CFTR-Related Disease and Screening.* Prog Respir Res 2006; 34:69-76.
28. Kerem, B., Rommens, J., Buchanan, J., Markiewicz, D., Cox, T., Chakravarti, A., Buchwald, M., Tsui, L. *Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Genetic Analysis.* Science 1989; 245:1073-1080.

29. Kerem, E., Corey, M., Kerem, B-S., et al. *The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis -- analysis of the most common mutation (δF_{508}).* NEJM 1990; 323: 1517-1522.
30. Kobilka, B.K., Frielle, T., Collins, S., Yang-Feng, T., Kobilka, T.S., Francke, U., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. *An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins* Nature 1989; 329, 75-79.
31. Kohout, T., et al. *Regulation of G Protein-Coupled Receptor Kinases and Arrestins During Receptor Desensitization.* Mol Pharmacol 2003; 63: 9–18.
32. Lai, H.J, Cheng, Y., Cho, H., Kosorok, M., Farrell, P. *Association between Initial Disease Presentation, Lung Disease Outcomes, and Survival in Patients with Cystic Fibrosis.* Am J Epidemiol 2004; 159:537- 546.
33. Le Grys, V., Yankaskas, J., Quittell, L., Marshall, B., Mogayzel, P. *Diagnostic Sweat Testing: The Cystic Fibrosis Foundation Guidelines.* J Pediatr 2007;151: 85-9.
34. Ligget, S. *$\beta 2$ adrenergic polymorphisms and Asthma.* Am J Respir Crit Care Med 1997; 156: S156-S162.
35. Mahadeva, R., Stewart, S., Bilton, D., Lomas, D.A. *Alpha-1 antitrypsin deficiency alleles and severe cystic fibrosis lung disease.* Thorax 1998; 53: 1022–1024.
36. Mason, P. *Cystic Fibrosis-the disease.* Hospital Pharmacist 2005; 12: 201-207.
37. Mateus, H. *Identificación de Mutaciones y Correlación Genotipo-Fenotipo en pacientes Colombianos afectados por Fibrosis Quística.* 2005.

38. Mateus, H., Fonseca, D., Sanchez, L., Peñaloza, I., Forero, D., Perdomo, P., Quiasua, D., Ramirez, A., Montoya, L., Perez, L., Amado, H., Molano, J., Amaya, S., Duran, M., Cardenas, V., Guevara, K., Parga, D., Esparrogosa, C. *Frecuencia de la mutación F508del en estudiantes de la Facultad de Medicina de la Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia*. *Colomb. Med* 2007; 38: 4.
39. McGraw, D.W., Liggett, S.B. *Molecular Mechanisms of β_2 -Adrenergic Receptor Function and Regulation*. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2: 292-296.
40. McKone, E.F., Edwards, K.L., Emerson, S.S., Aitken, M.L. *Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: a retrospective cohort study*. *Lancet* 2003; 361:1671-1676.
41. McKone, E.F., Goss, C.H., Aitken, M.L. *CFTR Genotype as a Predictor of Prognosis in Cystic Fibrosis*. *Chest* 2006; 130:5: 1441-1447.
42. Mekus, N., Ballmann, M., Bronsveld, I., Bijman, J., Veeze, H., Tummler, B. *Categories of deltaF508 homozygous cystic fibrosis twin and sibling pairs with distinct phenotypic characteristics*. *Twin Res* 2000; 3:277-293.
43. Naren, A.P., Cobb, B., Li, C., Roy, K., Nelson, D., Heda, G., Liao, J., Kirk, K.L., Sorscher, E.J., Hanrahan, J., Clancy, J.P. *A macromolecular complex of β_2 adrenergic receptor, CFTR, and ezrin radixin moesin-binding phosphoprotein 50 is regulated by PKA*. *PNAS* 2003; 100:1:342-346.
44. Newton, C.R., Graham, A., Hetinstall, L.E., Powell, S.J., Summers, C., Kalshekerl, N., Smith, J.C., Markham, A.F. *Analysis of any point mutation in DNA. The*

- amplification refractory mutation system (ARMS)*. *Nuc Ac Res* 1989; 17:7: 2503-2516.
45. Noone, P., Knowles, M. *CFTR-opathies: disease phenotypes associated with cystic fibrosis transmembrane regulator gene mutations*. *Respir Res* 2001, 2:328-332.
46. Ortega, Luis. *Fibrosis Quística. Aspectos Diagnósticos*. *Colomb Med* 2007; 38 (1):41-49.
47. Ratjen, F. *Cystic Fibrosis: Pathogenesis and Future Treatment Strategies*. *Respir Care* 2009; 54(5):595-602.
48. Reishaus, E., Innis, M., MacIntyre, N., Liggett, S.B. *Mutations in the gene encoding for β 2-adrenergic receptor in normal and asthmatic subjects*. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1993; 8: 334-339.
49. Riordan, J., Rommens, J., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczack, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J., Drumm, M., Iannuzzi, M., Collins, F., Tsui, L. *Identification of Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA*. *Science* 1989; 245:1066-1072.
50. Rommens, J., Iannuzzi, M., Kerem, B., Drumm, M., Melmer, G., Dean, M., Rozmahel, R., Cole, J., Kennedy, D., Hidaka, N., Zsiga, M., Buchwald, M., Riordan, J., Tsui, L., Collins, F. *Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Chromosome Walking and Jumping*. *Science* 1989; 245: 1059-1065.
51. Rowe, S., Miller, S., Sorcher, E. *Mechanisms of Disease: Cystic Fibrosis*. *N Engl J Med* 2005; 352: 1992-2001.

52. Sarkar, G., Cassady, J., Kottema, C.D., Sommer, S.S., *Characterization of polymerase chain reaction amplification of specific alleles*. *Anal Biochem* 1990; 1: 64-68.
53. Skach, W. *Defects in processing and trafficking of the cystic fibrosis transmembrane regulator*. *Kidney Int* 2000; 57:825–831.
54. Steagall, W. K., Barrow, B.J., Glasgow, C.G., Woo, J., Ehrmantraut, M., Lin, J.P., Insel, P.A., Moss, J. *Beta-2-adrenergic receptor polymorphisms in cystic fibrosis*. *Pharmacogenet Genom* 2007; 17: 425-430.
55. Stern, R.C. *The Diagnosis of Cystic Fibrosis*. *NEJM* 1997; 336 (7):487-491.
56. Taouil, K., Hinrasky, J., Hologne, C., Corlieu, P., Klossek, J.M., Puchell, E. *Stimulation of β 2-Adrenergic Receptor Increases Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Expression in Human Airway Epithelial Cells through a cAMP/Protein Kinase A-independent Pathway*. *J Biol Chem* 2003; 278:19: 17320–17327.
57. Thakkestian, A., McEvoy, M., Minelli, C., Gibson, P., Hancox, B., Duffy, D., Thompson, J., Hall, I., Kaufman, J., Leung, T., Helms, P.J., Hakonarson, H., Halpi, E., Navon, R., Attia, J. *Systematic Review and Meta-Analysis of the Association between β 2-Adrenoceptor Polymorphisms and Asthma: A HuGE Review*. *Am J Epidemiol* 2005; 162:201–211 .
58. Thomas, P., Shenbagamurthi, P., Sondek, J., Hullihen, J., Pedersen, P. *The Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. Effects of the most common*

cystic fibrosis – causing mutation on the secondary structure of a synthetic peptide. J. Biol. Chem 1992; 267: 5727 – 5730.

59. Tomaiuolo, R., Spina, M., Castaldo, G. *Molecular Diagnosis of Cystic Fibrosis: Comparison of Four Analytical. Procedures.* Clin Chem Lab Med 2003; 41(1):26-32.
60. Turcius, Nelson. *Cystic Fibrosis An Overview.* J Clin Gastroenterol 2005;39:4:307-317.
61. Turki, J., Pak, J., Green, S.A., Martin, R.J., Liggett, S.B. *Genetic polymorphisms of the β 2-adrenergic receptor in Nocturnal and Nonnocturnal Asthma.* J Clin Inves 1995; 95: 1635-1641.
62. Universidad del Rosario. Programa de Divulgación Científica Universidad del Rosario. Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud. *Fibrosis Quística afectaría a uno de cada cinco mil recién nacidos.* Fascículo 11 Tomo V.
63. World Health Organization (WHO). International Classification of Diseases (ICD). ICD10.
64. World Health Organization (WHO). *The Molecular Genetic epidemiology of cystic fibrosis.* 2004.
65. World Health Organization (WHO). *The Molecular Genetic Epidemiology Of Cystic Fibrosis.* 2002.
66. World Health Organization. The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis. Report of a joint meeting of WHO/ECFTN/ICF(M)A/ECFS. Genoa, Italy, 19 June 2002.

67. Zeitlin, P. *Pharmacologic restoration of delta F508 CFTR-mediated chloride current*. *Kidney Int* 2000;57:832-837.
68. Zielenski, J. *Genotype and Phenotype in Cystic Fibrosis*. *Respiration* 2000; 67:117-133.(30)

ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO PACIENTES AFECTADOS

Identificación de mutaciones y correlación genotipo-fenotipo en pacientes colombianos afectados por Fibrosis Quística

La Fibrosis Quística (FQ) es la enfermedad autosómica recesiva más frecuente en la población caucásica y una de las más comunes causas de muerte en la infancia. Los afectados presentan gran variedad de síntomas que se atribuyen a anomalías en los epitelios de los sistemas respiratorios y gastro-intestinal, así como una elevación de los electrolitos en sudor; además, casi todos los hombres con FQ son infértiles debido a la ausencia bilateral de los vasos deferentes.

Las mutaciones responsables de la Fibrosis Quística afectan el gen Regulador de la Conductancia Transmembrana de Fibrosis Quística (CFTR), que codifica un canal de Cloro dependiente de AMP cíclico que está localizado en la superficie apical de las células epiteliales. El gen CFTR presenta gran heterogeneidad mutacional, con cerca de 1.000 mutaciones y/o polimorfismos, que tienen una distribución de frecuencia que varía según la zona geográfica y que presentan distintos grados de afección clínica. Estas variaciones justifican la necesidad de realizar el análisis molecular en cada población, para identificar las mutaciones más prevalentes y su frecuencia, junto con las que no son identificables

con los sistemas convencionales y aún las posibles mutaciones desconocidas que tienen elevado valor científico.

La identificación de las mutaciones conocidas y desconocidas causales de FQ servirá para realizar correlaciones genotipo-fenotipo y así asesorar al paciente y los médicos tratantes para obtener un tratamiento individualizado al padecimiento. La importancia del diagnóstico temprano, al inicio de las primeras manifestaciones clínicas, al nacimiento ó incluso antes, cuando se ha confirmado que los padres son portadores, radica en la iniciación de una terapéutica temprana, en el subsecuente mejoramiento en la calidad y esperanza de vida de los pacientes afectados, así como en la realización de una adecuada asesoría genética a los padres portadores que les permita conocer el riesgo de recurrencia de la enfermedad en sus futuros hijos.

OBJETIVOS:

- Caracterizar las mutaciones desconocidas del gen *CFTR*, no identificadas en estudios previos, y describir posibles mutaciones nuevas causantes de FQ, en un grupo de personas afectadas.
- Analizar los exones del gen *CFTR* que presentan las frecuencias más altas de mutación.
- Estimar la distribución de las frecuencias para las diferentes mutaciones causantes de Fibrosis Quística en la población analizada y compararlas con frecuencias reportadas por otros estudios nacionales, latinoamericanos y al nivel mundial.

- Establecer una correlación entre las mutaciones causantes de FQ con las manifestaciones clínicas.
- Determinar la edad promedio de diagnóstico en la población analizada.
- Establecer la edad de inicio de los síntomas en los pacientes estudiados.
- Establecer cuál es el conjunto de mutaciones más prevalentes en las personas colombianas afectadas con FQ.
- Crear un banco de datos y de DNA como fuente de información para futuras investigaciones.

PROCEDIMIENTOS:

- Realización de historia clínica completa
- Examen físico.
- Se tomaran muestras de sangre total.
- Se hará extracción de DNA por método fenol-cloroformo.
- Las muestras serán sometidas al análisis de las mutaciones reportadas como las más frecuentes en Colombia realizando amplificación por PCR con primers específicos para la determinación de la mutación $\Delta F508$ y 1811+1,6kb A->G electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%.
- Se evaluarán otras mutaciones frecuentes de FQ por hibridación dot blot reversa utilizando sondas de oligonucleótidos alelo-específicos (ASO) para mutaciones conocidas en el gen CFTR.

- Para las muestras que sean negativas en estos dos análisis, se realizará un *screening* utilizando SSCP para determinar las muestras que tengan una mutación en el gen.

2. Carácter del estudio de acuerdo a las normas científicas para investigación en salud.

Este estudio esta regido por las recomendaciones de la declaración de Helsinski de la Asociación Médica Mundial 48 Asamblea general, Somerset West, Republica de Sudáfrica, Octubre de 1996, las cuales se refieren a la Investigación Médica No terapéutica.

De acuerdo a la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud este estudio es considerado como de riesgo mínimo.

ASPECTOS GENERALES

Este estudio garantiza que los resultados obtenidos serán confidenciales y solo se entregaran al paciente o tutor legal.

Se autoriza el almacenamiento de las muestras, las cuales estarán disposición de los pacientes en caso de requerirlas y no serán comercializadas de ninguna forma. Luego del

estudio se informaran a los pacientes y sus familiares los resultados mediante una asesoría genética.

Todas las personas cuentan con absoluta libertad de retirarse del protocolo de este trabajo cuando ellos lo consideren pertinente.

Declaro he leído y me han sido informados los propósitos y objetivos del estudio, así como de las ventajas y de los riesgos mínimos de este.

Paciente:

Representante legal:

FIRMA:

C.C.

Testigo:

ANEXO 2. ASENTIMIENTO TELEFÓNICO PACIENTES AFECTADOS



Código del paciente:

COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO DE CIENCIAS

BASICAS LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

CONSENTIMIENTO INFORMADO TELEFONICO

GUION

Análisis de polimorfismos del Gen del Receptor Beta 2 Adrenérgico en pacientes colombianos afectados por Fibrosis Quística.

Buenos días/ tardes. Podría comunicarme con el Sr/Sra
_____ (Representante del menor).

Mi nombre es Daissy Lorena Sánchez, estudiante de la Universidad del Rosario. Lo estoy llamando porque quisiera contarle que la Unidad de Genética de la Universidad

esta interesada en iniciar un estudio de investigación en el cual se va a analizar un gen que podría estar involucrado con el curso y severidad de la enfermedad en pacientes con Fibrosis Quística. Este estudio podría ayudar a entender un poco más el comportamiento variable de la enfermedad en las personas afectadas y también podría ayudar a largo plazo a establecer terapias diferentes para cada paciente, mejorando su condición de vida.

Nosotros contamos con una muestra de ADN de su hijo/hermano/ (relación con el paciente)_____ (Nombre del paciente), y quisiéramos saber si usted nos da autorización y consentimiento para utilizar la muestra que tenemos en este estudio. SI _____ NO _____

Adicionalmente, queremos que sepa que este estudio no genera ningún beneficio económico y tampoco ningún riesgo para usted, y que una vez tengamos el resultado del estudio de este gen, se emitirá un resultado para el niño/a y se les explicara el resultado en una consulta especial dirigida por el genetista de la Unidad de Genética de la Universidad. Esta usted de acuerdo? SI _____ NO _____

Agradezco enormemente su atención, y estaré en contacto con usted para comentarle lo concerniente al estudio.

PERSONA RESPONSABLE DEL CONSENTIMIENTO:

CC.

Tel.

OBSERVACIONES _____

ANEXO 3. CONSENTIMIENTO INFORMADO CONTROLES



COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO DE CIENCIAS

BASICAS LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

CONSENTIMIENTO INFORMADO

**Análisis de polimorfismos del Gen del Receptor Beta 2 Adrenérgico en pacientes
colombianos afectados por Fibrosis Quística.**

Usted (o su pariente) está invitado a participar en un estudio de investigación propuesto por el instituto de Ciencias Básicas laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Universidad del Rosario con la participación de:

Heidi Mateus, Carlos Rodríguez y Lorena Sánchez

Es muy importante que usted lea y entienda ciertos puntos importantes en la realización de este estudio:

- (a) La participación en este estudio es totalmente voluntaria.
- (b) La naturaleza de esta investigación, su propósito, sus limitaciones, sus riesgos, sus inconvenientes, incomodidades y cualquier información pertinente al resultado de este, le será explicada por el equipo de atención clínica
- (c) Si tiene algún interrogante sobre el estudio por favor no dude en manifestarlo a alguno de los investigadores, quien con mucho gusto, le contestará sus preguntas
- (d) **CONFIDENCIALIDAD:** Los registros médicos de cada persona permanecerán archivados en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la universidad del Rosario. Las historias médicas, los resultados de exámenes y la información que usted nos ha dado son de carácter absolutamente confidencial, de manera que, solamente usted y el equipo de atención clínica tendrá acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin su consentimiento.
- (e) De acuerdo con lo establecido en la resolución 008430 de 1993 (“Normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud”), este estudio puede ser clasificado como una “Investigación con riesgo mínimo”. Se cumplirá con lo establecido por el Ministerio de Protección Social colombiano (antiguo Ministerio de Salud), la ley 84 de 1989 y la ley 2381 de 1993

Cualquier información adicional usted puede obtenerla directamente con:

Heidi Mateus. Laboratorio de Biología Celular y Molecular.

Instituto de Ciencias Básicas.

Facultad de Medicina.

Universidad del Rosario. Tel (57-1)3474570 (Ext 266)

1 A. EXPLICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN AL INDIVIDUO

OBJETIVO:

Identificar ciertas variaciones en un gen conocido como receptor beta2 adrenérgico en pacientes con Fibrosis Quística y personas sanas, para determinar si existen diferencias que puedan relacionarlas con la severidad de la enfermedad.

PROCEDIMIENTO:

Se realizará una entrevista clínica con usted y se tomará una muestra de aproximadamente 10cc de sangre mediante punción en vena. De la muestra de sangre se extraerá el ADN y este será desechado una vez haya culminado el estudio. En caso de que sea necesario repetir los exámenes, usted será notificado para tomar las muestras nuevamente. Estas muestras serán manejadas y analizadas únicamente por personas involucradas directamente en este proyecto.

RIESGOS E INCOMODIDADES La participación en este estudio representa un riesgo mínimo para su salud e integridad y las molestias estarán representadas solo por la toma de muestra; algunas molestias pueden ser: hematomas (morados), enrojecimiento y leve dolor en el lugar de donde se toma la muestra, sin embargo, estas molestias pasaran rápidamente.

1.1 BENEFICIOS ADICIONALES:

Usted no obtendrá ningún beneficio de la participación en el estudio.

Este estudio nos ayudará a entender mejor porque se da la variación entre los diferentes pacientes con

Fibrosis Quística.

RESPONSABILIDAD DEL PACIENTE Y PRECAUCIONES

Al tomar parte de este estudio es importante que usted contemple las siguientes responsabilidades y precauciones:

El riesgo existente en una toma de muestra de sangre en vena periférica es muy bajo y por lo tanto no reviste riesgo en la salud del paciente.

MANEJO DE RESULTADOS

No se entregaran resultados a las personas sanas analizadas, estos son confidenciales y solo serán conocidos por los investigadores

Los resultados generales del estudio se informaran en una conferencia a la cual se invitaran a todos los participantes y a la comunidad en general.

AUTORIZACION PARA LA TOMA DE MUESTRAS E INCLUSION VOLUNTARIA EN EL ESTUDIO : Análisis de polimorfismos del Gen del Receptor Beta 2 Adrenérgico en pacientes colombianos afectados por Fibrosis Quística.

Habiendo sido enterada(o) del objetivo del presente estudio, informada(o) de los riesgos mínimos de la toma de muestra y habiendo resuelto todas mis dudas acerca de la investigación Yo, _____ con documento de identificación número: _____ de _____, acepto voluntariamente que se me tome una muestra de sangre, con el fin de realizar el análisis de variaciones en el gen del receptor beta-2 adrenérgico. Así mismo, declaro que se me ha explicado la presencia de los riesgos y el manejo que se le dará al material de muestra.

Fecha: _____

Nombre _____

Firma _____

CC

Dirección _____

Teléfono _____

Firma_____

Firma_____

CC.

CC.

Relación Con el Voluntario _____

Relación con el Voluntario _____

Testigo 1

Testigo 2

Investigador

Bogotá, D.C. Fecha. _____

ANEXO 4. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN POR SALTING OUT

1. Colocar 2.5 mL de sangre anticoagulada con EDTA en un tubo Falcon de 15mL
2. Agregar 5mL de solución de lisis para Eritrocitos
3. Incubar en hielo por 20 minutos
4. Centrifugar por 10 minutos 5.000 rpm
5. Descartar el sobrenadante, y resuspender el pellet de leucocitos con 3mL de lisis para eritrocitos
6. Incubar 15 minutos en hielo
7. Centrifugar por 10 minutos 5000 rpm
8. Eliminar el sobrenadante
9. Lavar con 5mL de lisis para eritrocitos
10. Resuspender el botón con 750µL de lisis de glóbulos blancos
11. Adicionar 15 µL SDS al 10% y 10 µL de Proteinasa K
12. Incubar a 56^oC por 3 horas
13. Agregar 500µL de NaCl saturado (6M) agitar por 15 segundos
14. Centrifugar por 18 minutos a 5000rpm, transfiriendo el sobrenadante a otro tubo para volverlo a centrifugar por 7 minutos
15. Transferir el sobrenadante a otro tubo y precipitar el DNA con dos volúmenes de etanol al 100%, con movimiento homogéneo.
16. Descartar el etanol, dejar el tubo abierto por 10 minutos

17. Adicionar 300 μ L de TE 1X mezclar durante 15 minutos

18. Almacenar a -20 $^{\circ}$ C

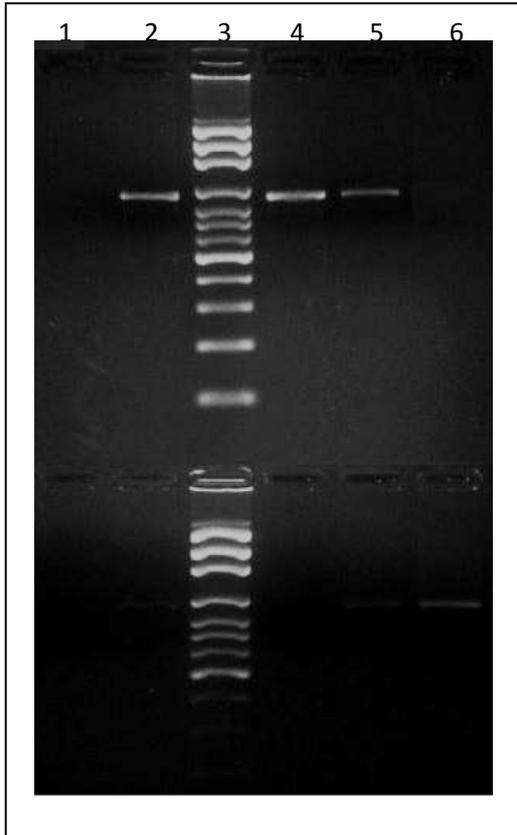
ANEXO 5. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN POR PROBE

1. En un tubo falcon de 15ml poner 6ml de buffer de lisis de glóbulos rojos y sobre este adicionar con una pipeta de transferencia plástica 2ml de sangre total. Mezclar muy bien hasta completa homogenización
2. Agitar fuertemente en una plataforma (shaker) durante 15 minutos a temperatura ambiente
3. Centrifugar a 3000 rpm durante 8 minutos sin freno
4. Descartar el sobrenadante y conservar el pellet
5. Dar vortex vigorosamente al pellet en el líquido residual
6. Adicionar 2,5ml de buffer de lisis celular y mezclar cuidadosamente con chupa plástica varias veces, hasta completa homogenización. Dejar al menos 30 minutos a temperatura ambiente (se puede suspender el procedimiento incluso hasta el día siguiente, dejando los tubos a 4°C)
7. Adicionar 800µL de solución precipitante de proteínas (sin mezclar)
8. Centrifugar a 4000rpm durante 20 minutos, sin freno (repetir este paso con precaución de conservar el sobrenadante y descartar el precipitado)
9. Verter el sobrenadante en un tubo Falcon de 15ml que contenga 2,4ml de isopropanol frío, dejar en reposo al menos 5 minutos
10. Mezclar cuidadosamente por inversión hasta precipitar el DNA

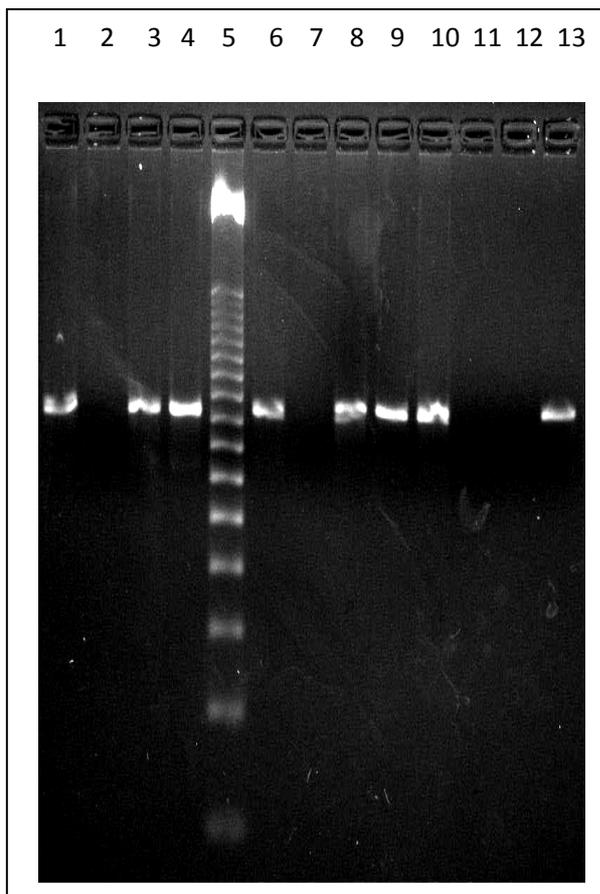
11. Envolver el DNA e una pipeta pateur de vidrio y pasarlo rápidamente por etanol 70% frío, dejar secar a temperatura ambiente por unos segundos y resuspender finalmente en TE1X (50-250 μ l dependiendo de la cantidad de DNA recuperado)
12. Colocar en plataforma (shaker) a velocidad lenta, toda la noche a temperatura ambiente para resuspender por completo el DNA
13. Almacenar a -20°C

ANEXO 6

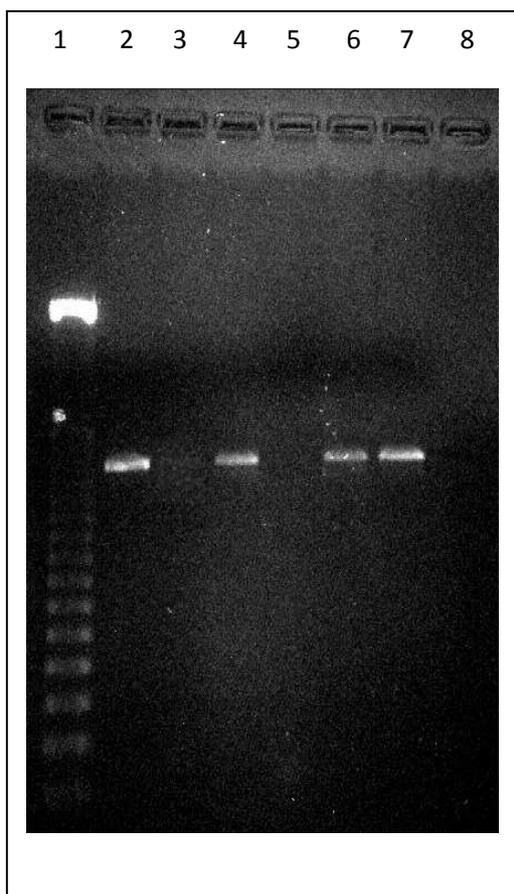
GELES POLIMORFISMOS p.R16G, p.Q27E y p.T164I



Polimorfismo R16G. Electroforesis
Gel Agarosa 2%. Carril 1: Blanco.
Carril 2: Control R/G. Carril 3:
Marcador de Peso Molecular
1kb. Carril 4: Paciente R/R. Carril 5:
Control No 130 R/G. Carril 6:
Control No 142 G/G



Polimorfismo Q27E. Electroforesis Gel Agarosa 2%. Carril 1y2, 6y7, 11 y 12 Controles sanos Q/Q. Carriles 3 y 4, 8 y 9: Controles sanos Q/E. Control R/G. Carril 13: Control sano E/E. Carril 5: Marcador de Peso Molecular 1 kb.



Polimorfismo T164I. Electroforesis Gel Agarosa 2%. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1kb. Carriles 2 y 3, 4 y 5: Pacientes No 4y 6 Genotipo T/T. Carriles 6 y 7 Paciente No 11 T/I.