

**TAMIZAJE NEONATAL PARA FIBROSIS QUÍSTICA EN UNA MUESTRA DE LA  
CIUDAD DE BOGOTÁ**

**PAULA AMADO GONZÁLEZ, M.D**

**COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**MAESTRIA EN CIENCIAS**

**ÉNFASIS GENÉTICA HUMANA**

**2011**

**TAMIZAJE NEONATAL PARA FIBROSIS QUÍSTICA EN UNA MUESTRA DE LA  
CIUDAD DE BOGOTÁ**

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER EN CIENCIAS CON  
ÉNFASIS EN GENÉTICA HÚMANA**

**PAULA AMADO GONZÁLEZ, M.D**

**Director:**

**Dra HEIDI ELIANA MATEUS ARBELAEZ M.D. MSc.**

**Profesora Principal**

**Universidad del Rosario**

**Codirector:**

**Dra DORA JANETH FONSECA MENDOZA. Biol. MSc**

**Profesora Principal**

**Universidad del Rosario**

**COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ÉNFASIS EN GENÉTICA HÚMANA**

**BOGOTÁ, PRIMERO DE DICIEMBRE DE 2011**

## **DEDICATORIA**

A las personas afectadas con Fibrosis Quística y sus familias, por una mejor calidad de vida.

A Efraín, Efraim, Matías y Anita por todo el tiempo que dejé de darles.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mis tutoras, Doctoras Heidi Mateus y Dora Fonseca, por su paciencia y desinteresada colaboración en esta tesis.

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

**Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1996**

“LA UNIVERSIDAD NO SE HACE RESPONSABLE POR LOS CONCEPTOS  
EMITIDOS POR SUS ALUMNOS EN SUS TESIS DE GRADO”.

## Tabla de contenido

DEDICATORIA .....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
Indice de Tablas y Figuras .....	3
1. INTRODUCCIÓN .....	5
2. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA .....	7
3. JUSTIFICACIÓN .....	8
4. OBJETIVOS.....	10
5. MARCO TEÓRICO .....	12
5.1 HISTORIA .....	12
5.2 INCIDENCIA.....	17
5.3 EL GEN CFTR.....	19
5.4 FISIOPATOLOGÍA .....	27
5.5 MANIFESTACIONES CLÍNICAS .....	28
5.6 CLASIFICACIÓN DE LA FQ .....	35
5.7 CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO .....	36
6. DIAGNÓSTICO .....	40
6.1 DIAGNÓSTICO PRENATAL.....	40
6.2 DIAGNÓSTICO NEONATAL.....	41
6.3 DIAGNÓSTICO CLÍNICO.....	42
6.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR .....	44
7. ABORDAJE Y TRATAMIENTO DEL PACIENTE CON FQ.....	45
7.1 FUNCIÓN PANCREÁTICA .....	45
7.2 TRACTO RESPIRATORIO ALTO Y BAJO.....	45
7.3 ESTATUS CLÍNICO GENERAL / EXTENSIÓN DE LA ENFERMEDAD .....	46
8. TAMIZAJE NEONATAL .....	49
9. MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
9.1 TIPO DE ESTUDIO .....	52

9.2 POBLACIÓN Y MUESTRA .....	52
9.3 RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN.....	53
9.4 ESTRATEGIA.....	54
9.4.1 DIAGRAMA DE ESTRATEGIA .....	55
9.5 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS .....	56
9.6 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	57
9.7 MANEJO DE DATOS.....	58
9.8 ANALISIS DE DATOS.....	59
9.9 DETERMINACIÓN DE VALORES DE TIR POR MEDIO DE ELISA EN SANGRE DE TALÓN .....	62
9.10 IDENTIFICACIÓN DE LAS MUTACIONES.....	63
10. RESULTADOS.....	69
10.1 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN .....	69
10.2 ANALISIS DE CURVAS DE CALIBRACION.....	73
10.3 GRAFICA DE NORMALIDAD.....	75
10.4 PUNTO DE CORTE DE LA TRIPSINA .....	75
10.5 PROTOCOLOS DE TAMIZAJE NEONATAL PARA FIBROSIS QUÍSTICA .....	76
10.4 INCIDENCIA DE FIBROSIS QUÍSTICA EN LA MUESTRA ANALIZADA .....	82
11. DISCUSIÓN.....	84
12. CONCLUSIONES .....	100
13. PERSPECTIVAS .....	101
11. BIBLIOGRAFÍA .....	102
12. ANEXOS .....	116

## Índice de Tablas y Figuras

### TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las mutaciones del gen <i>CFTR</i> por clases.....	22
Tabla 2. Tipo de mutaciones según su frecuencia.....	22
Tabla 3. Manifestaciones clínicas por sistemas.....	33
Tabla 4. Exacerbación Pulmonar en Fibrosis Quística.....	45
Tabla 5. Instituciones de salud participantes.....	51
Tabla 6.1 Condiciones de PCR.....	60
Tabla 6.2 Condiciones de PCR.....	61
Tabla 6.3 Condiciones de PCR.....	62
Tabla 6.4 Condiciones de PCR.....	63
Tabla 7. Distribución de los recién nacidos analizados según el hospital que remite la muestra.....	65
Tabla 8. Localidades destino de personas víctimas de desplazamiento forzado y su representación en la muestra objeto de la investigación.....	67
Tabla 9. Análisis de variables demográficas.....	68
Tabla 10. Distribución de la población por géneros.....	68
Tabla 11. Curvas de calibración.....	70
Tabla 12. Comparación de incidencia de FQ a nivel mundial, con la incidencia esperada en Colombia. (Nivel de Significancia: 95%, $P < 0,05$ ).....	78

### FIGURAS

Figura 1. Localización del gen <i>CFTR</i> en el cromosoma 7.....	19
Figura 2. Estructura hipotética de la proteína <i>CFTR</i> .....	20
Figura 3. Representación gráfica que los eventos patológicos de la enfermedad pulmonar.....	30
Figura 4. Diagrama de flujo para la identificación de afectados y discriminación de no afectados.....	52
Figura 5. Distribución de los hospitales participantes por localidades.....	67
Figura 6. Curva de Calibración.....	69
Figura 7. Distribución de valor de tripsina inmunorreactiva en muestras de sangre de cordón.....	71
Figura 8. Diagrama de flujo con resultados.....	73
Figura 9. Mutación p.Phe508del.....	75
Figura 10. Mutación p.Gly542X.....	76
Figura 11. Mutación c.1.811+1.6kbA>G.....	77

Figura 12. Mutación c.621+1G>T.....77

## 1. INTRODUCCIÓN

La Fibrosis Quística (FQ) es una enfermedad sistémica de curso severo, con herencia autosómica recesiva. Es causada por mutaciones en el gen Regulador de la Conductancia Transmembrana de Fibrosis Quística (*CFTR*, por sus siglas en inglés: Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) el cual fue identificado en 1989 (Kerem y cols 1989). Hasta la fecha se han identificado más de 1.800 mutaciones de este gen, con repercusiones funcionales de severidad variable. Se caracteriza por una triada clásica de enfermedad pulmonar obstructiva crónica, alteración de la porción exocrina del páncreas y elevación de los electrolitos en sudor. La incidencia de la enfermedad es variable, siendo mayor en la población caucásica, donde en promedio afecta 1 de cada 2.500 Recién Nacidos Vivos (RNV), mientras que en poblaciones de afrodescendientes es en promedio de 1:15.000-20.000 RNV. Para Latinoamérica se han reportado datos de incidencia solo para cuatro poblaciones con valores que oscilan entre 1:3.862 y 1:8.000-9.000 RNV.

A pesar de que en Colombia no se tiene un dato real de la incidencia de FQ, estudios previos realizados con nuestro grupo, indican un valor estimado de 1 en 5.025 RNV. Aun así, los registros nacionales de las asociaciones de FQ solo reportan hasta la fecha, cerca de 500 pacientes diagnosticados, lo cual indica un claro subdiagnóstico sumado a un diagnóstico inicial tardío.

El tamizaje neonatal ofrece la posibilidad de detectar recién nacidos en riesgo de ser afectados por enfermedades como la FQ, con el objetivo de iniciar el tratamiento antes de la aparición de las complicaciones inherentes y mejorar la calidad de vida y sobrevivencia de los afectados. A nivel mundial varios países han instaurado programas de cribado para FQ, lo que ha permitido conocer la incidencia real, ofrecer asesoramiento genético a las familias e instaurar tratamientos tempranos.

En Colombia solo se realiza tamizaje para hipotiroidismo congénito en muestras de sangre de cordón umbilical. Es determinante sin embargo, incluir en este programa nacional otras enfermedades que cumplan los criterios establecidos para tal fin. La decisión de la inclusión de nuevas entidades debe estar soportada por estudios piloto que demuestren su impacto en la salud pública. El presente trabajo es una extensión de investigaciones previas realizadas por el grupo, que han indicado de manera indirecta que la FQ es frecuente y pretende en una muestra de recién nacidos de la ciudad de Bogotá establecer el número de afectados por esta entidad. Además, busca dar herramientas para que los organismos estatales definan la pertinencia del tamizaje neonatal para FQ.

## 2. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

La FQ es la enfermedad autosómica recesiva letal más común en caucásicos, con una incidencia promedio a nivel mundial de 1 en 3.500 Recién Nacidos Vivos. En nuestro país no se conocen datos acerca de la incidencia real de la enfermedad. Estudios previos realizados por el grupo de la Universidad del Rosario han estimado una relativamente alta incidencia de FQ en la población colombiana, que ameritaría su inclusión en un programa el Tamizaje Neonatal nacional para esta entidad. La implementación del Tamizaje Neonatal para FQ en otras poblaciones a nivel mundial ha demostrado que el diagnóstico temprano de la enfermedad cambia la historia natural de la misma y mejora los indicadores de morbilidad y mortalidad (Sims y cols. 2007). Por esta razón, el presente estudio busca establecer, cuál es la incidencia de FQ en una muestra de la ciudad de Bogotá, como un primer paso en la evaluación de la utilidad de la implementación de Tamizaje Neonatal para FQ en Colombia.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La FQ es una enfermedad hereditaria, autosómica recesiva, cuya incidencia es población específica (Mogayzel y cols. 2009). En los países de Europa occidental, la incidencia varía entre 1/ 2.000 y 1/3.500 Recién Nacidos Vivos (RNV) (Bobadilla y cols. 2000). En Latinoamérica las incidencias varían según la conformación étnica de las mismas, siendo en Argentina 1: 5.600 Recién Nacidos Vivos (RNV) en Brasil 1: 7.576 RNV (Raskin y cols 2008), en Cuba 1: 3.862 (Collazo y cols. 1995) y en México 1:8.500 (Orozco y cols. 2000).

La fibrosis quística ha sido objeto de tamizaje desde hace mas de 25 años en países de Europa (Southern y cols 2007), demostrándose disminución en la morbilidad y mortalidad temprana, mejoría en el crecimiento y prevención de déficit de vitaminas en la infancia, así como mejor funcionamiento pulmonar a largo plazo (Sourthern y cols 2009).

Existen diferentes protocolos de tamizaje neonatal de FQ, tales como: TIR/TIR (Hammond y cols 1991), TIR/TIR/DNA (Gregg y cols 1993 y 1997), TIR/DNA/TIR, TIR/proteínas en meconio/TIR, TIR/electrolitos en sudor y TIR/DNA (p.Phe508del), la estrategia depende de las mutaciones y recursos económicos de cada población (Wilcken y cols 2007).

A pesar de que en Colombia no se conoce la incidencia real de FQ, los estudios realizados por el grupo de investigación de la Universidad del Rosario han demostrado que en este país la frecuencia de portadores de la mutación p.Phe508del es de 1:89 (Mateus y cols. 2007). Este estudio se realizó en las diferentes regiones geográficas del país, a partir del cual se calcula una incidencia aproximada de la enfermedad de 1:5.025 Recién Nacidos Vivos (Mateus, 2010. Datos no publicados). Si este dato refleja la realidad colombiana la tasa de sub-diagnóstico de la entidad sería extremadamente alta, teniendo en cuenta que hasta la fecha solo hay descritos cerca de 500 casos. Adicionalmente, estos pacientes son diagnosticados tardíamente (38 meses) (Mateus, 2005)

Los paciente diagnosticados mediante el tamizaje neonatal, han demostrado un aumento en la sobrevida, mejoría en el estado nutricional y preservación de la función pulmonar (Monestrol, 2011; Sims, 2007). Así como una disminución a largo plazo de la incidencia de la enfermedad (Dankert-Roelse, 2005, Hale y cols. 2008), lo cual ha llevado a que se realice de manera obligatoria en Estados unidos y en gran parte de Europa. En Latinoamérica existe tamizaje en Argentina, México y Brasil.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el presente trabajo pretende responder la pregunta:

¿La frecuencia de Fibrosis Quística en Bogotá justifica la inclusión de esta enfermedad en un programa de Tamizaje Neonatal? Y ¿Cuál sería la mejor estrategia para el Tamizaje de FQ?

## 4. OBJETIVOS

- **GENERAL:**

Determinar la incidencia de afectados por Fibrosis Quística en una muestra de recién nacidos de la ciudad de Bogotá.

- **ESPECIFICOS:**

- Determinar los puntos de corte normales para tripsina inmunorreactiva a partir del análisis de muestras de sangre de cordón umbilical en papel de filtro y evaluadas mediante el ensayo inmunoenzimático descrito en el *Kit Neonatal IRT ELISA Bioclone®*.
- Comparar las estrategias de tamizaje neonatal para FQ, basadas en TIR/TIR, TIR/DNA, TIR/DNA/TIR.
- Analizar el impacto de variables de morbilidad y mortalidad tales como bajo peso al nacer, prematurez o necesidad de transfusión sanguínea como factores de confusión en el análisis de los niveles sanguíneos de TIR en los neonatos.
- Determinar el número de neonatos afectados por Fibrosis Quística en la muestra analizada.
- Generar un protocolo que permita la implementación del Programa de Tamizaje Genético Neonatal para Fibrosis Quística en Colombia,

- Comparar los resultados de incidencia para la muestra analizada con otras poblaciones a nivel mundial.
- Ofrecer a los padres de los niños diagnosticados con Fibrosis Quística asesoramiento genético encaminado al conocimiento de su riesgo en futuros embarazos y la orientación pertinente para que, a través de su Entidad Promotora de Salud, pueda ser incluido en un tratamiento multidisciplinar para FQ.
- Realizar las recomendaciones pertinentes ante entes gubernamentales sobre la inclusión de Fibrosis Quística en los programas de Tamizaje Genético Neonatal masivo que busquen mejorar la calidad de vida de los afectados y sus familias, reduciendo el impacto económico generado para el Sistema General de Seguridad Social el diagnóstico tardío de una persona afectada.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1 HISTORIA

La historia de la Fibrosis Quística (FQ) podría ser tan antigua como la historia de las civilizaciones. Existen leyendas de países como Suiza y Austria que datan de la edad media, acerca de niños “embruados” a quienes se les reconocía por dejar un sabor salado en los labios de quien les besaba la frente (Wilcken y cols 2003). Ese niño moriría pronto. Pero los primeros escritos formales son de 1595 cuando Peter Pauw, profesor de anatomía y botánica de la Universidad holandesa de Leiden, realizó una autopsia en una niña de 11 años, a quien su familia creía “embruada” y encontró lesiones en el parénquima pancreático. Posteriormente, en 1606, Alonso y de los Ruyzes de Fonteca, un profesor de medicina en Henares, España, describió en un escrito que estos niños dejaban un gusto salado en los dedos al frotarles con ellos la frente (Ruyzes de Fonteca 1606). Luego en 1905, casi trescientos años más tarde, describió el ileo meconial, relacionándolo con insuficiencia pancreática exocrina (Landsteiner 1905). Fanconi, por su parte, empieza a denominar a la enfermedad: “fibromatosis quística con bronquiectasias” treinta años después (Fanconi y cols 1936), y concluyó que se trataba de una entidad diferente a la enfermedad celiaca, y casi simultáneamente, en 1938, Dorothy Andersen (Andersen 1938, Southern y cols. 2004; Kreindler, 2010), hizo una descripción minuciosa, con las características clínicas, anatomopatológicas y

epidemiológicas y le dio el nombre de Fibrosis Quística del Páncreas (Davis 2006). Posteriormente, Farber, en 1945, acuñó el término Mucoviscidosis, porque sus observaciones lo llevaron a concluir que la causa de la enfermedad tenía que ver con un generalizado estado de espesamiento de las secreciones (Davis 2006). Estas descripciones dejan en evidencia el limitado conocimiento de la patología en ese momento, y desviaron la atención de los investigadores a estudiar las anomalías del moco. Sin embargo un año más tarde, en un esfuerzo conjunto Hodges y Andersen presentaron la primera evidencia de que este síndrome era de origen genético, con un patrón de herencia autosómico recesivo, corroborado más tarde por Lowe y cols. (1949), quien no solo confirmó el patrón de herencia autosómico recesivo, sino que postuló que debía tratarse de una enfermedad monogénica (Rowe y cols. 2005). En 1948, la ola de calor ocurrida en Nueva York, re-direccionó el estudio de la patología de la enfermedad. Un pediatra, Paul di Sant`Agnese, del Hospital de Columbia, observó que los niños más afectados por postración, tenían la condición descrita en el siglo XVI, como “niños salados”, y postuló un desorden electrolítico (di Sant`Agnese 1953). Tomó algunos años captar la atención de la comunidad científica, puesto que di Sant`Agnese lo publicó en 1953, y solo fue hasta 1959 que Gibson y Cooke (Gibson-Cooke 1959, Davis 2006), estandarizaron la técnica para medir electrolitos en sudor, que sigue siendo en la actualidad el pilar del diagnóstico de FQ. Mientras esto se estaba gestando, ya por 1955 se empiezan a crear centros de tratamiento de la condición, donde se definieron tres pilares de tratamiento: mejoramiento del estado nutricional, limpieza de vías aéreas y tratamiento de la infección pulmonar. La década de los 50 fue la que estableció los pilares del diagnóstico y tratamiento de

esta entidad (Quinton 1999). En la actualidad tanto uno como otro siguen basándose en estos principios.

Los primeros esfuerzos por diagnosticar la enfermedad en el periodo neonatal datan de 1958, cuando se notó que los niveles de albumina en el meconio de los niños de ileo meconial estaban elevados. En 1975 se empieza a utilizar un test cromatográfico llamado Boehringer Mannheim (BM) test strip (Stephan y cols 1975). Sin embargo, la baja sensibilidad y especificidad de esta prueba además de los problemas técnicos en la recolección del meconio y su adecuada refrigeración a 4°C hasta que pudiera ser analizada, así como la imposibilidad de recoger una nueva muestra para corroborar los resultados, no permitió que fuera usada como protocolo para tamizaje de FQ.

Una segunda alternativa fue la medición de tripsina en las heces. La recolección de la primera muestra se llevaba a cabo al quinto día del nacimiento y si era positiva era necesario tomar una segunda muestra. La recolección se hacía en papel de filtro, para luego enviarlo al laboratorio donde se haría el análisis. A pesar de ser un método técnicamente simple y ser de bajo costo, ha probado no ser efectivo en afectados suficientes pancreáticos.

En 1979, Crossley y cols. En Nueva Zelanda, demostró el incremento en plasma de Tripsinógeno Inmunorreactivo (TIR, por sus siglas en inglés, Immunoreactive Trypsinogen). El usó un método de radioinmunoensayo con anticuerpos policlonales para medir TIR a partir de gotas de sangre seca en tarjetas de Guthrie (Sontag y cols 2006). Este método se mejoró posteriormente con la introducción

de un ensayo inmunoenzimático con anticuerpos monoclonales, realizado en placas de ELISA, lo cual mejoró la sensibilidad y acortó el tiempo de procesamiento (Bowling y cols 1987). Puesto que este método permite la universalización del tamizaje en neonatos, constituye la base de los protocolos desde entonces.

Teniendo entonces una primera herramienta de tamizaje, que podía detectar individuos en riesgo de desarrollar la enfermedad con adecuada sensibilidad, y un test de electrolitos en sudor que permitía comprobar el diagnóstico sospechado, era necesario seguir trabajando en el entendimiento de las bases moleculares y fisiopatológicas de la enfermedad. Fue así como investigadores de diferentes ramas lucharon durante los años 1960 y 1970's para unificar la gran rama de síntomas desarrollados y las diferentes vías que parecía seguir la enfermedad basados primariamente en observaciones empíricas, con resultados confusos y prácticamente ninguna guía. No se conocía el producto génico, pero se sabía que la impermeabilidad al Cloro estaba comprometida, y se asumía que el gen mutado debía estar expresándose en la glándula sudorípara. La alternativa era el posicionamiento clonal. Eiberg y cols. observaron que una paroxonasa polimórfica del suero se heredaba ligada al gen de FQ, y en el mismo año Tsui y cols. usaron un marcador RFLP (por sus siglas en inglés: Restriction Fragment Linked Polymorphism) para localizar el gen en el brazo largo del cromosoma 7 (Tsui y cols 1985). Después de esto todos los esfuerzos lograron reducir el segmento a  $1-2 \times 10^6$  pares de bases usando RFLP's. Entonces el grupo de Williamson en Londres y el de Tsui en Toronto entraron en una carrera por encontrarlo,

terminando en una trilogía de artículos publicados simultáneamente en 1989 por el grupo de Toronto (Rommens y cols 1989, Kerem y cols 1989 y Riordan y cols 1989). El gen se expresaba predominantemente en los órganos afectados por la enfermedad, incluyendo células de la glándula sudorípara. El cDNA hibridado de las secuencias génicas candidatas del locus de FQ fueron aisladas de librerías construidas a partir de mRNA de glándula sudorípara de personas afectadas y sanas. Al hacer la comparación del cDNA parcial de ambas fuentes se encontró la ausencia de tres nucleótidos en los afectados, aún antes de que la totalidad de la secuencia se hubiese obtenido y al notar que el 70% de los cromosomas de personas afectadas analizadas tenían el defecto, les indicó a los investigadores que estaban ante el gen correcto. La proteína fue llamada CFTR, pues sugirieron que podría no ser un canal de Cloro únicamente, sino un regulador de la actividad del canal de Cloro (Riordan y cols 1989, Schwiebert y cols 1999).

Desde entonces y hasta la actualidad se han reportado más de 1.800 mutaciones a lo largo del gen (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html>) y se han clasificado dependiendo del tipo de mutación y de la manera cómo esta afecta la producción, tráfico, activación y función de la proteína (Rowe y cols 2005), en un esfuerzo por entender la asociación genotipo-fenotipo de las mismas, que parece no ser directa, especialmente en cuanto a la disfunción pulmonar se refiere (Zielenski 2000, de Gracia y cols 2005). Las manifestaciones de fibrosis quística pueden ser muy diferentes entre pacientes, aun entre hermanos con el mismo genotipo. Las funciones de la proteína CFTR van más allá del transporte del cloro

y se ha aceptado la existencia de polimorfismos y genes modificadores, objetos de estudio por parte de la comunidad científica (Ott y cols 2009).

## 5.2 INCIDENCIA

La FQ es una enfermedad de distribución mundial, cuya incidencia y tasa de portadores varía según la población y grupo étnico analizado, así como el tipo de mutación predominante (Dawson y cols 2000, Alonso y cols 2007). La distribución por género es igual. Se conoce que en caucásicos provenientes de Europa, Estados Unidos y Canadá tiene un rango de 1 en 2.000 a 1 en 3.000 con frecuencia de portadores de hasta 1 en 26 (Mogayzel y cols. 2009). En Afro-americanos la incidencia es 1 en 15.000 y en población asiática proveniente de Hawaii es 1 en 89.000. Algunas poblaciones, sin embargo, tienen frecuencias mucho más elevadas como consecuencia de deriva génica y/o efecto fundador (Bobadilla y cols. 2002)

En Latinoamérica es difícil hablar de un valor preciso que defina la incidencia. Latinoamérica y el Caribe son el resultado de una gran migración y por lo tanto de mezcla racial sus últimos 500 años de historia, con una fuerte herencia amerindia mezclada con europeos provenientes de España y Portugal, principalmente, pero también Italianos, Alemanes, Franceses, Ingleses, medio y cercano Este y Judíos Centro-europeos, así como Afro-descendientes (principalmente en Colombia, Cuba y Brasil) (Durand y cols. 2010). Esto podría explicar resultados tan disimiles como 1 en 3.862 afectados en Cuba vrs. 1 en 8.500 en México (Collazo y cols 1995; Orozco y cols. 2000). Por otro lado, estudios provenientes de Estados Unidos han aportado resultados que no son confiables, puesto que ponen en un

mismo grupo todas las personas de origen centro y suramericano como “Latinos”, restándole importancia a lo expuesto anteriormente e invalidando las frecuencias reportadas por ellos (Sugarman y cols. 2004). Además hay un sub-registro de personas que viven en los Estados Unidos habiendo ingresado de manera ilegal al país y que provienen de países latinoamericanos, entre otros ([pewhispanic.org/files/reports/46.pdf](http://pewhispanic.org/files/reports/46.pdf)).

En Colombia, la creencia arraigada en los profesionales de la salud de que esta entidad es propia de Europeos y descendientes caucásicos, ha llevado a que no sea sospechada con el consecuente sub-diagnóstico y ha evitado que se genere más interés en la caracterización de FQ en estos países, con la complacencia de los gobiernos, poco interesados en implementar y/o ampliar políticas de tamizaje y prevención de enfermedades.

Recientemente, el grupo de la Universidad del Rosario (Mateus, 2010. Datos no publicados), realizó un análisis de portadores de p.Phe508del diferentes regiones del país, divididas de la siguiente forma:

- Región centro-occidente: departamentos de Antioquia, Caldas y Quindío
- Región centro-oriente: Bogotá, Cundinamarca, Boyacá, Tolima y Santander
- Región costa norte: Bolívar, Atlántico y Magdalena
- Región del sur-occidente a Valle, Huila y Nariño
- Región sur-oriente con Meta, Casanare y Guaviare

En este análisis, la región Centro Oriente que incluye la ciudad de Bogotá y los departamentos de Boyacá, Cundinamarca, Tolima y Santander se reporta la más alta tasa de portadores para el país, siendo esta de 1 de cada 58 personas (Mateus, 2010. Datos no publicados). La comparación con estudios previos realizados en Colombia en los cuales se analizaban un menor número de personas (N=130 y 486) no indicaron diferencia en la frecuencia de portadores (Keyeux y cols 2003).

### **5.3 EL GEN CFTR**

El gen CFTR tiene una longitud de 250kb aproximadamente. Se localiza en el brazo largo del cromosoma 7, posición 7q31.2, con una longitud de 180.000 pares de bases y tiene 27 exones codificantes (Ntimbane y cols. 2008) La Figura 1 es una representación de su localización en el cromosoma.

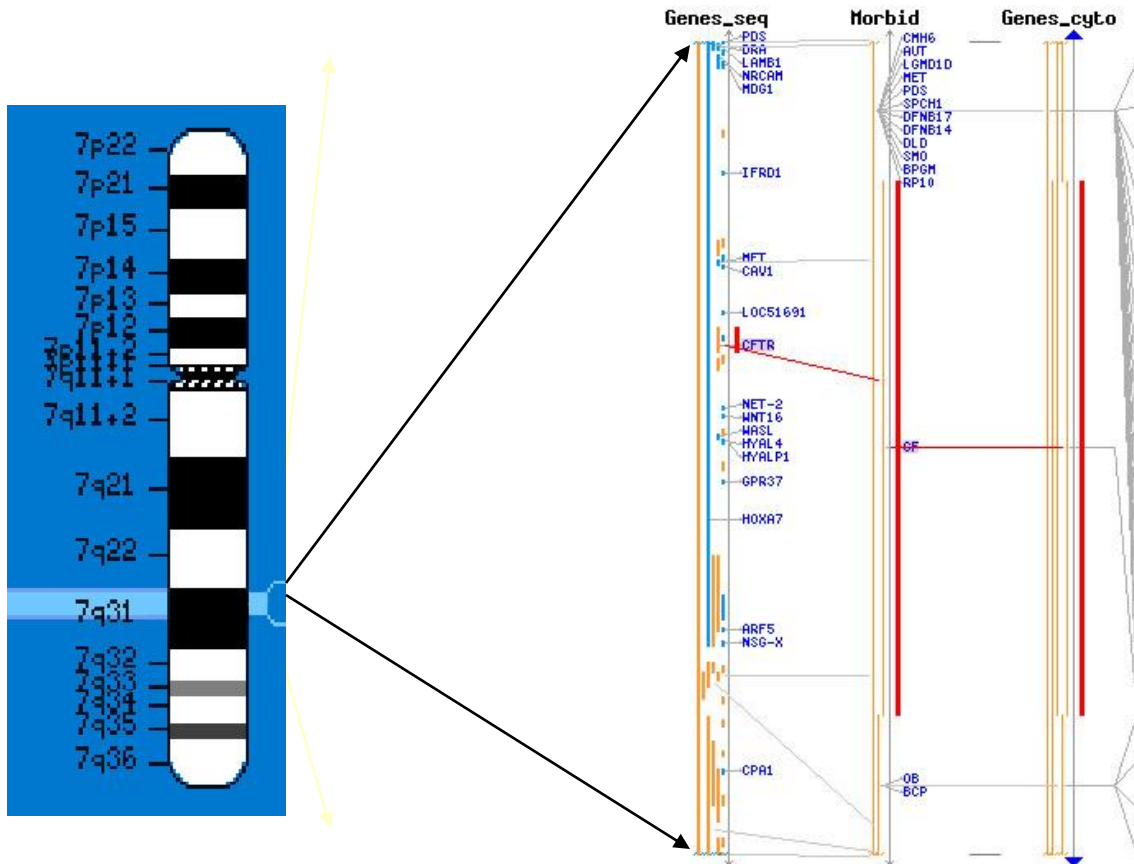


Figura 1. Localización del gen CFTR en el cromosoma 7. Tomado de <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr.html>).

Los tamaños de los exones varían entre 38 y 724 pb (Cystic Fibrosis Mutation Database 2010). El gen se expresa primariamente, aunque no exclusivamente en células epiteliales especializadas (Ott y cols., O'Sullivan y cols. 2009). Además se evidencia una alta regulación de su expresión, tanto temporalmente durante el desarrollo, como espacialmente en diferentes tipos de tejidos. El promotor de CFTR se asemeja a los de los genes Housekeeping, puesto que es una zona rica en CpG y no contiene caja TATA, además, tiene múltiples sitios de inicio de transcripción y muchos sitios putativos de unión para el factor de transcripción SP1 (por sus siglas en inglés Specificity Protein 1) (Ntimbane y cols. 2008, Kreindler, 2010). Sin embargo, no se comporta como los genes de este tipo.

### 5.3.1 LA PROTEÍNA CFTR

La transcripción del gen da lugar a un RNAm de 6,5 kb, que traduce una cadena de 1480 residuos polipeptídicos, con un peso molecular de 180 kDa. Se ha hipotetizado una estructura que ubica a la proteína CFTR en la familia ATP-binding cassette (ABC) también conocida como ATPasa de tráfico, las cuales usan energía de la hidrólisis del ATP para bombear sustratos de manera activa a través de la membrana celular (Gadsby y cols. 2006). Como es característico de esta familia, el CFTR contiene 7 dominios: Dos dominios citoplásmicos amino y carboxi terminal, dos dominios transmembrana hidrofóbicos (cada uno con 6 segmentos alfa hélice denominados TM1 a TM12), 2 dominios de unión a nucleótido (NBD1 y NBD2) y un dominio regulatorio R que une las dos mitades del polipéptido (Riordan y cols 1989, Kreindler 2010). Los dominios transmembrana forman el poro mientras que la fosforilación del dominio regulador es la que determina la actividad del canal y la hidrólisis del ATP por parte de los dominios de unión a nucleótido controlan la apertura del canal (Ntimbane, 2008). Aún no se ha logrado un modelo de cristalización de la proteína, excepto la estructura del dominio NBD1 (Lewis y cols. 2005). Existen, sin embargo, modelamientos homólogos basados en estructuras cristalizadas de transportadores tipo ABC bacterianos (Serohijos y cols. 2008). El 77% de la proteína es citoplasmática, el 19% está representado por dominios transmembrana y el 4% son loops extracelulares. (Figura. 2)

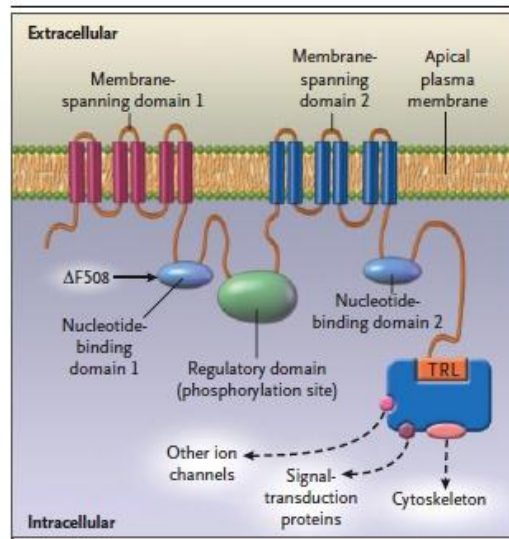


Figura 2. Tomado de NEJM 2005, 352; 19. Estructura hipotética de la proteína CFTR.

La proteína CFTR es sintetizada y alcanza el Reticulo Endoplásmico (ER por sus siglas en inglés Endoplasmic Reticulum), como un precursor glicosilado (core-glycosilated) inmaduro de 140 kDa. Este se asocia en el citoplasma con la proteína de shock térmico (70 kDa) y con la proteína de unión a  $Ca^{++}$  calnexina (90kDa), dos chaperonas moleculares que la asisten en su plegamiento y previenen su agregación antes de completar la maduración en el aparato de Golgi cuando alcanza la forma estable de 160 kDa (Turnbull y cols. 2007).

El canal CFTR es anión selectivo. En orden descendente tiene permeabilidad selectiva a  $Br^- \geq Cl^- > I^- > F^-$  (Bear y cols 1992). Igualmente puede transportar  $HCO_3^-$  (Briel y cols. 1998). Para permitir el paso de iones se requiere fosforilación del canal por Protein Kinasa A y C dependientes de AMPc (Cheng y cols 1991) principalmente, así como en presencia de ATP (Anderson y cols 1991), que al fosforilar el dominio R permite la apertura del canal. El canal vuelve a su estado basal al ser defosforilado por Protein Fosfatasas (Mogayzel y cols. 2009).

### 5.3.2 MUTACIONES EN EL GEN CFTR

La primera mutación identificada fue una deleción de 3 pares de bases en la posición 508, más conocida como p.Phe508del (Riordan y cols. 1989, Kammesheidt y cols. 2006). Esta mutación es responsable de FQ por defectos en el plegamiento del precursor polipeptídico de la proteína CFTR, la cuál es prematuramente degradada (Turnbull y cols. 2007; O'Sullivan y cols. 2009). Esta es, además, la mutación más frecuente. Actualmente se han identificado más de 1800 mutaciones, pero no se conocen todas las alteraciones funcionales (Cyr 2005). Basados en ese conocimiento se ha propuesto una clasificación. Tabla 1.

<b>Clase de mutación</b>	<b>Efecto en CFTR</b>	<b>CFTR funcional presente</b>
<b>Clase I</b>	No hay producción de proteína	No
<b>Clase II</b>	Defecto del tráfico de proteína con ubiquitinación y degradación en Retículo Endoplásmico/aparato Golgi.	No/muy reducida
<b>Clase III</b>	Regulación defectuosa. No se activa CFTR por ATP o AMPc.	No (en la membrana apical no hay proteína funcionando)
<b>Clase IV</b>	Transporte de Cloruro a través de CFTR disminuida en la membrana apical.	Si
<b>Clase V</b>	Defecto de splicing con producción disminuida de CFTR normal.	Si

Tabla 1. Clasificación de las mutaciones del gen *CFTR* por clases. Tomado y modificado de O'Sullivan 2009

En términos generales, las mutaciones más frecuentemente encontradas son: mutación pérdida del sentido (missense) que corresponde al 42%, corrimiento del marco de lectura (frameshift) con un 15%, splicing 12%, mutación sin sentido (nonsense) cerca del 10%, inserciones/deleciones dentro del marco de lectura 2%,

grandes inserciones/delecciones 3%, mutación del promotor 0,5% y variaciones de secuencia que no se consideran causantes de patología 15% de todos los alelos. Las mutaciones de novo y la disomía uniparental del cromosoma 7 portador de gen CFTR mutado son eventos excepcionales (Castellani y cols. 2008).

<b>TIPO DE MUTACIÓN</b>	<b>FRECUENCIA %</b>
Sin sentido (Missense)	41.15
Corrimiento del marco de lectura (Frameshift)	16.27
Splicing	12.11
Sin sentido (Nonsense)	8.66
In frame in/del	2.03
Large in/del	2.63
Promotor	0.66
Variación de frecuencia	13.75
Desconocidas	2.74

Tabla 2. Tipo de mutaciones según su frecuencia. Tomado de Cystic Fibrosis Mutation database, en noviembre de 2010.

(<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html>). Modificado y traducido al español.

### **5.3.3 DISTRIBUCIÓN POBLACIONAL DE LAS MUTACIONES**

Se presume que el alelo p.Phe508del tuvo un origen único hace más de 52.000 años, en una población genéticamente distinta a la Europa actual y luego se distribuyó gracias a expansiones a través del continente, razón por la cual existen diferencias en las frecuencias entre las distintas poblaciones que conforman Europa (Morral y cols. 1994).

Esta mutación es un ejemplo de las mutaciones Clase II, donde el procesamiento defectuoso da lugar a una proteína mal plegada, en parte debido a que los niveles intracelulares de Ca<sup>++</sup> están aumentados y la asociación de la proteína naciente

con la calnexina se prolonga (O'Sullivan y cols. 2009, Kreindler 2010, Rowe y cols. 2005). Entre otras hipótesis, se plantea que por esta razón es retenida en el ER y marcada para su degradación por la maquinaria de degradación del proteasoma. El alelo p.Phe508del, es la mutación más común para la mayoría de poblaciones (70%), pero las frecuencias varían desde un máximo de 100% como en las islas Faroe de Dinamarca, a un mínimo de 24,5% en Turquía (Bobadilla y cols. 2002). Existe un gradiente de distribución de p.Phe508del, que va desde el Nor-Occidente hacia el Sur-Este de Europa para esta mutación (European Working Group on CF Genetics, 1990). Europa Central, Norte, Occidente y Nor-Este muestran alta homogeneidad de mutaciones causantes de FQ, teniendo como promedio 10,2 mutaciones por país, que corresponden al 78,9% del total de cromosomas afectados. Esto se debe a la alta incidencia de p.Phe508del en estas regiones. Las excepciones son España, Bulgaria, Grecia y Turquía, los cuales son países costeros y por lo tanto han sido las puertas de entrada de migración de otros continentes a Europa y muestran una diferencia significativa con el resto de regiones del continente, siendo una gran variedad de mutaciones (25,0) las responsables del 84,0% de alelos afectados. Por lo tanto estos países deben considerar en protocolos de tamizaje neonatal que puedan detectar un amplio rango de mutaciones.

p.Gly542X es más común en la región mediterránea (Bobadilla y cols. 2002), teniendo su mayor prevalencia en el sur de España y el norte de África.

En general, existen menos de 20 mutaciones a nivel mundial que alcancen frecuencias superiores al 0,1%, con algunas excepciones en poblaciones

específicas y debidas a efecto fundador en regiones aisladas por creencias religiosas, políticas o geográficas. Por ejemplo, dentro de los judíos Ashkenazi, la mutación más frecuente es p.Trp1282X.

El estudio de las mutaciones más prevalentes para la región de Sur América ha tenido menor consistencia en cuanto a la cantidad de estudios, los tamaños de población analizada y la falta de políticas de tamizaje neonatal para esta enfermedad, por ser considerada de baja prevalencia. Si se divide a Sur América en dos regiones arbitrarias tales como “Zona Montañosa” la cual incluye a Colombia, Ecuador y Chile y “Zona Alta” que incluye Venezuela, Brasil y Argentina (Bobadilla y cols, 2002), se evidencia una diferencia de frecuencia de p.Phe508del estadísticamente significativa, siendo más alta en las regiones altas 45,3% comparado con las regiones montañosas 29,9% para esta mutación. La distribución de las mutaciones en estos países obedece a dos fenómenos. El primero es el patrón de colonización por parte de Españoles, Portugueses y Judíos para las regiones de Tierras Altas y la gran mezcla racial con las tribus indígenas que habitaban las tierras Montañosas.

En Colombia la frecuencia de p.Phe508del oscila entre el 28% y 42% (Keyeux y cols, 2003; Mateus, 2005). La segunda mutación más frecuente es la c.1811+1.6kbA>G con una frecuencia de 6,5% y en tercer lugar se encuentra p.Gly542X cuya frecuencia estaría en 3,8%. Los estudios que se han realizado muestran una gran variabilidad entre las regiones geográficas, no solo en la frecuencia de presentación de p.Phe508del, compatible con las diferencias de origen de colonos en cada región, sino también en la presencia de mutaciones no

p.Phe508del. Así, se ha descrito que en la región de Bogotá la frecuencia de la mutación c.1811+1.6kbA>G es de 10.8% (Keyeux y cols. 2003) y en la región de Boyacá c.621+1G>A tiene una frecuencia de 17.65% (Mateus, 2005)

## 5.4 FISIOPATOLOGÍA

La causa molecular de FQ está bien establecida, pero la patogenia que lleva a falla multiorganica no se ha comprendido totalmente, ya que el espectro de fenotipos y severidad en pacientes con la misma combinación de mutaciones es amplio (Du y cols 2005). Esto sugiere la existencia de factores adicionales que determinan el curso de la enfermedad de manera individual, tales como el medio ambiente y las interacciones gen-gen (Huang y cols. 2004; Ott y cols. 2009). CFTR es un canal de cloro localizado en la membrana apical en el epitelio de vías aéreas, parénquima pulmonar, conductos pancreáticos, intestino, canalículos excretores de glándulas sudoríparas, conductos biliares y conductos deferentes. Sus actividades incluyen el transporte de sal y agua así como la secreción a través de las membranas apicales de epitelios polarizados de sistemas endocrinos (Rowe y cols. 2005). Además cumple un papel regulatorio de otras vías a través de proteínas involucradas en la conductancia membranal miembros de la superfamilia de transportadores ATP-binding cassette. Estas vías incluyen: regulación de canal de Sodio epitelial (Kleven y cols. 2008), canal rectificador de salida de Cloro, canal rectificador de entrada de Potasio, trafico de vesículas y acidificación del compartimiento intracelular y procesamiento de proteínas (Rottner

y cols. 2009). Algunas evidencias permiten ubicar a CFTR como pieza clave en la regulación del transporte de  $\text{HCO}_3^-$  a través de las membranas celulares epiteliales, así como al movimiento de otros aniones, entre los que se incluyen  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{Cl}^-$  entre otros (Schwiebert y cols. 1999). También existe evidencia de que CFTR es permeable a Glutathion y está involucrado en su homeostasis (Hudson 2001). Por todo lo anterior la comprensión de CFTR como un canal de Cloro debe complementarse como la de una proteína involucrada en muchos procesos celulares tales como redes de citoesqueleto, transporte membranar de proteínas, enrutamiento o degradación de proteínas, así como receptor y regulador de apoptosis.

## 5.5 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Los síntomas asociados a FQ pueden aparecer a lo largo de la vida, sobrelapados en ocasiones y con alta variabilidad. La forma de presentación más frecuente de fibrosis quística es su forma clásica, una triada compuesta por Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, Insuficiencia Pancreática exocrina (PI) y elevación de la concentración de electrolitos en sudor. Otras manifestaciones frecuentes incluyen infertilidad en hombres debido a azoospermia obstructiva. Todas las manifestaciones clínicas del fenotipo de FQ son variables hasta cierto grado. Aproximadamente el 15% de los afectados son suficientes pancreáticos, muy pocos pueden tener niveles normales de electrolitos en sudor e incluso pueden tener un muy leve compromiso pulmonar (Massie y cols 2000). Además el fenotipo

puede incluir síntomas poco comunes como ileo meconial en recién nacidos, síndrome de obstrucción intestinal distal, pancreatitis, disfunción hepática, infertilidad en mujeres (por aumento de viscosidad del moco cervical lo cual impide en cierta medida la penetración de los espermatozoides) o diabetes entre otros (Moskowitz y cols. 2008; Rowntree y cols. 2003).

En términos generales, la base de todas las manifestaciones clínicas está en el defecto de transporte de ion cloruro fuera de la célula. La presión osmótica generada por el exceso intracelular del ion lleva a absorción incrementada de Sodio y disminución de la secreción de agua. En el tejido pulmonar esto se traduce en reabsorción del fluido periciliar, disminución del volumen de fluido en las superficies aéreas y formación de moco viscoso y grueso, lo que facilita la colonización de microorganismos y las infecciones repetidas y crónicas, puesto que estas bacterias lesionan irreversiblemente el tejido pulmonar. En el páncreas el malfuncionamiento de los canales de cloro en las células epiteliales de los ductos, se traduce en disminución de producción de jugos pancreáticos y bicarbonato, esenciales para el transporte de las enzimas. Esto obstruye los canalículos pancreáticos y las enzimas secretadas en el acino no pueden alcanzar el duodeno, lo que explica la malabsorción y digestión deficiente de macro y micronutrientes en estos pacientes (Whitcomb 2010). En cuanto a las glándulas sudoríparas, no presentan alteraciones morfológicas significativas ni obstrucción, pero influyen en la homeostasis del Cloro. En condiciones normales la secreción producida en la glándula sudorípara sufre modificaciones a lo largo del ducto. El Sodio (seguido por el Cloro) es rápidamente absorbido de la luz del ducto a través

de los canales apicales de Sodio y CFTR. Pero la alteración de este último limita la cantidad de sal que el organismo podría reutilizar. Como resultado el sudor que llega a la superficie cutánea tiene un alto contenido de sal.

### **5.5.1 Síntomas gastrointestinales**

La obstrucción intestinal ocasionada por impactación de material en el intestino delgado y grueso del recién nacido, más conocida como ileo meconial, se presenta en el 15% de los afectados. La insuficiencia pancreática, por su parte, es desarrollada en un 85 – 90% de los pacientes y puede estar presente desde el nacimiento o instaurarse durante el primer año de vida. Los síntomas incluyen heces grasosas, flatulencia, distensión abdominal y poca ganancia de peso y llevan a esteatorrea, deficiencia de vitaminas liposolubles (A, D, E y K) y desnutrición. Se ha postulado que era precisamente la desnutrición, la causa de muerte prematura de los afectados por la enfermedad reportado en los años 1938. Actualmente la terapia de reemplazo enzimático permite que la desnutrición sea mejor controlada (Waqłkowiak y cols. 2005). En pacientes con mayor edad las secreciones intestinales viscosas, la malabsorción y motilidad intestinal disminuida o estreñimiento son los principales síntomas, y las deficiencias de vitaminas liposolubles pueden manifestarse como acrodermatitis, anemia, neuropatía, ceguera nocturna, osteoporosis y desordenes de coagulación.

Por otro lado, los pacientes están en riesgo de ser afectados por cirrosis biliar focal causada por obstrucción de ductos biliares intrahepáticos, aproximadamente

en un 5% de los pacientes y generalmente se presenta a los 15 años de edad. Además se pueden desarrollar varices esofágicas secundarias que sangran fácilmente y amenazan la vida de estas personas, y requiere manejo interdisciplinario entre gastroenterólogos y cirujanos.

### 5.5.2 Enfermedad Pulmonar

Al nacimiento no se perciben cambios morfológicos en el pulmón. Sin embargo rápidamente después del nacimiento sufren cambios secundarios a la inflamación e infección. Los lavados bronquiales revelan altos contenidos de células polimorfonucleares, en niños asintomáticos. Las infecciones de vías aéreas se cronifican y las bronquiectasias, atrapamiento de aire, hipoxemia e hipercapnia se instauran. La insuficiencia pulmonar es la responsable de más del 90% de las muertes relacionadas con FQ. La siguiente es una representación gráfica del círculo vicioso. Figura 3



Figura 3. Representación gráfica que los eventos patológicos de la enfermedad pulmonar. Tomado y modificado de Rowe y cols. 2005 NEJM, Boucher 2007 Trend Mol Med, Amaral y cols 2007 Trend Pharmacol.

Los organismos patógenos que colonizan el tejido más tempranamente son *Haemophilus influenzae* y/o *Staphiloccocus aureus*, pero la *Pseudomona aeruginosa* es la más común. Las infecciones persistentes inducen la generación y secreción de citocinas quimiotácticas, responsables del reclutamiento de células pro-inflamatorias como polimorfonucleares a las vías aéreas. La *P. aeruginosa* libera toxinas y elastasas amplificando el daño, pues se induce muerte celular de los polimorfonucleares y liberación de las proteasas y elastasas contenidas en ellos, que dañan el tejido circundante e inducen más daño en otros polimorfonucleares. Además la viscosidad de las secreciones es mayor por cuenta del DNA liberado desde el interior de estas mismas células pro-inflamatorias. Se instaura un círculo vicioso pues se crean microambientes dentro de las placas de moco adheridas al epitelio, donde la *P. aeruginosa* se adhiere evitando los mecanismos de limpieza refleja y los mecanismos de respuesta inmune innata. En las fases iniciales, *P. aeruginosa* puede ser erradicada por el mismo huésped con la ayuda de terapia antibiótica agresiva, pero luego las colonias de la bacteria sintetizan una cubierta de alginato con lo que forma biofilms prácticamente imposibles de erradicar con antibioticoterapia convencional (Chambers y cols. 2007).

### **5.5.3 Desordenes endocrinos**

En el páncreas, la disfunción tiene origen en el taponamiento de los ductos intrapancreaticos por la viscosidad de las secreciones, induciendo autolisis y reemplazo del tejido por grasa (Walkowiak y cols. 2005; Whitcomb 2010). Una vez se alcanza cierto umbral de disfunción de células de los islotes de Langerhans, el

paciente desarrolla insuficiencia de insulina e intolerancia a carbohidratos. Se ha determinado que la Diabetes Mellitus Relacionada con Fibrosis Quística (CFRD por sus siglas en inglés Cystic Fibrosis-Related Diabetes Mellitus), no es igual a la Diabetes Mellitus tipo I o II, puesto que la FQ tiene factores únicos para esta condición que afectan el metabolismo de la glucosa: aumento de energía consumida, infecciones frecuentes agudas y crónicas, deficiencia de glucagón, disfunción hepática, tránsito intestinal disminuido y mayor trabajo respiratorio. La condición está asociada al daño progresivo del tejido pancreático y por lo tanto tiende a presentarse conforme el paciente gana edad (Walkowiak y cols. 2005). Además, hay una asociación entre la instauración de CFRD y la severidad de la afectación pulmonar. Las exacerbaciones son más frecuentes y el estado nutricional empeora, por lo tanto, es necesario que de manera independiente a la edad del paciente, si este se presenta con pérdida de peso inexplicada o empeoramiento de su condición pulmonar, debe sospecharse CFRD. Debería instaurarse un protocolo de vigilancia con mediciones periódicas de concentración de glucosa en sangre y test de tolerancia a la glucosa anualmente en mayores de 10 años de edad (Mogayzel y cols. 2009; Moskowitz y cols. 2008).

Otro aspecto a tener en cuenta es la osteoporosis secundaria a la deficiencia de vitamina D, inflamación sistémica crónica y uso intermitente de corticosteroides. La osteopenia es evidente desde la niñez, pero se manifiesta en la vida adulta. La reabsorción de hueso excede la formación, aún cuando se logran adecuados niveles de nutrición y estabilidad clínica.

#### **5.5.4 Reproducción**

El vaso deferente es muy sensible a la disfunción del CFTR. El 95% de los hombres afectados presentan azoospermia (Xu y cols. 2011) y son infértiles por la ausencia congénita bilateral de vasos deferentes y eso también es cierto para hombres portadores de un solo alelo mutado y asintomáticos por lo demás. Las mujeres con FQ son fértiles, en términos generales y si cuentan con un estado nutricional y pulmonar adecuado, pueden culminar con éxito el embarazo (Barak y cols. 2004; Moskowitz y cols. 2008).

En la Tabla 3 se resumen las manifestaciones clínicas

<p><b><u>General (cualquier edad)</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Historia familiar de Fibrosis Quística</li><li>• Piel con sudor salado</li><li>• Dedos de manos y pies en palillo de tambor</li><li>• Tos productiva</li><li>• Aislamiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de secreciones mucosas de vía aérea</li><li>• Alcalosis metabólica hipocloremica</li></ul>
<p><b><u>Neonatal</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Ileo meconial</li><li>• Ictericia Protracted</li><li>• Calcificaciones abdominales o escrotales</li><li>• Atresia intestinal</li></ul>

<p><b><u>Infancia</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Infiltrados persistentes en radiografías de tórax</li> <li>• No ganancia de peso</li> <li>• Anasarca o hiponatremia</li> <li>• Diarrea crónica</li> <li>• Distensión abdominal</li> <li>• Colestasis</li> <li>• Neumonía por <i>Staphylococcus aureus</i></li> <li>• Hipertensión intracraneana idiopática (deficiencia Vitamina A)</li> <li>• Anemia hemolítica (deficiencia Vitamina E: Eritrocitos con fragilidad aumentada y vida media reducida)</li> </ul>
<p><b><u>Niñez</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pansinusitis crónica o poliposis nasal</li> <li>• Esteatorrea</li> <li>• Prolapso rectal</li> <li>• Síndrome de obstrucción intestinal distal o intususcepción</li> <li>• Pancreatitis crónica idiopática recurrente</li> <li>• Enfermedad hepática</li> </ul>
<p><b><u>Adolescencia y adultez</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aspergilosis broncopulmonar alérgica</li> <li>• Pansinusitis crónica o poliposis nasal</li> <li>• Bronquiectasias</li> <li>• Hemoptisis</li> <li>• Pancreatitis idiopática recurrente</li> <li>• Hipertensión Portal</li> <li>• Pubertad retardada</li> <li>• Azoospermia secundaria a ausencia congénita bilateral de vasos deferentes</li> </ul>

Tabla 3. Manifestaciones clínicas por sistemas. Tomado y modificado de O`Sullivan 2009

## 5.6 CLASIFICACIÓN DE LA FQ (WHO 2000)

Fibrosis Quística y Trastornos relacionados

- FQ Clásica con insuficiencia pancreática (IP)
- FQ Clásica con suficiencia pancreática (SP)
- FQ atípica
- Otra FQ especificada
- Otra FQ no especificada
- Azoospermia Obstructiva aislada\*
- Pancreatitis crónica\*
- Aspergilosis Broncopulmonar Alérgica\*
- Bronquiectasias diseminadas\*
- Panbronquiolitis difusa\*
- Colangitis esclerosante\*
- Hipertripsinogenemia neonatal\*

\*Al menos una mutación en el CFTR identificada

## 5.7 CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

Por ser definida como una enfermedad monogénica y recesiva, el punto de partida para el estudio de la FQ es la presencia de dos mutaciones causantes de enfermedad, localizadas en alelos separados. El fenotipo es la consecuencia clínica y tiene tres componentes fundamentales: signos y síntomas específicos, severidad y curso en el tiempo (Kleven y cols. 2008).

Se entiende que la variación genotípica da como resultado efectos fenotípicos diferentes según el tipo de mutación. Pero los estudios de correlación genotipo-fenotipo en FQ han demostrado que hay variación sobre todo en el compromiso pancreático y en menor medida en la enfermedad pulmonar (de Gracia y cols, 2005; Walkowiak y cols. 2005). La poca correlación entre el genotipo CFTR y la severidad de la enfermedad pulmonar sugiere una gran influencia del medio ambiente y factores genéticos secundarios conocidos como genes modificadores.

El diagnóstico de FQ está basado en tres preceptos: el primero es fenotipo consistente con la enfermedad, pero las manifestaciones clínicas se han ido ampliando debido a la expresividad clínica variable identificada en los afectados. El segundo es la evidencia de disfunción del canal CFTR, el cual tiene su prueba gold standard, los electrolitos en sudor. El tercero, la evidencia de dos mutaciones en *trans* conocidas causantes de FQ. Este último es especialmente útil para confirmar el diagnóstico y brindar asesoría genética a las familias tanto en estados de portadores como para diagnóstico prenatal, si así lo desean los padres (Liou y cols. 2009).

El fenotipo más común o triada clásica está presente en la gran mayoría de pacientes con mutaciones que llevan a pérdida completa de función de la proteína, que incluyen mutaciones nonsense, corrimiento del marco de lectura y deleciones que afectan aminoácidos críticos para las funciones de canal y regulatorias de la proteína. Los fenotipos leves son causados por mutaciones tipo pérdida del sentido o de splicing, que ocasionan reducción en la función de la proteína, y por ende son suficientes pancreáticos (Zielenski, 2000).

Uno de los mejores ejemplos de la variabilidad que se presenta en la afectación pulmonar está ilustrada en un estudio realizado en 1993 por Borgo y colaboradores, en dos gemelos dicigóticos, heterocigotos compuestos para las mutaciones p.phe508del/1717-1G>A. Estos pacientes presentaban insuficiencia pancreática similar, pero el grado de compromiso pulmonar en uno era consistente con infección crónica por *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que su hermano no había requerido tratamiento antibiótico ni presentaba alteración de su función pulmonar.

La hipótesis de variantes génicas que afectan o modifican el fenotipo tiene cada vez más interés entre los investigadores. Es el caso de los polimorfismos, que son definidos como mutaciones presentes en la población en una frecuencia mayor al 1%. En un principio se pensó que serían indiferentes al curso y/o severidad de la enfermedad. Pero últimamente se han encontrado evidencias de su influencia en la severidad de la misma (Castellani y cols. 2008).

Los genes modificadores, los cuales pueden o no tener polimorfismos en ellos mismos son también determinantes en la severidad de la enfermedad.

De esta manera Castellani y cols han propuesto que en términos de consecuencias clínicas de la enfermedad, las mutaciones del gen CFTR también se podrían agrupar en cuatro grupos: A. Mutaciones causantes de FQ, B. mutaciones que resultan en un desorden relacionado con FQ, C. Mutaciones sin consecuencias clínicas conocidas y D. mutaciones sin relevancia clínica comprobada o conocida.

Por lo tanto se sabe que las mutaciones que causan la alteración funcional del canal CFTR, no pueden ser consideradas de manera independiente, puesto que el ambiente y las demás variantes genéticas, ya sean polimorfismos dentro del gen o en genes modificadores, modifican el fenotipo y lo hacen tejido específico.

## 6. DIAGNÓSTICO

La prontitud en el diagnóstico es fundamental. El diagnóstico prenatal y neonatal han cobrado importancia, así como un mejor diagnóstico clínico en cualquier etapa de la vida, por cuanto los anteriores métodos no detectan el 100% de las personas afectadas. El tratamiento de la FQ ha evolucionado ampliamente en las últimas décadas gracias a una mejor comprensión de la fisiopatología de la enfermedad (Rowntree y cols. 2003), los avances tecnológicos aplicados al desarrollo de nuevos y mejores tratamientos con menos efectos adversos y por lo tanto mejor tolerabilidad. Esto ha llevado a evaluar, modificar y mejorar estos métodos de diagnóstico (Dequeker y cols 2009).

### 6.1 DIAGNÓSTICO PRENATAL

El diagnóstico prenatal se ofrece o es requerido cuando el embarazo tiene un riesgo elevado de FQ, riesgo indeterminado o en embarazos de bajo riesgo de FQ por identificación sonográfica de patrones ecogénicos intestinales compatibles con la enfermedad (Groody y cols. 2001, Castellani y cols. 2009).

Los embarazos de alto riesgo son aquellos en los que los padres conocen su estado de portadores o tienen familiares afectados. Para ofrecer este tipo de diagnóstico, se deben conocer las mutaciones presentes en los padres. El DNA se

obtiene de muestra de vellosidades corionicas a las 12 semanas de gestación aproximadamente o por amniocentesis realizada entre las semanas 15 a 18 (National Institutes of Health 1999).

Los embarazos de riesgo indeterminado son aquellos en el que uno de los padres sabe que es portador de una mutación, pero el otro padre ha resultado negativo para un panel de mutaciones y no se conoce el estatus del feto.

Los embarazos de bajo riesgo son aquellos en los que previamente no se tenía ninguna sospecha de ser afectado por FQ, pero en quienes se detecta en la ecografía signos compatibles tales como intestino ecogénico y/o dilatado.

## **6.2 DIAGNÓSTICO NEONATAL**

El Tamizaje Neonatal es el primer paso para lograr diagnosticar personas afectadas en este primer periodo de la vida. La medición de tripsinógeno en gotas de sangre en papel de filtro es una práctica generalizada en los Estados Unidos y Europa. Dependiendo de la población y las políticas estatales se aceptan varios protocolos. Este método tiene una adecuada sensibilidad y especificidad en poblaciones con alta incidencia de la enfermedad (Centers for Disease Control and Prevention 2004, Parad y cols. 2005, Li y cols. 2006).

Debido a la cantidad creciente de evidencias que indican que el diagnóstico de la enfermedad en el periodo neonatal con la consecuente instauración del tratamiento multidisciplinario a temprana edad, aseguran una mejor calidad de vida. Esta enfermedad ha sido calificada como la enfermedad de origen genético,

fatal o letal más común en la población caucásica (O'sullivan y cols. 2009, Kreindler 2010).

Se reconoce que el tripsinógeno inmunorreactivo (TIR), un precursor enzimático pancreático, está elevado en sangre en los recién nacidos con Fibrosis Quística y continua estando elevado durante el primer año de edad, dependiendo de la severidad del compromiso pancreático (Sontag y cols. 2006). Sin embargo este es solo un método de identificación de personas con riesgo de padecer la enfermedad. El diagnóstico se hace, dependiendo del protocolo de la población en cuestión, con la prueba de electrolitos en sudor, que sigue siendo la prueba de oro, o bien con el hallazgo de la o las mutaciones por medio del análisis de una o varias mutaciones, lo cual también depende de la población.

### 6.3 DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Se acepta diagnóstico clínico si se cumplen los siguientes criterios: Presencia de una o más características fenotípicas de FQ y evidencia de función anormal en proteína CFTR basado en:

- Presencia de dos mutaciones responsables de enfermedad en el gen CFTR  
ó
- Dos valores de electrolitos en sudor >60 mEq/l ó
- Potencial Nasal transepitelial consistente con FQ

Los signos y síntomas clínicos de FQ abarcan una gran variedad de sistemas y pueden variar en severidad y su forma de presentación (Farrel y cols. 2008):

**6.3.1 Enfermedad sinopulmonar crónica:** tos productiva crónica, sibilancias crónicas y atrapamiento de aire, enfermedad obstructiva pulmonar evidente en test de función pulmonar, colonización persistente con patógenos comúnmente encontrados en individuos afectados, anormalidades crónicas en radiografía de tórax, pansinusitis crónica (Wang y cols 2010) y/o dedos en palillo de tambor.

**6.3.2 Anormalidades gastrointestinales/nutricionales:** ileo meconial, prolapso rectal, malabsorción/insuficiencia pancreática (Walkowiak y cols. 2005), esteatorrea, hipoproteinemia, deficiencia de vitaminas lipo-solubles, retardo en crecimiento, síndrome obstructivo intestinal distal, pancreatitis recurrente (Waters y cols. 1990, Cipolli y cols 2007), barro biliar, elevación de transaminasas y gamma-glutamil transferasa, hiperbilirrubinemia directa y enfermedad hepatobiliar crónica (Feranchak 2004).

**6.3.3 Azoospermia obstructiva:** Xu y cols. Demostraron recientemente el papel de CFTR en la espermatogenesis, mediante un modelo en ratón, el cual revela que los defectos en CFTR causan daño en la regulación de las principales vías regulatorias de la espermatogenesis (Xu y cols, 2011)

**6.3.4 Síndromes de pérdida de sal:** depleción de sal aguda, alcalosis metabólica crónica, deshidratación hiponatémica hipoclorémica.

## 6.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

**6.4.1 Análisis mutacional dirigido.** Se han diseñado kits, que pueden incluir múltiples mutaciones (Malcolm, 1990). En el 2004, el American College of Medical Genetics, recomendó el uso del panel que incluye 23 mutaciones en los Estados Unidos (Watson y cols 2004). Estos paneles deben ser aplicados teniendo en cuenta las características de la población para alcanzar un adecuado poder de detección (Farrell y cols. 2008; National Institutes of Health 1999).

**6.4.2 Análisis del tracto 5T/TG.** El tracto Poli T, una cadena de timidinas localizadas en el intrón 8 del gen CFTR, se relaciona con desordenes asociados con CFTR, dependiendo de su longitud. Es útil sobre todo cuando se detecta la mutación R117H. 5T se ha visto relacionada con disminución de la eficiencia de splicing del intrón 8 (National Institutes of Health 1999).

El tracto TG está localizado 5' posterior al Poli T. Cuando el número de repeticiones supera 12 p 13 y se asocia a 5T, es el mayor efecto adverso en cuanto al splicing del intrón 8.

**6.4.3 Análisis de deleciones.** El MLPA (por sus siglas en inglés Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) puede detectar deleciones que no se detectan con secuenciación (National Institutes of Health 1999).

**6.4.4 Secuenciación.** La secuenciación de todos los exones, regiones circundantes de intron/exón, regiones promotoras y regiones intrónicas específicas detecta más del 98% de las mutaciones (Montgomery y cols 2007).

## 7. ABORDAJE Y TRATAMIENTO DEL PACIENTE CON FQ

Una vez se ha establecido el diagnóstico de FQ es necesario conocer la extensión del compromiso de los diferentes órganos y sistemas y su grado de compromiso (National Institute of Health Consensus 1999, Paz-Valiñas y cols 2004, Da Paula y cols 2010, Du y cols. 2008).

### 7.1 FUNCIÓN PANCREÁTICA

- Elastasa fecal
- Contenido de grasa en heces en recolección de 72 hrs.
- Concentración sérica de vitaminas A, D y E
- Tiempo de protrombina y Razón Internacional Normalizada (INR por sus siglas en inglés International Normalized Ratio)
- Concentración de caroteno en suero (mayores de 6 meses)
- Endoscopia Gastroduodenal con canulación del ducto pancreático, para medir secreción enzimática estimulada

### 7.2 TRACTO RESPIRATORIO ALTO Y BAJO

- TAC de senos paranasales en busca de pansinusitis en individuos con presentaciones no clásicas o test de electrolitos indeterminado.
- Prueba de función pulmonar.
- Rayos X de tórax o tomografía de tórax computarizada.

- Cultivo de esputo o cultivo de orofaringe con hisopo.
- Broncoscopia y lavado alveolar para evaluar compromiso microbiano e inflamación.

### 7.3 ESTATUS CLÍNICO GENERAL / EXTENSIÓN DE LA ENFERMEDAD

- Recuento Leucocitos con recuento diferencial de células
- Electrolitos séricos, BUN, Creatinina, Glucosa
- ALT, gamma-glutamilttransferasa
- Uroanálisis

Se ha avanzado en el manejo terapéutico de la FQ. Pero, a pesar de ello, los pacientes afectados presentan sintomatología diaria, exacerbaciones de infecciones pulmonares frecuentes y muerte a edad temprana. Por tratarse de una enfermedad crónica, el objetivo de la terapia de uso crónico es desacelerar la progresión de la enfermedad.

La evidencia ha demostrado que la enfermedad pulmonar empieza muy temprano en la vida, y es necesaria una intervención temprana para adelantarse a las anormalidades del tejido, antes de que estas sean irreversibles, lo que ha dado lugar al desarrollo de guías de manejo clínico, especialmente del compromiso pulmonar, principal determinante de la morbilidad y mortalidad de los pacientes afectados (Rottner y cols 2009, Sims y cols. 2007). La terapia va encaminada a

enseñar al paciente a expulsar las secreciones de manera activa para evitar su acumulación y evitar crear un ambiente propicio para la colonización bacteriana. Sin embargo en cualquier momento se puede presentar agudización de signos y síntomas, los cuales se resumen en la tabla 4. Las exacerbaciones bacterianas pueden tratarse fuera del hospital con antibióticos orales, en especial cuando el epitelio pulmonar no está tan comprometido, pero conforme el compromiso pulmonar avanza se requieren el uso de antibióticos intravenosos, terapia respiratoria activa y adecuada nutrición, por lo que es necesario ingresar al paciente al hospital. A medida que la enfermedad compromete más el tejido pulmonar, la estrategia de terapia respiratoria debe ajustarse, por el riesgo de neumotórax y hemoptisis. Los requerimientos de oxígeno también deben ajustarse a las necesidades del paciente, evolucionando del simple requerimiento de oxígeno a ventilación crónica no invasiva, o en estadios más avanzados de la enfermedad, al trasplante pulmonar.

<b>Síntomas</b>	Aumento de la frecuencia, duración e intensidad de la tos Aumento de expectoración o instauración de la misma Cambio en la apariencia del esputo Instauración o aumento de la hemoptisis Disminución de la capacidad vital o disminución de la tolerancia al ejercicio Disminución de la calidad de vida: aumento de la fatiga, debilidad, fiebre, pobre apetito
<b>Signos Físicos</b>	Aumento del trabajo respiratorio: retracciones intercostales, uso de músculos accesorios Aumento de la frecuencia respiratoria Aparición o aumento de crepitaciones en examen de tórax Aumento del atrapamiento de aire Fiebre Pérdida de peso

Paraclínicos	Disminución del VEF1 del 10% comparado con el mejor valor en los seis meses previos Aumento del atrapamiento de aire y/o nuevo infiltrado en radiografía de tórax Leucocitosis Disminución de SaO2
--------------	---

Tabla 4. Exacerbación Pulmonar en Fibrosis Quística

En cuanto al abordaje nutricional se cuenta con la terapia de suplencia de enzimas pancreáticas exógenas que incluyen amilasa, lipasa y proteasa, vitaminas liposolubles (A, D, E y K) (Sikkens y cols. 2010; Layer y cols 2001). La ingesta de calorías debe exceder los requerimientos para un niño sano de la edad para contrarrestar la absorción deficiente de nutrientes y el gran requerimiento de energía que supone las exacerbaciones (Löhr y cols 2009). La intolerancia progresiva a la absorción de carbohidratos por daño del parénquima pancreático, descrito como Diabetes relacionada con Fibrosis Quística o CFRD (por sus siglas en inglés Cystic Fibrosis-Related Diabetes) (Moskowitz y cols. 2008). La presentación clínica de CFRD es insidiosa, pues los síntomas clásicos de hiperglicemia, tales como fatiga, polidipsia y poliuria se pueden confundir fácilmente con síntomas propios de FQ, por lo que en Estados Unidos se ha descrito la importancia de hacer un test de tolerancia a glucosa una vez al año en pacientes mayores de 10 años, para la detección temprana de intolerancia a glucosa (Ntimbane y cols 2008).

## 8. TAMIZAJE NEONATAL

El Tamizaje Neonatal busca aplicar procedimientos para seleccionar, dentro de una población, individuos aparentemente sanos, pero con probabilidad de ser afectados por una entidad. Debe cumplir con unos objetivos que incluyen que la historia natural de la enfermedad este bien caracterizada, que la instauración del tratamiento tempranamente versus tardíamente sea de gran beneficio, que haya un examen que identifique la enfermedad en etapas tempranas y que hayan intervalos definidos para la repetición del test, entre otros (Paz-Valiñas y cols. 2004; Southern, 2009).

Para asegurar el éxito de los programas de Tamizaje Neonatal, se debe cumplir con los criterios modificados de Wilson and Jungner (WHO 2008) que se resumen en 10 puntos fundamentales:

- El programa de tamizaje está respondiendo a una necesidad reconocida.
- Los objetivos del tamizaje deben ser definidos desde el comienzo.
- La población blanco del estudio debe estar bien definida.
- Debe existir evidencia científica de la efectividad del programa de tamizaje.
- El programa debe integrar educación, administrar la prueba, ofrecer tratamiento clínico y administración del programa.

- Se debe asegurar calidad, con mecanismos para minimizar los riesgos potenciales del tamizaje.
- El programa debe asegurar la escogencia informada, confidencialidad y respeto por la autonomía.
- El programa debe promover la equidad y el acceso al tamizaje para toda la población blanco.
- La evaluación del programa debe estar planeada desde el principio.
- Los beneficios del tamizaje deben superar los riesgos y/o daños.

Existen diferentes protocolos utilizando el meconio o muestras de sangre seca en papel de filtro donde se analizan los niveles de TIR de forma independiente, combinados entre ellos o con análisis moleculares. No existe un consenso de la estrategia a utilizar, pues es dependiente de la población en cuestión.

El tripsinógeno es un precursor de la enzima pancreática tripsina. Su incremento en sangre resulta de la fibrosis del tejido pancreático presente en la mayoría de los pacientes con FQ, incluso desde el periodo intrauterino, lo que lleva a reflujo de las enzimas pancreáticas a la circulación y por lo tanto niveles aumentados del mismo en plasma (Ryley y cols 1981). Una concentración elevada de TIR sugiere daño pancreático consistente (pero no específico) con FQ. Este marcador está elevado aún en pacientes con mutaciones clase IV o V, las cuales se asocian con suficiencia pancreática. Un resultado de tamizaje positivo solo indica que el recién nacido está en riesgo aumentado para desarrollar FQ (Lima Leão y cols. 2008).

Hace casi tres décadas, países como Australia (1981), Austria (1988), Bélgica (1988), Francia (1988), Italia (1973), Nueva Zelanda (1981) y Polonia (1999) lanzaron sus programas de Tamizaje Neonatal como política de salud pública a nivel nacional. En Inglaterra el programa fue adoptado a nivel nacional en 2004. Un estudio retrospectivo en estos países, realizado por la European Cystic Fibrosis Foundation, donde se analizaron 1.600.000 niños al año, detectando aproximadamente 400 casos por año, reportó que la edad media de diagnóstico en estos países es de 37 días (32–50), con protocolos heterogéneos: TIR/TIR/DNA, TIR/DNA/TIR, TIR/proteínas en meconio/TIR, TIR/electrolitos en sudor e TIR/DNA.

La medición de TIR en recién nacidos es un método validado a nivel mundial y con adecuado valor predictivo para el diagnóstico de FQ. Los niveles varían según el método utilizado y la población estudiada (Grody y cols. 2001; Li y cols, 2006). El diagnóstico temprano de la enfermedad permite el inicio de terapéutica que asegura disminución de la morbilidad y mortalidad de los afectados y mejora su calidad de vida. Las evidencias de beneficios se han medido comparando personas diagnosticadas por tamizaje o diagnosticadas por clínica, identificando mejoría en parámetros tales como: crecimiento y nutrición, colonización bacteriana, función pulmonar, supervivencia, función cognitiva y necesidad de cuidados hospitalarios (Rodriguez y cols 2008, Sands y cols. 2010).

## 9. MATERIALES Y MÉTODOS

### 9.1 TIPO DE ESTUDIO

Observacional analítico de prevalencia.

### 9.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

Se incluyeron 8.297 muestras de gotas de sangre secas de cordón umbilical en papel de filtro o tarjetas de Guthrie.

Los criterios de inclusión fueron:

- Recién nacidos vivos en la ciudad de Bogotá
- Nacimiento por parto o cesárea
- Fecha de nacimiento comprendida entre abril a septiembre de 2009
- Hospitales de la red del Distrito en convenio con el Laboratorio de Genética del Hospital de la Victoria,
- Hospitales en convenio con el Laboratorio de Genética de la Fundación Gillow
- Hospital Universitario Mayor Méderi.

Se incluye una lista de estas instituciones a continuación.

Hospital de Altamira	Hospital Universitario Mayor	CAMI Santa Librada
Hospital Bosa II Nivel	Hospital Jerusalem	Hospital Simón Bolívar E.S.E
Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria	Hospital Occidente Kennedy III Nivel	Hospital de Suba E.S.E
Centro Policlínico del Olaya	Hospital Materno Infantil	Hospital Trinidad Galán

Hospital Chapinero E.S.E	Hospital Meissen E.S.E	Hospital El Tunal
CAMI Chircales	Clínica del Occidente	UCIN Monterrey
CAMI Diana Turbay	Pablo VI de Bosa	Hospital de Usme I Nivel
Hospital El Carmen	Hospital Patio Bonito	CAMI Verbenal
Hospital Engativa II Nivel	Hospital La Perseverancia	Hospital La Victoria
Eusalud	Hospital Samper Mendoza	Videlmedica
Hospital Fontibón E.S.E	Hospital San Blas II Nivel	Hospital Vista Hermosa

Tabla 5. Instituciones de salud participantes

Los criterios de exclusión fueron:

- Inadecuada cuantificación de TIR por muestra insuficiente
- Inadecuada cuantificación por muestra deficiente (al tomar un círculo de 2 mm de diámetro, no se lograra que todos los bordes estuvieran empapados de manera regular con sangre seca).
- Pacientes que no asistieron al re-llamado para toma la segunda muestra se excluyeron del protocolo TIR-TIR (pero se incluyeron en el protocolo TIR/p.Phe508del).
- Pacientes fallecidos: imposible tomar segunda muestra

### 9.3 RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

Los datos se recopilaron utilizando un formato que incluye variables tales como:

- Institución hospitalaria
- Ciudad de nacimiento
- Número de Historia Clínica
- Régimen de salud
- Datos de la madre:

- Nombre
- Identificación
- Dirección
- Teléfonos de contacto
- Datos del recién nacidos:
  - Fecha del nacimiento
  - Sexo
  - Peso
  - Pertinencia de transfusión sanguínea
  - A término o pre-termino.

A cada paciente se le asignó un número de registro único para correcta identificación.

#### **9.4 ESTRATEGIA**

Se elaboró la estrategia teniendo en cuenta las recomendaciones del consenso europeo para la evaluación y manejo de pacientes posterior a el tamizaje neonatal (Mayell y cols European Cystic Fibrosis Society Neonatal Screening Working Group, 2009)

### 9.4.1 DIAGRAMA DE ESTRATEGIA

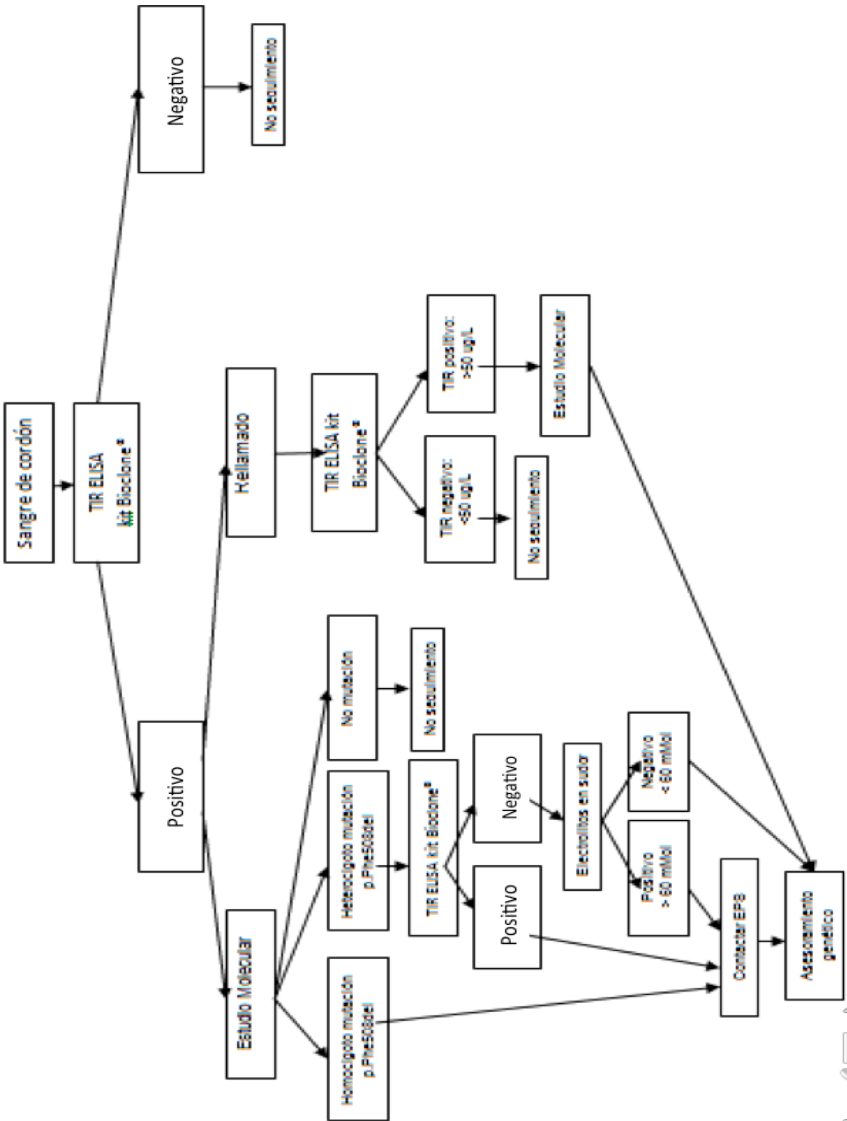


Figura 4. Diagrama de flujo para la identificación de afectados y discriminación de no afectados

## 9.5 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras fueron tomadas a partir de sangre de cordón umbilical y colectadas sobre papel de filtro SYS903 según las recomendaciones del National Committee of Standards of Laboratory (NCCLS, 1994). La sangre se puso a secar a temperatura ambiente por 4 horas, en posición horizontal, luego fueron guardadas en refrigeración en cada una de las instituciones participantes hasta su remisión a las instalaciones del laboratorio de Biología Molecular y Celular de la Universidad del Rosario, en donde se realizó la determinación inmunoenzimática de la Tripsina Inmunoreactiva.

### **9.5.1 Determinación del valor de Tripsina Inmunoreactiva mediante el Kit Neonatal TIR ELISA de Bioclone:**

Las muestras se procesaron, teniendo en cuenta las especificaciones del KIT Neonatal IRT ELISA de la casa Comercial Bioclone.

Para el análisis del biomarcador tripsina inmunoreactiva se realiza una ELISA directa donde las paredes de los pocillos de cada placa están recubiertos con anticuerpos específicos para la tripsina (antígeno), después de presentarse esa unión covalente entre anticuerpo y el biomarcador se realiza un lavado que quitara cualquier material no unido, se añade estreptavidina peroxidasa que forma enlaces múltiples con el anticuerpo biotilnado. Después se realiza otra etapa de

lavado y se adiciona la solución de sustrato que reacciona con la peroxidasa unida produciendo color en proporción directa con la cantidad de antígeno, por último se para la reacción utilizando solución stop.

### **9.5.2 materiales suministrados por el kit**

- Reactivo anticuerpo: (Solución que contiene albúmina de suero bovino)
- Reactivo amplificador: (Estreptavidina y thiomersal)
- Solución de sustrato: (Tretamethylbenzidine y peroxido de hidrogeno)
- Solución estabilizadora stop: (Acido clorhidrico)
- Pocillos recubiertos anticuerpos específicos para TIR
- Solución de lavado: (Thiomersal)
- Calibradores (0, 13.2, 30.8, 67.8, 161 y 331 ug/L)
- Control alto (93.9 – 141 ug/L)
- Control bajo (40.1 – 60.2 ug/L)

### **9.6 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

1. Cada placa contiene 96 pozos, dispuestos en tiras de 8. En cada pozo se deposita una muestra de 3 mm de diámetro, obtenida directamente de la sangre seca tomada sobre el papel de filtro S & S903. (en la primera tira de cada dos placas se colocaron los calibradores )

2. Se pipetea 100 µL del reactivo anticuerpo

3. Se cubren los pocillos y se incuban por 10 minutos en un agitador de placa a 25°C.
4. Se incuban las placas a 25°C por 24 horas
5. Al día siguiente, se ponen en agitación 10 minutos.
6. Se retiran los discos y se realiza la etapa de lavado por 5 veces, la solución de lavado contiene thiomersal, 0.09% w/V. Para esta etapa es necesario preparar la solución de lavado haciendo una dilución 1 en 15.
7. Pipetear 100 µL de reactivo amplificador
8. cubrir los pocillos e incubar con agitación por 10 minutos
9. Se repite la etapa de lavado
10. Se seca correctamente en papel absorbente la placa
11. Pipetear 100 µL de sustrato y se incuba por 10 minutos.
12. Pipetear 50 µL de solución stop
13. Se realiza la lectura punto a punto a 450nm en el lector de ELISA.

## **9.7 MANEJO DE DATOS**

Para el manejo de los datos se creó una base de datos utilizando el programa de Microsoft Excel, en la cual se consignaron los datos, registrados en la tarjeta que

contiene el papel de filtro S&S diseñada para tal fin. Se tuvieron en cuenta las siguientes variables:

- \* Institución de nacimiento del menor
- \* Ciudad y Departamento de nacimiento
- \* Número de Historia Clínica
- \* Régimen De Salud: Contributivo o Subsidiado, nombre de la EPS.
- \* Datos de la madre: Nombre, Edad, Identificación, Dirección y teléfono
- \* Datos del Recién Nacido: fecha de nacimiento, sexo, peso, talla, complicaciones, transfusión y fecha nacimiento.

Los datos obtenidos de la medición de la tripsina fueron puestos en la base de datos teniendo en cuenta el número de registro.

## 9.8 ANALISIS DE DATOS

Semanalmente se realizaron análisis de los datos obtenidos por el lector de ELISA, el cual determinó la concentración de la tripsina teniendo en cuenta la absorbancia, realizando una gráfica de tipo lineal. Estos datos deben cumplir la ley de Beer-Lambert, esta ley explica que hay una relación exponencial entre la transmisión de luz a través de una sustancia y la concentración de la sustancia, así como también entre la transmisión y la longitud del cuerpo que la luz atraviesa.

Este análisis semanal permitió la elaboración de la curva de normalidad, el análisis de las curvas de calibración y la determinación del punto de corte.

### **9.8.1 análisis de curvas de calibración**

Las curvas de calibración son independientes en cada montaje, (cada dos placas) para el control de los datos obtenidos de las muestras analizadas. Teniendo las bases de datos actualizadas, para cada curva de calibración se realizó una regresión lineal, mediante el análisis de absorbancias y concentraciones obtenidas para los calibradores suministrados en el kit. Los datos fueron introducidos en Excel y se analizaron en funciones- de regresión lineal. Donde se considera adecuado, un valor de coeficiente de correlación cercano a 1. Con los datos obtenidos para cada curva de calibración se emitió la conclusión respecto a la linealidad obtenida para los calibradores utilizados. (ANEXO1).

### **9.8.2 análisis de controles altos y bajos**

En cada montaje se corrieron los controles altos y bajos suministrados por el Kit. El control bajo aceptaba un rango de medición entre 40.1 y 60.2 ug/L, para el control alto estos valores correspondían a 93.9-141 ug/L. Se controló que estos datos estuviesen dentro de estos valores, lo cual determinaba absoluta confiabilidad de la medida de los pacientes analizados en cada corrido. En el Anexo 2 se presentan los datos de media y desviación estándar encontrada para algunos de los datos evaluados. Al verificar que los valores de los controles

analizados se encontraban en el rango esperado, se asumía que las curvas de calibración eran óptimas para el análisis.

### **9.8.3 determinación de la curva de normalidad de los datos analizados**

Semanalmente se elaboraron las gráficas de todos los resultados para ir evaluando el comportamiento de los valores de Tripsina Inmunoreactiva evaluada en sangre de cordón. Para este fin los datos obtenidos fueron filtrados y ordenados ascendentemente y posteriormente se establecieron intervalos de confianza, agrupando los datos de concentración en valores de 3 en 3, los intervalos generados fueron: valores menores de 3 ug/L, de 3.1 a 6; de 6.1 a 9 y así sucesivamente. El número de muestras para cada intervalo de confianza fue graficado, esta grafica permitió establecer si el biomarcador se comporto con distribución normal o no.

### **9.8.4 determinación del punto de corte para el valor de tripsina inmunoreactiva**

El punto de corte se determino, tomando como normal los datos situados en el percentil 95 del total de resultados de las concentraciones de tripsina inmunoreactiva realizadas en sangre de cordón umbilical. El dato de punto es expresado en ug/L.

### **9.8.5 análisis estadístico**

Las variables analizadas frente a las concentraciones de la TIR fueron la edad de madre y el peso del neonato, teniendo en cuenta este estudio como de tipo transversal se realizaron tablas de contingencia relacionando el peso del recién nacido tomando como referencia el peso normal al nacer entre 2500 g y 3500 g (Rivera, 2001) y la edad de la madre con los niveles de tripsina, para la realización de la tabla de contingencia de las edades de las madres se tomaron intervalos de 10 en 10 (21-25, 26-30 etc) para luego calcular el OR (odds ratio) con el fin de determinar si hay o no relación entre estas. Para realizar estos análisis estadísticos se utilizaron los Epidat 3.1 y SPSS.

#### **9.8.6 análisis de incidencia de FQ a nivel mundial**

Se compararon las incidencias de los diferentes países con la incidencia esperada para Colombia, por medio del cálculo del estadístico Z y el valor de P con intervalo de confianza del 95%. Para los análisis estadísticos se utilizó el programa Epidat 3.1.

### **9.9 DETERMINACIÓN DE VALORES DE TIR POR MEDIO DE ELISA EN SANGRE DE TALÓN**

Una vez se identificaron los pacientes cuyos resultados eran superiores al punto de corte se procedió de la siguiente manera:

1. Contacto telefónico o por correo regular de padres y/o responsables
2. Asignación de cita para toma de segunda muestra de sangre en talón:  
Laboratorio de Genética de la Universidad del Rosario o Laboratorio  
Fundación Gillow.
3. Procesamiento de las muestras según el inserto del kit.

El ELEGANCE NEONATAL TIR ELISA KIT™ de BIOCLONE® ha sido estandarizado para muestras de sangre de talón. El valor de corte es 50 µg/L.

## 9.10 IDENTIFICACIÓN DE LAS MUTACIONES

Se analizó la mutación p.Phe508del para todas las muestras con un primer valor de TIR mayor o igual a 60µg/L. En el caso positivo para esta mutación se analizaron además las mutaciones p.Gly542X, c.489+1G>T, c.1811+1.6kbA>G en DNA obtenido de sangre periférica, previo consentimiento informado.

### 9.10.1 Identificación de la mutación p.Phe508del

La técnica utilizada fue PCR directa- Heteroduplex a partir de gotas de sangre en papel de filtro, según lo descrito por Raskin (Raskin y cols. 1992) y estandarizado en el Laboratorio de Genética de la Universidad del Rosario (Jay y cols. 2006).

Los primers utilizados fueron:

FORWARD: 5`GTTTTCTGGATTATGCCTGG 3`

REVERSE: 5`ATGCTTTGATGACGCTTCTGT 3`

Los cuales fueron descritos por Raskin y cols. 1992

Buffer 1X
MgCl <sub>2</sub> 2,0 mM
Chelex 0,09%
dNTPs 0,07 mM
Primer F 0,5 pmol/μl
Primer R 0,5 pmol/μl

Tabla 6.1 Condiciones de PCR

Posteriormente se adicionan los discos de 3 mm de diámetro y se continúa así:

1. Programa de liberación del ADN de la mancha: tres ciclos:
  - a. 6 minutos, 94 °C
  - b. 3 minutos, 96 °C
  - c. 3 minutos, 55 °C
  - d. 3 veces el ciclo desde el segundo paso (b.).

Este proceso asegura la liberación del DNA presente en el papel de filtro.

2. Adición de 0,2 μl Taq polimerasa 5U/μl
3. programa de amplificación estandarizado:
  - a. 5 minutos, 94 °C para desnaturalización
  - b. 45 segundos, 94 °C
  - c. 45 segundos a 61 °C: alineación de primers
  - d. 45 segundos a 72 °C: fase de extensión
  - e. Se repite 39 veces desde segundo paso (b.)
  - f. 10 minutos de extensión final, 72 °C.

Análisis en gel de poliacrilamida al 10%, 120 voltios durante 1 hora. Se visualizan los productos por tinción con bromuro de etidio.

### 9.10.2 Identificación de la mutación p.Gly542X

La técnica utilizada fue PCR directa, a partir de DNA extraído de sangre periférica.

Las condiciones de PCR son las siguientes:

SOLUCIÓN CONCENTRADA
Buffer 10X
Primer 1 10pm/uL
Primer 2 10 pm/uL
Cloruro de Magnesio 50 mM
dNTPs 2 mM
Taq Polimerasa 1.2U/uL
Agua ultrapura
ADN

Tabla 6.2 Condiciones de PCR

Programa amplificación estandarizado:

- a. 5 minutos para desnaturalización 94°C.
- b. 30 segundos, 94°C
- c. 30 segundos, anillamiento 52 °C
- d. 30 segundos, extensión 72°C
- e. Repetir 39 veces desde segundo paso (b.).
- f. 10 minutos, extensión final 72°C

Posteriormente se realiza restricción con Enzima BstNI, durante 2 horas a 37°C con las siguientes condiciones:

RESTRICCIÓN
Enzima

Buffer NEB
Agua ultrapura

### 9.10.3 Identificación de la mutación c.621+G>T:

La técnica utilizada fue PCR directa, a partir de DNA extraído de sangre periférica.

Las condiciones de PCR son las siguientes:

SOLUCIÓN CONCENTRADA
Buffer 10X
Primer 1 10pm/uL
Primer 2 10 pm/uL
Cloruro de Magnesio 50 mM
dNTPs 2 mM
Taq Polimerasa 1.2U/uL
Agua ultrapura
ADN

Tabla 6.3 Condiciones de PCR

Programa amplificación estandarizado:

- a. 5 minutos para desnaturalización 94°C.
- b. 45 segundos, 94°C
- c. 45 segundos, anillamiento 61 °C
- d. 42 segundos, extensión 72°C
- e. Repetir 39 veces desde segundo paso (b.).
- f. 10 minutos, extensión final 72°C

Posteriormente se realiza restricción con Enzima Msel, durante 2 horas a 37 °C con las siguientes condiciones:

RESTRICCIÓN
Enzima
Buffer NEB
Agua ultrapura

#### 9.10.4 Identificación de la mutación c.1811+1.6KbA>G:

La técnica utilizada fue PCR directa, a partir de DNA extraído de sangre periférica.

Las condiciones de PCR son las siguientes:

SOLUCIÓN CONCENTRADA
Buffer 10X
Primer 1 10pm/uL
Primer 2 10 pm/uL
Cloruro de Magnesio 50 mM
dNTPs 2 mM
Taq Polimerasa 1.2U/uL
Agua ultrapura
ADN

Tabla 6.4 Condiciones de PCR

Programa amplificación estandarizado:

- a. 5 minutos para desnaturalización 94°C.
- b. 45 segundos, 94°C
- c. 45 segundos, anillamiento 57 °C
- d. 45 segundos, extensión 72°C
- e. Repetir 39 veces desde segundo paso (b.).
- f. 10 minutos, extensión final 72°C

Posteriormente se realiza restricción con Enzima FokI, durante 2 horas a 37°C con las siguientes condiciones:

RESTRICCIÓN
Enzima
Buffer NEB
Agua ultrapura

## 10. RESULTADOS

### 10.1 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN

Se analizaron en total 8.297 muestras de recién nacidos en Bogotá entre abril y septiembre de 2009, nacidos en diferentes hospitales de Bogotá como se muestra en la Tabla 7.

HOSPITAL	PORCENTAJE
Hospital de Altamira	0,37%
Hospital de Bosa Nivel II	4,25%
Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria	1,03%
Centro Policlínico del Olaya	11,89%
Hospital Chapinero E.S.E	0,22%
CAMI Chircales	0,46%
CAMI Diana Turbay	0,03%
Hospital El Carmen	1,5%
Hospital Engativa	3,56%
Clínica Eusalud	5,47%
Hospital de Fontibón E.S.E	4,49%
Hospital Universitario Mayor	1,61%
Hospital Jerusalén	0,10%
Hospital Occidente Kennedy	10,47%
Hospital Materno Infantil	7,91%
Hospital Meissen E.S.E	3,89%
Clínica del Occidente	6,95%
Hospital Pablo VI Bosa	2,46%
Hospital Patio Bonito	0,20%
Hospital de la Perseverancia	0,02%
Hospital Samper Mendoza	0,11%

Hospital San Blas II Nivel	4,33%
CAMI Santa Librada	0,60%
Hospital Simón Bolívar E.S.E	3,73%
Hospital de Suba E.S.E	9,04%
Hospital Trinidad Galán	0,51%
Hospital del Tunal	6,41%
UCIN de Monterrey	0,02%
Hospital de Usme I Nivel	0,48%
CAMI Verbenal	0,21%
Hospital La Victoria	6,66%
Videlmedica	0,33%
Hospital Vista Hermosa	0,54%
<b>TOTAL</b>	<b>100%</b>

Tabla 7. Distribución de los recién nacidos analizados según el hospital que remite la muestra

Los hospitales que participaron se encuentran ubicados en zonas deprimidas de la ciudad de Bogotá. En la ciudad, se han constituido seis estratos socioeconómicos cuyo objetivo primordial es establecer tarifas diferenciales para el pago de servicios públicos de acuerdo al ingreso promedio de la familia que habita una vivienda. Por otro lado, el Sistema General de Seguridad Social está concebido para ser conformado por dos grupos: personas del régimen contributivo y pertenecientes al régimen subsidiado. (<http://www.encolombia.com/economia/Economiacolombiana/Estructuradelaeconomiacolombiana3.htm>). Las zonas de influencia de los hospitales antes enumerados son principalmente estratos socioeconómicos bajos, es decir donde el ingreso *per capita* oscila entre 1 y 3 salarios mínimos (84% de la población en Bogotá) por trabajos formales, informales o subempleo (33,9% de la población en Bogotá). Por otro lado, las personas que allí acuden para ser atendidos, pertenecen al régimen subsidiado es decir, sus ingresos no les permiten aportar al Sistema de Salud. A este grupo pertenece el 70% de la población colombiana.

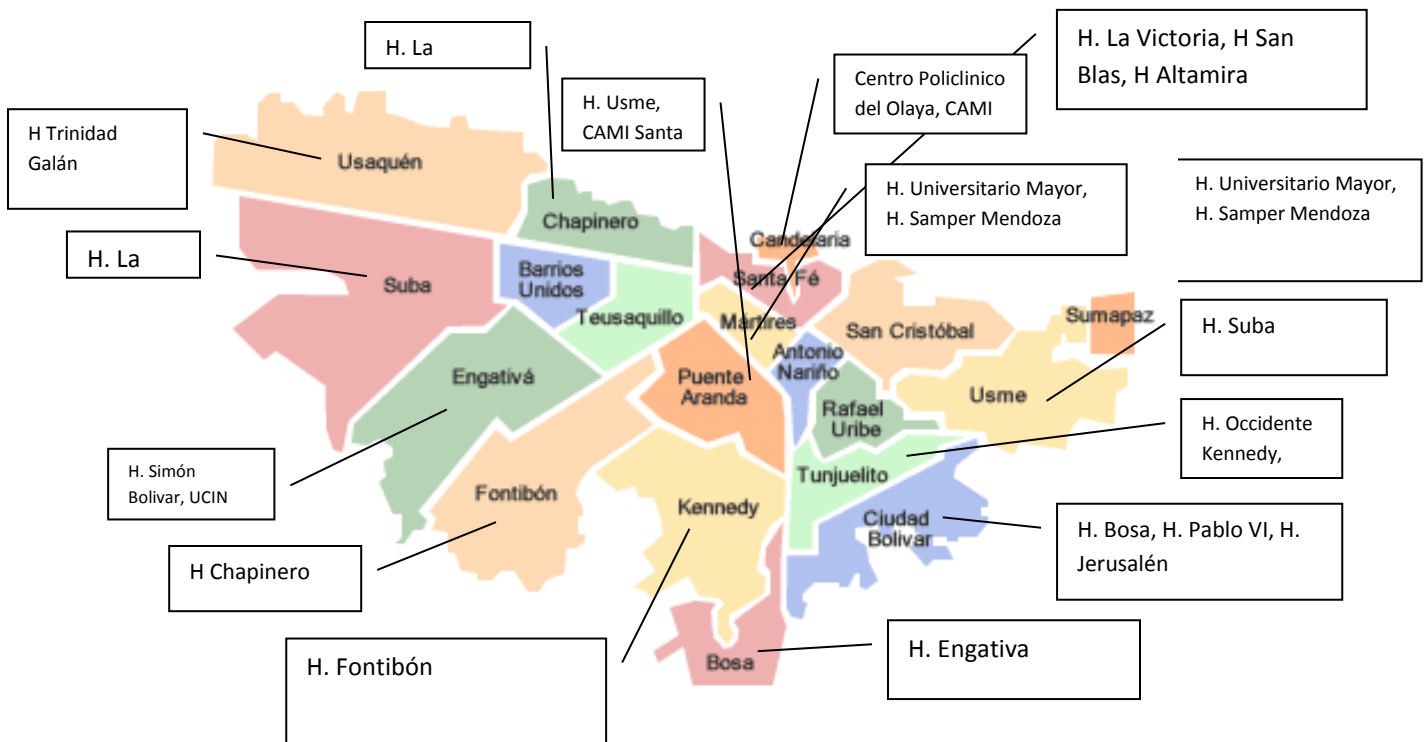


Figura 5. Distribución de los hospitales participantes por localidades. Tomado y modificado de: [www.bogotamiciudad.com](http://www.bogotamiciudad.com) página de la Cámara de Comercio de Bogotá. <http://174.142.53.171/Directorio/Detalles.aspx?BMC=134248>

LOCALIDAD	INSTITUCION	PORCENTAJE
Usme	H. Usme	0,48%
	CAMI Sta Librada	0,60%
Ciudad Bolívar	La Candelaria	1,03%
	H. Meissen	3,89%
	H. Vista hermosa	0,54%
Bosa	H. Bosa	4,25%
	H. Pablo VI	2,46%
	H. Jerusalén	0,10%
San Cristóbal	C.P.Olaya	11,89%
	CAMI Chircales	0,46%
	CAMI Diana Turbay	0,03%
Suba	H. Suba	9,04%
Engativa	H. Engativá	3,56%
Kennedy	H. Kennedy	10,47%
	Clínica del Occidente	6,95%

	H. Materno Infantil	7,91%
	CAMI Patio Bonito	0,20%
	<b>TOTAL</b>	<b>63,86%</b>

Tabla 8. Localidades destino de personas víctimas de desplazamiento forzado y su representación en la muestra objeto de la investigación

Con el objetivo de evaluar la influencia que otras variables podrían tener en los resultados de incremento de los valores de TIR diferentes a estar afectados por la enfermedad, se consideraron las siguientes variables de morbilidad y conformación por género de la población, las cuales están incluidas en las tablas 9 y 10.

<b>Variables morbilidad</b>	<b>OR</b>	<b>Intervalo de Confianza</b>	<b>Chi cuadrado</b>	<b>P</b>
Bajo peso al nacer (<2.500 gr)	1,305	0,386 – 4,410	0,185	0,667
Edad de la madre en años				
10-19	1,000	0,5124 – 9,8609	1,11	0,2903
20-29	2,247	0,6553 – 15,0619		
30-39	3,141			
≥40	0,000			

Tabla 9. Análisis de variables demográficas

<b>Género</b>	<b>Masculino</b>	<b>Femenino</b>	<b>No reportado</b>
	50,48%	49,51%	0,01%

Tabla 10. Distribución de la población por géneros.

La FQ no muestra una diferencia de presentación entre géneros, por lo cual diferencias en esta variable no serían estadísticamente significativas, y solo tienen

como objetivo hacer una descripción demográfica de la población incluida en el estudio.

## 10.2 ANALISIS DE CURVAS DE CALIBRACION

Para analizar los datos obtenidos en el lector de ELISA, se obtuvo una gráfica lineal que compara la concentración de tripsina con respecto a la absorbancia (Fig. 6), así como el cálculo del coeficiente de correlación, pendiente e intercepto (Tabla 11).

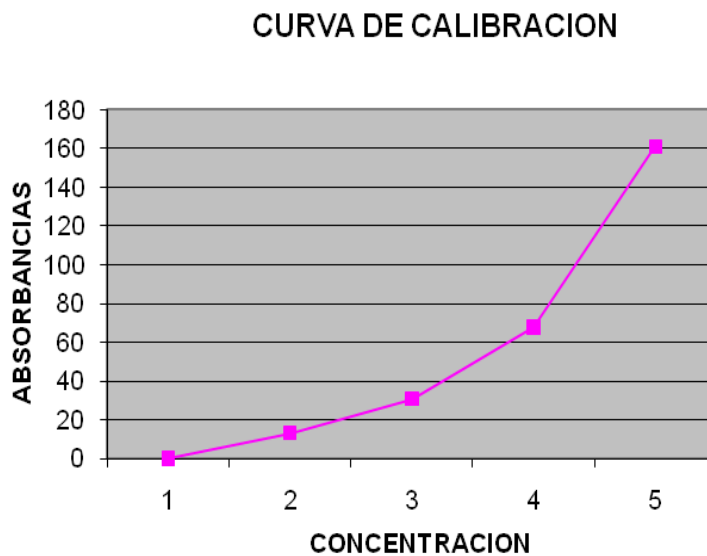


Figura 6. Curva de Calibración

CURVA	CTE CORRELACION	INTERCEPTO	PENDIENTE
1	0.980589715	0.269035903	0.269035903
2	0.980386712	0.25801906	0.261712355
3	0.990439251	0.203058161	0.016061984
4	0.984203060	0.300973568	0.015176438
5	0.988746393	0.271122948	0.015448626
6	0.993768370	0.148927067	0.014609108
7	0.981685323	0.276910537	0.014481112
8	0.988642527	0.271125946	0.015418123
9	0.988562326	0.238801047	0.013460391
10	0.987926032	0.231608492	0.011095885
11	0.997597759	0.122537305	0.015818598
12	0.995468061	0.118129756	0.013857592
13	0.989526238	0.264564512	0.014652410
14	0.996444932	0.108644233	0.014581301
15	0.985230091	0.233722693	0.014752150
16	0.980663458	0.271285069	0.011820288
17	0.989326221	0.253423121	0.013645691
18	0.983102151	0.300863657	0.014516563
19	0.987425032	0.232517382	0.011192775
20	0.990228224	0.132214716	0.015715492

Tabla 11. Curvas de calibración

El análisis permitió observar que con el uso del calibrador de concentración 331 ug/L, se perdía la linealidad de la gráfica, obteniendo un coeficiente de correlación 0.95, comparado con un valor de 0.99 a 0.98 de los otros calibradores. Por esta razón este dato se obvió en los análisis posteriores.

### 10.3 GRAFICA DE NORMALIDAD

La formación de intervalos de confianza de 3 en 3 de los datos de concentración obtenidos del análisis de tripsina inmunoreactiva, permitieron la elaboración de la grafica de normalidad para este biomarcador ( Figura 7)

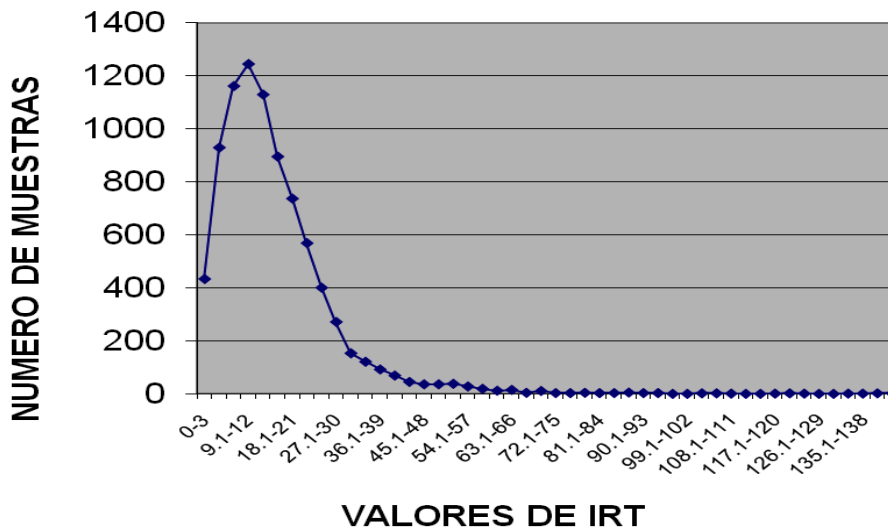


Figura 7. Distribución de valor de tripsina inmunorreactiva en muestras de sangre de cordón. Punto de corte 60  $\mu\text{g/L}$ . Percentil 95

### 10.4 PUNTO DE CORTE DE LA TRIPSINA

El análisis de la curva de normalidad permitió determinar como punto de corte 60  $\mu\text{g/L}$ , que corresponde a el percentil 95.

## 10.5 PROTOCOLOS DE TAMIZAJE NEONATAL PARA FIBROSIS QUÍSTICA

Una vez analizadas las muestras provenientes de sangre de cordón umbilical y establecido el punto de corte para la población en estudio, se analizaron los distintos abordajes para determinar cuál es el protocolo de identificación de individuos en riesgo como parte de un protocolo de Tamizaje Neonatal para Fibrosis Quística.

Se habían planteado tres abordajes, reportados también en la literatura (Corneau y cols. 2007). El primero involucra la medición de TIR en sangre de cordón umbilical, seguido por la medición de niveles de TIR en sangre de talón en quienes se hayan encontrados niveles superiores al punto de corte en el primero, también conocido como TIR/TIR (Chakraborty y cols. 1993).

El segundo abordaje involucra la medición de TIR en cordón umbilical como punto de partida y la determinación de presencia de la mutación p.Phe508del en quienes el primero fue positivo, también conocido como TIR/DNA.

Este es un diagrama de los resultados:

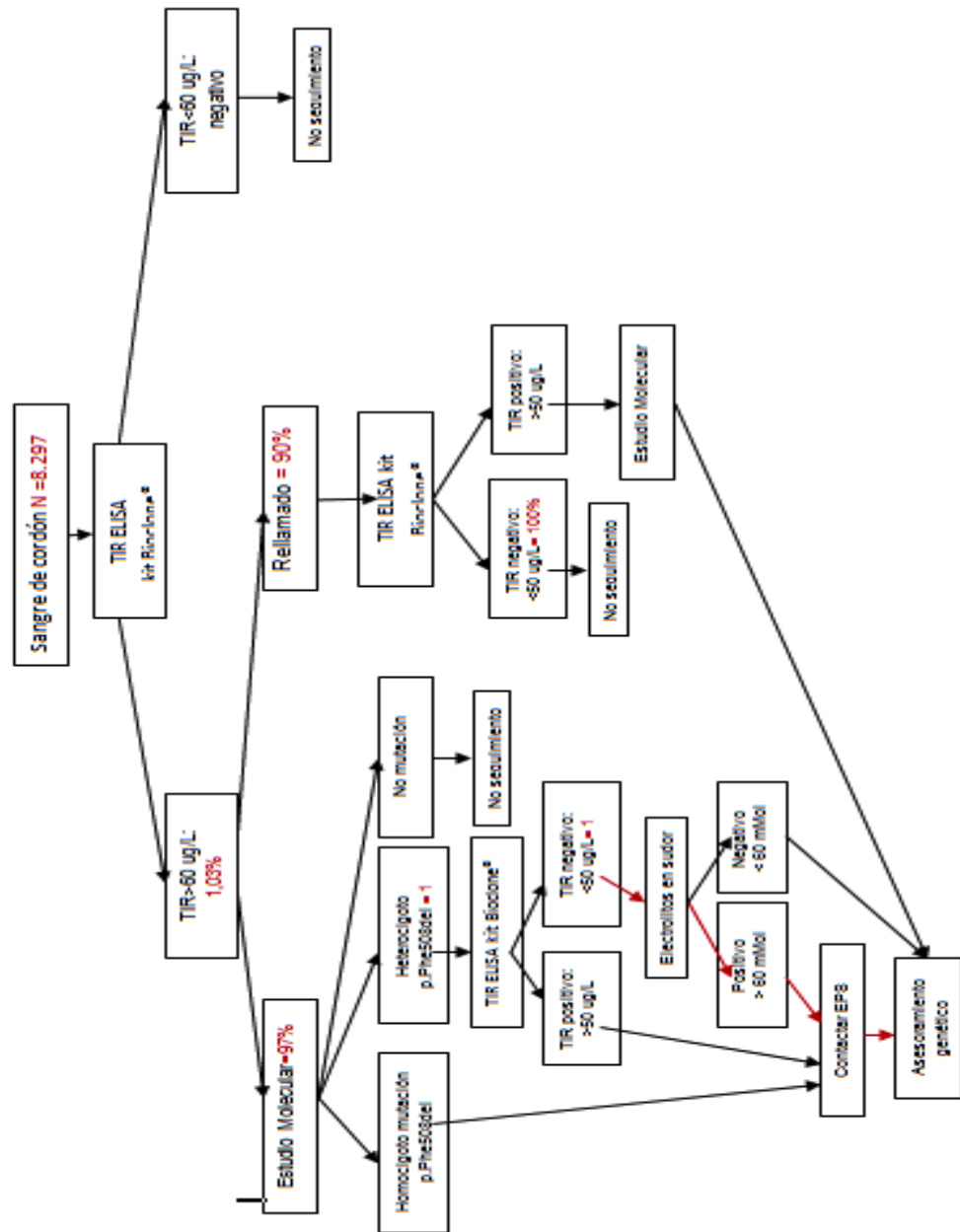


Figura 8. Diagrama de flujo con resultados

### 10.3.1 TIR/TIR

Se analizaron 8.297 muestras con los siguientes resultados.

- Niveles iguales o superiores a 60 µg/l: 85 muestras (1,03%)
- Exclusiones del estudio: No se obtuvieron muestras de talón en el 10% de los pacientes con niveles de TIR positivos por:
  - 2% fallecimiento
  - 2% se rehúsan a continuar con el estudio.
  - 6% datos falsos (no es posible contactarlos)

Utilizando los datos consignados en la base de datos, se realizaron los rellamados para la toma de la segunda muestra de sangre de talón antes de los 2 meses de edad.

Los rellamados se realizaron dentro de los 8 días posteriores a la recolección de la muestra, en promedio. Los responsables acudieron con los menores para la toma de muestra de talón a los 20 días desde el nacimiento, en promedio.

Resultados de muestras de talón (rellamados):

- 100% niveles inferiores a 50 µg/l
- El punto de corte está definido por el fabricante del Kit (inserto del *Kit Neonatal IRT ELISA Bioclone®*).

### 10.3.2 TIR/DNA

Al 100% de las muestras de sangre de talón obtenidas se les realizó análisis molecular para la mutación p.Phe508del por medio de PCR directa de papel de filtro, con el método descrito previamente. En una de estas muestras se encontró un alelo con la delección, como se muestra a continuación en la Figura 9.

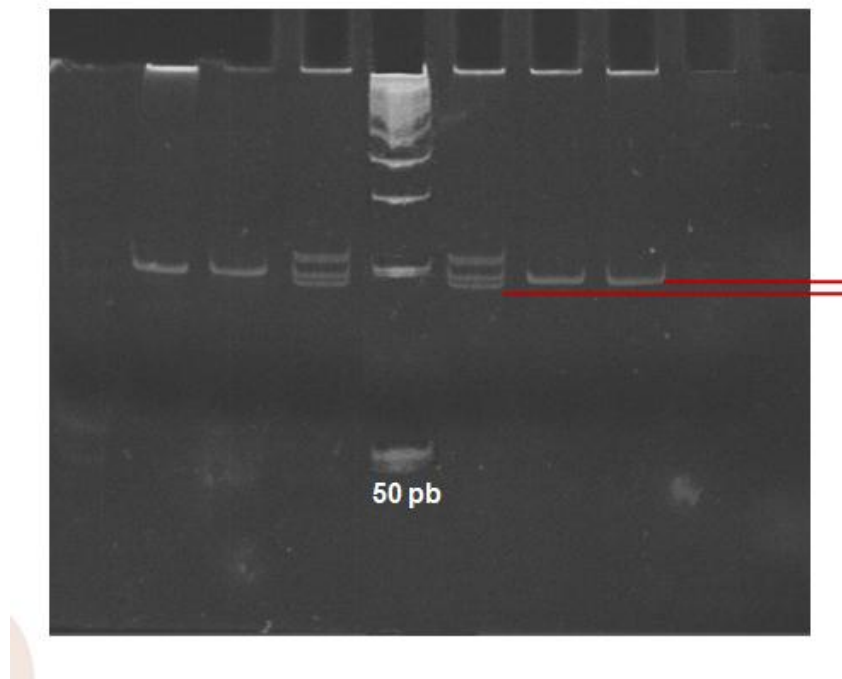


Figura 9. Mutación p.Phe508del. Carril 2 y 3: Pacientes no portadores, Carril 4: Paciente portador, Carril 5: Marcador de Peso, Carril 6: Control mutante heterocigoto, Carril 7 y 8: Control sano, Carril 9: Blanco

Todos los pacientes fueron notificados para entregarles el reporte escrito donde se consignaba el tipo de estudio realizado y los resultados obtenidos en el menor (Anexo 2).

El protocolo TIR/DNA dio positivo en un caso, encontrándose un heterocigoto para la mutación p.Phe508del por el método de PCR-heteroduplex previamente descrito.

Se realizó la prueba de electrolitos en sudor, con la técnica de iontoforesis, obteniendo un valor de 65 mmol/L, confirmando el diagnóstico de FQ

Cómo se había estipulado, se le brindó asesoría genética. Se obtuvo consentimiento para ampliar la búsqueda de las tres mutaciones más frecuentemente encontradas en Colombia: c.1811+1,6kbA>G, c.621+1KbG>T y p.Gly542X (Mateus 2005) en DNA extraído de sangre periférica. El resultado para el análisis molecular de estas mutaciones por medio de PCR y corte con enzimas de restricción, fue negativo, como se ilustra a continuación:

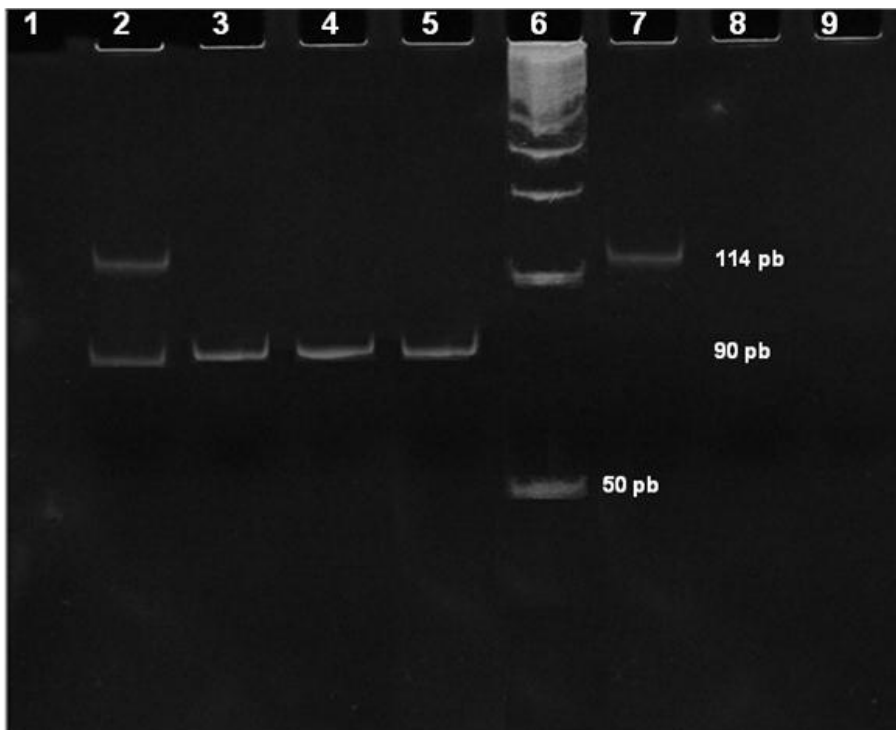


Figura 10. Mutación p.Gly542X. Carril 2: Control portador, Carril 3 y 4: Pacienteanalizador, Carril 5: Control sano, Carril 6: Marcador de Peso, Carril 7: Control mutante homocigoto, Carril 8: Blanco.

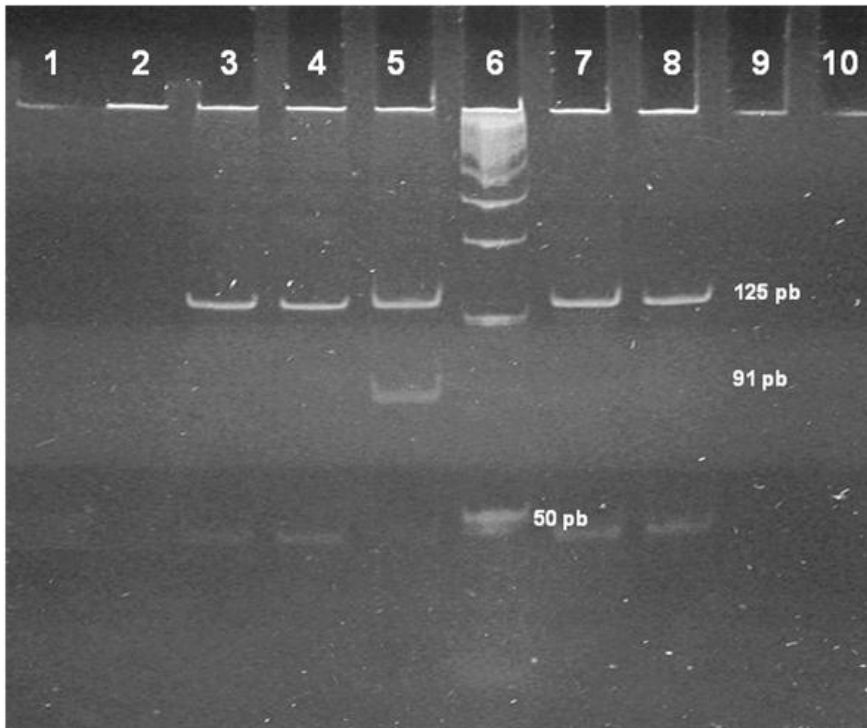


Figura 11. Mutación c.1.811+1.6kbA>G. Carril 3 y 4: Paciente no portador, Carril 5: Control mutante heterocigoto, Carril 6: Marcador de Peso, Carril 7: Control sano, Carril 8: Paciente no portador, Carril 9: Blanco

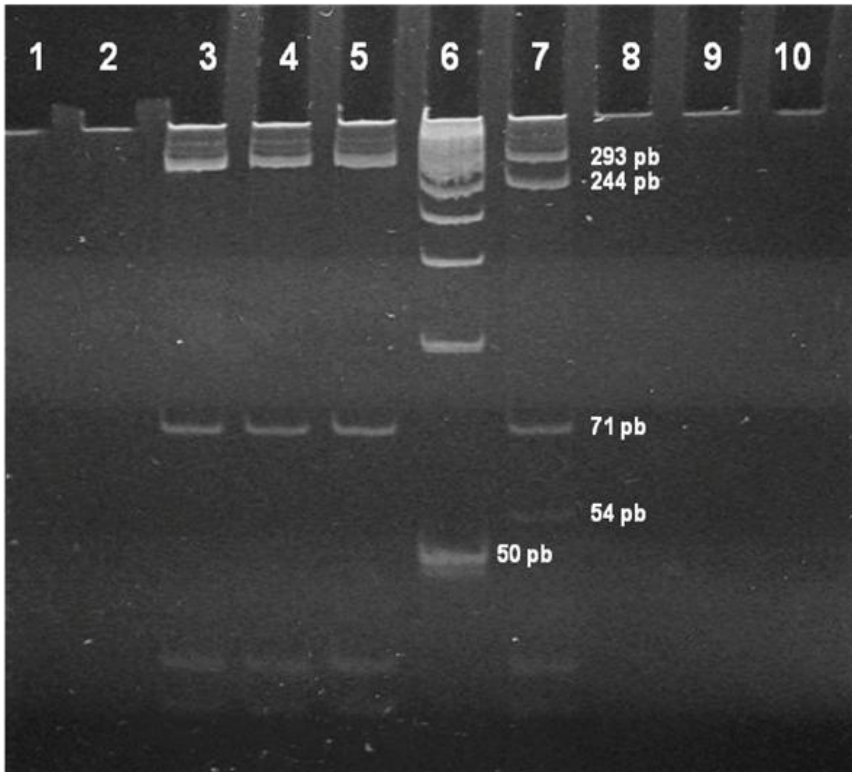


Figura 12. Mutación c.621+1G>T. Carril 3 y 4: Paciente no portador, Carril 5: Control sano, Carril 6: Marcador de peso, Carril 7: Control mutante heterocigoto, Carril 8: Blanco.

### 10.3.3 TIR/DNA/TIR

Al paciente heterocigoto para la mutación p.Phe508del se determinó el nivel de TIR en sangre de talón. El valor fue por debajo del punto de corte (47 ug/L).

## 10.4 INCIDENCIA DE FIBROSIS QUÍSTICA EN LA MUESTRA ANALIZADA

En los recién nacidos evaluados, analizando bajo la estrategia TIR/DNA se logró identificar un afectado de Fibrosis Quística que indica una incidencia de 1 en 8297 para la muestra analizada.

### 10.4.1 comparación con otras poblaciones

Teniendo los datos de incidencia de FQ para otras poblaciones a nivel mundial y la incidencia esperada para Colombia, se calculó el estadístico z y el valor de P con los siguientes resultados:

POBLACIÓN	INCIDENCIA	Valor de Z	Valor de P
Caucásicos	1/2.500	3,74	0
Afroamericanos	1/15.000	0,9177	0,3588
Hawaii	1/89.000	2,7736	0.0055
México	1/9.000	0	1
Argentina	1/6.500	0,3849	0.7003
Brasil	1/6.900	0,1961	0.8445
Uruguay	1/9.600	0,2132	0,8312
Chile	1/8.000	0,2041	0,8382
Colombia	1/5.025	1,2375	0,2159
Bogotá	1/7.225	0	1

Tabla 12. Comparación de incidencia de FQ a nivel mundial, con la incidencia esperada en Colombia. (Nivel de Significancia: 95%,  $P < 0,05$ ).

## 11. DISCUSIÓN

La FQ es una enfermedad de origen genético y herencia autosómica recesiva, con compromiso multisistémico, y elevada morbilidad y mortalidad. El gen responsable presenta gran heterogeneidad mutacional y las frecuencias de las mutaciones son población específicas. Un mejor entendimiento de la historia natural y fisiopatología ha puesto en evidencia la importancia del diagnóstico temprano para mejorar la calidad de vida de los afectados, aumentar la sobrevida y disminuir los costos para el sistema de salud.

La incidencia de la enfermedad varía según la población analizada. En Europa y Canadá la enfermedad se presenta en 1 en 2.500 RNV y la mutación más frecuente es p.Phe508del. En Estados Unidos la incidencia en la población de origen caucásico es similar, sin embargo, es uno de los países con mayor migración extranjera y eso hace que existan variaciones en la frecuencia mutacional y la incidencia según la población analizada. En Australia la incidencia es de 1 en 2.500 y p.Phe508del la mutación más frecuente (Balnaves y cols, 1995). En Hawaii, es de 1 en 89.000. En Centro América se conocen datos de México de 1 en 9.000 RNV (Grebe y cols 1994), mientras que Cuba reporta incidencia de 1 en 3.862 (Collazo y cols. 1995) En Sur América se conocen las incidencias de Argentina 1 en 6.500 (Visich y cols 2002), Brasil 1 en 6.900 (Cabello y cols 1999), Uruguay 1 en 9.600 (Luzardo y cols 2002) y Chile 1 en 4.000 a 1 en 8.000 (Rios y cols 1994; Sánchez y cols. 2001; Astudillo y cols 2008).

Los resultados del presente trabajo muestran una incidencia de 1 en 8.297 en la muestra analizada, comparable con la reportada en otros países latinoamericanos, como se consignó anteriormente.

Los datos de incidencia en Latinoamérica, incluyendo la reportada en nuestro estudio, varían de manera considerable, lo cual probablemente es el reflejo de la heterogeneidad étnica de todas las poblaciones latinoamericanas (Pérez y cols. 2006). En países como Uruguay, el principal componente es caucásico (86% o más) con 6-11% de individuos de origen Africano y 1-2% Amerindio, mientras que en Argentina (Oller y cols. 2006) se estima que cerca del 90% de la población es caucásica, lo que determinaría que la incidencia tuviera diferencias significativas con nuestra población, que se caracteriza por ser mestiza hasta en un 57%, resultado de la mezcla entre los españoles y europeos que conquistaron y colonizaron el territorio desde el siglo XVI hasta el XIX, los africanos importados como esclavos desde el siglo XVII hasta comienzos del XIX, y los aborígenes americanos (Luzardo y cols, 2002, Human Genetics Programme/Chronic Diseases and health Promotion/ World Health Organization, 2002). Esta observación, es discutida por Cardoso y cols, 2004, quien reporta una baja presencia de Fibrosis Quística en Uruguayos descendientes de Europeos, explicado por el hecho de la mezcla de acervos genéticos que se ha dado no solo en ese país, sino en general en Sur América, condición que ha determinado modificaciones en la prevalencia esperada para afectados y portadores de FQ en diferentes poblaciones latinoamericanas (Cardoso y cols, 2004; Lesser 2006; Restrepo y cols 2000). De la misma manera en algunas zonas de Europa como Francia, los programas de

tamizaje han reportado frecuencias de FQ de hasta 1/8.885, valor mucho más bajo del esperado de 1/3.500 (Des Georges M et al, 2004); estos comportamientos indican que en la variabilidad de aparición de portadores y afectados de FQ debe ser analizado el origen étnico, el mestizaje, la heterogeneidad de mutaciones y el método de identificación utilizado (Pérez y cols. 2006).

Determinar la incidencia de FQ en una población permite establecer la pertinencia de su inclusión en un programa de tamizaje neonatal, así como su posible impacto en salud pública. Los programas de tamizaje permiten la identificación temprana de los afectados. Actualmente países como Estados Unidos, Canadá, Australia, Argentina y Brasil, entre otros, han implementado dichos programas. Las estrategias utilizadas son: TIR/TIR, TIR/DNA O TIR/DNA/TIR y por lo general las muestras analizadas son obtenidas de sangre de talón entre las primeras 72 horas de vida.

En este estudio decidimos realizar el análisis de TIR en sangre de cordón umbilical, teniendo en cuenta que para la medición de TSH para Hipotiroidismo congénito en el país se utiliza esta muestra, por lo que se hace necesario que para TIR se utilice la misma, facilitando así la inclusión de enfermedades genéticas importantes como la Fibrosis Quística en los programas de Tamizaje (Carrillo y cols. 1986). En Colombia y otros países se ha identificado múltiples factores que no facilitan la toma de la muestra en talón a los 2 o 3 días del nacimiento, como lo son familias de recién nacidos que viven en zonas de difícil acceso, egresos tempranos de la maternidad y desconocimiento de los padres acerca de la prueba (Frometa, 2001).

En Colombia no hay programas de Tamizaje Neonatal para esta enfermedad, ni se tiene conocimiento acerca del comportamiento de la TIR, la cual es el biomarcador de elección para los cribados ya establecidos en otros países. La TIR es utilizada en el Tamizaje porque esta enzima se ve alterada cuando hay un daño en la función exocrina del páncreas, a causa del defecto del gen CFTR, afección que se puede presentar en el 85 al 95% de los pacientes. Este metabolito puede ser fácilmente evaluado a través de ensayos como el propuesto en esta investigación, mediante análisis inmunoenzimáticos; este hecho es de gran importancia ya que uno de los criterios de elección para que un metabolito sea usado como marcador en tamizaje es que la metodología de elección sea fácil, accesible y eficaz.

El valor del punto de corte de la TIR en muestras de sangre de cordón umbilical fue 60 ug/L. El establecimiento de un adecuado punto de corte es determinante en la evaluación posterior de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para el programa de Tamizaje en que se vaya a utilizar el biomarcador analizado. Generalmente los mejores resultados se logran si se toman como normales los valores que se encuentran entre los percentiles 98 y 99. Si tenemos en cuenta el comportamiento de la TIR en pacientes afectados con FQ, un punto de corte con un valor más bajo que el determinado en el presente estudio, aumentara el número de falsos positivos. Sin embargo, como este trabajo pretendía establecer la incidencia real de la enfermedad, era preferible aumentar el número de falsos positivos y no correr el riesgo de no identificar verdaderos afectados, llevando a la aparición de falsos negativos.

Al identificar pacientes con niveles mayores al punto de corte es importante tener en cuenta que no siempre significa que este tenga la enfermedad, los niveles de TIR se pueden encontrar elevados por diversos factores como lo son, la diabetes mellitus e insuficiencia pancreática por otras causas como desnutrición, entre otros, lo cual llevaría a la generación de falsos positivos (Massie y cols. 2000). De la misma manera es posible encontrar valores de TIR normales o disminuidos en pacientes afectados dependiendo el compromiso pancreático, cuando este es severo (necrosis pancreática) se disminuye por completo la TIR (Sontag, 2006) o en ileo meconial. También puede ser negativo en pacientes suficientes que corresponden a cerca del 15% de los casos (Rodrigues y cols. 2008). Sin embargo, se ha demostrado que un falso negativo del tamizaje neonatal no es determinante para la sospecha clínica de FQ (MacLean, 2011).

Este es el primer estudio que establece el punto de corte de TIR en sangre de cordón umbilical, en otros países este se ha establecido en sangre de talón en donde el valor normal oscila entre 50 y 70ug/L (López, 1.998).

Al realizar la determinación de TIR mediante técnicas inmunoenzimáticas es importante el análisis de las curvas de calibración con el fin de verificar que la lectura de las absorbancias de las muestras sean confiables, y así se determine el valor de concentración exacto de cada una de ellas. Esta confiabilidad se sustenta en el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer que indica una directa dependencia entre las variables de concentración VS absorbancia. Si dicha relación se cumple se evidenciaran, para las curvas de calibración, los coeficientes de correlación cercanos a 1 (Chang, 2002). En el presente estudio se observó que las curvas de

calibración perdían su linealidad, cuando era incluido el valor de absorbancia correspondiente al calibrador de concentración de 331.0 ug/L proporcionado por el Kit, lo cual se presenta cuando se pierde la relación lineal entre el valor de absorbancia y la concentración del calibrador. En este caso, logramos documentar una desviación de la ley de Lambert Beer negativa, ya que se observó que el valor de absorbancia de este calibrador era menor que el esperado, y presentaba valores casi iguales a los obtenidos para el calibrador de concentración de 161 ug/L (anexo). Las desviaciones de la ley de Beer en concentraciones elevadas, se explican ya que la distancia promedio entre los iones o moléculas de las especies absorbentes disminuyen tanto que determina que cada partícula afecta la distribución de carga y por lo tanto de absorción de las partículas vecinas. Este efecto lleva a que la energía transmitida sea muy pequeña, generando un error en la lectura que es llamado error fotométrico (Baeza, 2.006). Esta desviación de la Ley de Beer puede generar, si no es detectada, errores en las lecturas de las muestras, razón por la cual, este calibrador no fue tenido en cuenta en ninguna de las mediciones de TIR realizadas en las muestras de sangre de los recién nacidos. La solución a la desviación detectada es diluir el calibrador a concentraciones que estén en el intervalo de lectura adecuado. En esta investigación se utilizaron calibradores dispuestos como manchas secas sobre papel filtro SyS 903, y no fue posible corregir el error.

El análisis de los valores obtenidos para los controles altos y bajos suministrados en el Kit evaluado, indican que estos se mantuvieron en el rango esperado, y la mayoría de los datos se situaron en la tendencia central de control bajo en 50,31

$\mu\text{g/L}$  ( $\pm 6,12$ ) y control alto en  $120,16 \mu\text{g/L}$  ( $\pm 16,54$ ). La tendencia de los controles es una medida que evalúa el comportamiento de los datos bajo la curva de calibración usada para el día del análisis y refuerza la confiabilidad y aceptabilidad de los valores desconocidos de las muestras, obviamente con el análisis conjunto de los coeficientes de correlación anteriormente discutidos.

En cuanto a las variables sociodemográficas analizadas se determinó que el bajo peso al nacer ( $<2500\text{g}$ ) incrementa 1,3 veces la probabilidad de encontrar elevada la TIR, sin embargo este incremento no es estadísticamente significativo ( $p=0,667$ ), por lo que no podemos concluir que estas variables estén asociadas. Aun así, es importante resaltar que reportes de literatura previos hechos sobre resultados masivos de programas de Tamizaje Neonatal, han indicado que una de las causas de falsos positivos es el bajo peso al nacer. Esto puede estar relacionado con pobre nutrición, de la cual el bajo peso al nacer es un indicador y la insuficiencia pancreática transitoria es consecuencia, y explicaría por qué la TIR se eleva (Kloosterboer, et al 2009).

En la presente investigación se analizan tres estrategias, encontrándose que la estrategia TIR/DNA identificó un paciente afectado, en quien el test de electrolitos en sudor fue positivo (Mishra y cols. 2008). Si comparamos este resultado con la estrategia TIR/TIR, se evidencia que se obtuvo un falso negativo al analizar la muestra de talón. En otras poblaciones se ha reportado un porcentaje de falsos negativos de 15%, sensibilidad de 84,7% y especificidad de 98,6%. Sin embargo, las limitaciones del presente estudio para hacer seguimiento a largo plazo de los pacientes tamizados, no nos permiten conocer el número de falsos negativos. Solo

se tiene la evidencia de un caso en el cual el nivel de TIR de talón se encontraba por debajo del punto de corte, a pesar de ser afectado para FQ. Además la estrategia TIR/DNA/TIR obtuvo un caso positivo, pero el análisis de TIR en sangre de talón no fue determinante y no se evitó la prueba confirmatoria de electrolitos en sudor. Según la literatura, esta estrategia tiene un porcentaje de falsos negativos tan baja como 5,7%, con sensibilidad de 94,2% y especificidad de 98,2% (Paz-Valiñas y cols 2004), en poblaciones donde la frecuencia de la mutación p.Phe508del es mucho más elevada que para la población analizada en esta investigación (Paz-Valiñas y cols. 2004, Mateus 2005).

Con respecto a las estrategias para el tamizaje neonatal de FQ, en la literatura mundial el abordaje TIR/TIR es ampliamente utilizado, en especial para poblaciones con alta heterogeneidad mutacional, puesto que el TIR es una forma indirecta de medir la afección pancreática en el neonato (Ross 2008, Price 2006). Las desventajas del método incluyen que el tripsinógeno es inestable si el análisis no se realiza a tiempo o si el almacenamiento de las muestras no es el adecuado (Pitt, 2010, Riley y cols, 1981). El poder predictivo es mayor cuando se toma una segunda muestra dentro de las 2 a 4 semanas posteriores al nacimiento en todos los neonatos analizados (Castellani y cols 1997). Esto se debe a que la primera muestra de TIR tomada después del nacimiento tiene un bajo poder discriminativo, pues puede estar elevada por otras causas, pero los niveles de la misma disminuyen rápidamente en el neonato no afectado por FQ. Por esta razón la prueba se repite antes de los 2 meses de edad, con lo que se aumenta el valor predictivo positivo. En poblaciones donde se conocen las mutaciones más

frecuentemente asociadas con el fenotipo se utiliza la estrategia TIR/DNA con el panel de mutaciones que ha probado mayor sensibilidad y especificidad. Y por último la estrategia TIR/DNA/TIR, que busca disminuir el número de pruebas de electrolitos en sudor, analiza una segunda muestra el nivel de TIR, si se ha encontrado una mutación en CFTR. En todos los estudios, la prueba diagnóstica de referencia o Gold Standard fue electrolitos en sudor (Castellani, y cols. 1997).

En Latinoamérica los programas de Tamizaje Neonatal son recientes. En Argentina se implementó la estrategia TIR/TIR y en Brasil TIR/DNA utilizando un panel de mutaciones. Esto se debe en parte a que las incidencias que se han reportado son disimiles, siendo en Argentina 1: 5.600 Recién Nacidos Vivos (RNV) y en Brasil 1: 7.576 RNV (Raskin y cols 2008).

En Estados Unidos la población es heterogénea y las mutaciones responsables de la enfermedad varían según el grupo analizado. En Afro-americanos la incidencia es tan baja como 1 en 15.000 RNV y las mutaciones más frecuentes después de p.Phe508del son: 3120+1G>A, p.Gly551Asp, 1717-1G>A, etc.; mientras que en el grupo denominado Hispanos es de 1 en 9.200, siendo las mutaciones más prevalentes p.Phe508del, p.Gly542X, p.Arg334Trp, entre otras (Sugarman y cols. 2004). Habiendo observado estas variaciones, se ha sugerido incluir un nuevo número de mutaciones en el panel general de este país, cuando se trate de personas pertenecientes a estos dos grupos étnicos (Alper y cols. 2004).

Dentro de los inconvenientes encontrados durante el estudio, en particular para el desarrollo del protocolo TIR/TIR se encuentran la dificultad para establecer

comunicación con los responsables de los recién nacidos, con resultados positivos para tripsinógeno en sangre de cordón. Un porcentaje (10%) habían brindado información falsa o equivocada al pedirles teléfonos de contacto y/o dirección de residencia. Posiblemente porque pertenecen al grupo de población pobre no asegurada y que no podían pagar los gastos hospitalarios que acarrea la atención del parto, dieron información falsa para evitar sanciones y cobros por parte de la Institución Prestadora de Salud, una práctica generalizada en esta población. La estrategia para prevenir este fenómeno, sería explicar a las madres la importancia de dar datos precisos en el caso de necesitar una segunda muestra y asegurarles que no tiene costos adicionales, estrategia que ha sido efectiva para el caso del hipotiroidismo (Satizabal y cols 2001).

Adicionalmente, fue difícil explicar al padre o acudiente del menor las razones probables por las cuales el valor del examen había sido alto sin generar mayor aprehensión, pero dejando claro la importancia de tomar una segunda muestra para corroborar este primer valor e incluir al neonato en el estudio molecular. Este aspecto ha sido observado en otros países en los cuales se decidió implementar la segunda toma de muestra como una parte normal de la evaluación por el pediatra en las primeras dos semanas posteriores al nacimiento (Castellani y cols. 1997). Esta medida asegura que el porcentaje de personas que no acuden a la cita para la segunda muestra sea muy bajo y no genera ningún tipo de prejuicio en los padres (Castellani y cols. 1997).

Una de las principales limitaciones del estudio fue la asistencia a toma de segunda muestra. Razones culturales que incluyen la creencia de que los 40 días

posteriores al parto o cesárea, las madres deben permanecer en reposo absoluto. Económicas por cuanto algunos no tienen los recursos para desplazarse en transporte público ni poseen medio de transporte privado. Igualmente algunos manifestaron su preocupación de que era una forma de atraerlos para luego cobrarles la atención del parto. Otros argumentaban que podrían perder el trabajo al ausentarse, después de haber tomado los algún tiempo por motivo del nacimiento del bebe, con lo que solo en el 87% de los casos fuera exitosa la toma de la segunda muestra.

Para el protocolo TIR/DNA, se realizó PCR directa con el método descrito por Raskin y estandarizada en el laboratorio de Genética Molecular de la Universidad del Rosario (Jay y cols., 2006). Este protocolo tiene como ventajas que una sola muestra de sangre, la de cordón, es suficiente y adecuada para el análisis molecular (Rock, 2005; Castellani 1997). Se supera las limitaciones de comunicación con los padres, la ansiedad que se genera en los mismos y los obstáculos que impiden que los padres acudan con sus hijos a la segunda toma de muestra y que permitiría realizar el análisis al 100% de los pacientes que positivos para el TIR en sangre de cordón. Fue este método el que permitió identificar el paciente afectado (De Boeck y cols, 2006, Farrel y cols, 2008, Saultan y cols, 2008).

Sin embargo, el protocolo TIR/DNA aumenta el hallazgo de portadores sanos de la enfermedad y este no es el objetivo de un programa de tamizaje (Farrel y cols 2002, Corenau y cols 2004, Massie y cols. 2006), aunque se ha encontrado que

esta información permite a las parejas tomar diferentes decisiones en cuanto a su planificación familiar que han disminuido notablemente la incidencia de la enfermedad en estas poblaciones (Cunningham y cols, 1998; Roqué y cols, 2001; Canadian Patient Data Registry National Report, 1995)

El otro inconveniente del protocolo TIR/DNA (p.Phe508del) es la evidente heterogeneidad mutacional del gen a nivel mundial. La población colombiana es el resultado de la mezcla racial de indígenas que residían en el continente, con los europeos conquistadores (Alonso y cols, 2007) y con africanos. Estudios de DNA mitocondrial confirman esta población resultante conocida como mestizo (Rodas y cols. 2003, Keyeux y cols. 2002; Bobadilla y cols, 2002; Pérez y cols. 2006). Por esta razón y a pesar de que la mutación más prevalente es p.Phe508del, su frecuencia solo alcanza el 42% (Mateus, 2005). Los patrones de colonización, mezcla racial y migración, diferentes según la región por sus características climáticas y geográficas, influyen tanto en la incidencia de FQ, como en la caracterización molecular de la misma (Mateus, 2010. Datos no publicados).

El resultado es que 39% de las mutaciones para FQ en Colombia no se conocen y se encuentran con frecuencia mutaciones raras al realizar análisis de secuenciamiento del gen en pacientes con signos clínicos leves y pruebas de electrolitos en sudor en zona gris o borderline (Keyeux, 2003; Massie y cols, 2000). Incluso en regiones europeas con alta incidencia de FQ, la heterogeneidad genética de las poblaciones han hecho difícil alcanzar una buena sensibilidad y especificidad del tamizaje neonatal y la recomendación es que los paneles de diagnóstico molecular sean desarrollados de manera específica para cada

población (Mayell y cols, 2009; Castellani y cols, 2008). Estos resultados son compatibles con lo observado al analizar la población de neonatos del presente estudio, por cuanto en el paciente identificado como portador para la mutación p.Phe508del, no se pudo identificar otra mutación a pesar de realizarse el análisis de las 3 mutaciones reportadas como más frecuentes en Colombia (Mateus, 2005).

En Estados Unidos, el estado de Massachusetts fue uno de los primeros en implementar Tamizaje Neonatal y ha reportado los beneficios nutricionales en el diagnóstico temprano de la enfermedad (Farrell y cols 1997, Farrell y cols 2005, Grosse y cols 2006, Lai y cols 2009). Igualmente, han reportado la disminución en la incidencia de la enfermedad. El mismo fenómeno ha sido observado en Canadá (Dupuis y cols, 2005), Italia y Francia (Scotet y cols 2008) donde la disminución en la incidencia de la enfermedad se debe al asesoramiento genético y a la decisiones de planificación familiar de las parejas en riesgo o con un hijo afectado diagnosticado tempranamente (Castellani y cols. 2008).

En Buenos Aires, Argentina, D`Alessandro y colaboradores, encontraron que el estado nutricional medido por medio del puntaje Z de peso para la edad mostraba diferencias estadísticamente significativas entre el grupo diagnosticado por Tamizaje Neonatal ( $-0.66 \pm 0.79$ ) y el grupo diagnosticado por síntomas clínicos ( $-2.33 \pm 1.32$ ,  $P < 0.001$ ). La edad de diagnóstico era  $0.16 \pm 0.13$  años para el grupo de Tamizaje y  $1.03 \pm 1.23$  años para el grupo de síntomas clínicos. La patología pulmonar es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en pacientes con FQ y uno de los que muestran menores diferencias

estadísticamente significativas al comparar pacientes diagnosticados por Tamizaje Neonatal contra pacientes diagnosticados clínicamente (D'Alessandro y cols. 2009), puesto que la detección temprana de la enfermedad conlleva adecuada monitorización de las manifestaciones clínicas de infecciones respiratorias, prevención de desnutrición, inicio precoz de terapias respiratorias y e inicio oportuno de tratamiento antibiótico cuando es requerido, disminuyendo el número de hospitalizaciones y la permanencia en las instituciones, lo que a su vez disminuye las probabilidad de adquirir infecciones nosocomiales (Farrel y cols. 2002; Rodríguez y cols. 2009).

La edad promedio de diagnóstico de la enfermedad en Colombia es de 40,2 meses  $\pm$  54.1 (Daza 2000, Mateus 2005). Si se compara con el caso de Argentina, en el cual el diagnóstico clínico se hace a los 1.03 $\pm$ 1.23 años, se puede entender la baja expectativa de vida observada en los pacientes afectados por la enfermedad en nuestro país. En los países industrializados se considera diagnóstico tardío si el paciente tiene más de 6 meses de edad, lo que demuestra claramente el gran retraso en la sospecha diagnóstica de esta entidad en Colombia, hecho que demuestra la importancia del diagnóstico neonatal.

Además de consecuencias en la calidad de vida y la sobrevida de los pacientes, se ha calculado en Estados Unidos, que el tratamiento básico de un afectado por la enfermedad es aproximadamente US\$10.000/año, sin contar con las múltiples hospitalizaciones y medicamentos, cifra que podría ascender a US\$40.000/año (Goodman y cols, 2002).

Sin embargo, el diagnóstico temprano de la enfermedad por medio de Tamizaje Neonatal debe ser evaluado según la población, pues existen diferentes estrategias, según la conformación genética de cada una.

Para el caso particular de Colombia, el Tamizaje Neonatal para hipotiroidismo se implementó con una incidencia estimada de 1:2.550 RNV y se utilizan muestras de sangre de cordón umbilical porque la estadía de las pacientes posterior al parto es corta y es difícil su localización después de abandonar la institución (Satzabal y cols 2001). Esta población sería la primera en reportar la utilidad de medición de TIR en sangre de cordón umbilical. Una de las ventajas es que la toma de la muestra está adecuadamente estandarizada, así como su manejo y almacenamiento. En este estudio se estableció como criterio de exclusión muestras con más de 15 días desde la toma hasta la recolección y procesamiento que se llevaba a cabo entre los 2 y 3 días siguientes para prevenir este fenómeno. Implementar el Tamizaje Neonatal para FQ en influiría notoriamente en la edad de diagnóstico, que en la actualidad se hace por clínica y es en promedio de 40,2 meses  $\pm$  54.1 (Daza 2000, Mateus 2005, Vasquez y cols. 2008).

Por lo tanto, existiendo de un programa de Tamizaje Neonatal en el que se obtienen muestras de sangre de cordón umbilical, y habiendo comprobado que esta muestra es útil para el análisis por medio de ELISA de los niveles de TIR en sangre, se puede considerar el protocolo TIR/DNA como el protocolo de elección para Tamizaje Neonatal para FQ en las regiones del país que tengan una frecuencia elevada del p.F508del (>50%). Sin embargo, su utilidad disminuye en otras regiones, en las cuales la marcada heterogeneidad de mutaciones

responsables de la enfermedad y el gran porcentaje de mutaciones desconocidas harían que el protocolo TIR/DNA p.Phe508del hacen que sea insuficiente para detectar a los pacientes en riesgo de desarrollar la enfermedad.

## 12. CONCLUSIONES

La alta incidencia demostrada en Bogotá de 1:8.267 RNV y esperada en el país (1:5.025 RNV), justifica la implementación de Tamizaje Neonatal para FQ en Colombia, puesto que el Sistema General de Seguridad Social en Salud se basa en los principios de equidad y solidaridad para todos los colombianos.

El protocolo TIR/TIR demuestra diversos inconvenientes en la recolección de la segunda muestra, por lo cual se deben implementar estrategias para corregir este punto, como mayor información en el momento de la toma de la muestra.

El protocolo TIR/DNA posee ventajas en la recolección y procesamiento de las muestras y se calcula que la sensibilidad y especificidad global serían más adecuadas, pero la heterogeneidad mutacional hace que sea inconveniente adoptar esta estrategia en algunas regiones del país.

El presente estudio permite concluir que la FQ es una entidad de alta prevalencia, pero subdiagnosticada en la población colombiana, con alta morbilidad y mortalidad y generadora de altos costos en la atención de salud de las personas afectadas, todo lo cual es susceptible de ser modificado mediante el diagnóstico temprano, lo cual justifica la implementación de Tamizaje Neonatal para FQ en Colombia.

En Bogotá el análisis de electrolitos en sudor se realiza con el método de Wescor Macroduct®. Sin embargo el método de Gibson y Cooke que garantiza la reproducibilidad y confiabilidad de la prueba no está disponible en nuestro país.

### **13. PERSPECTIVAS**

Es importante ampliar el estudio a las diferentes regiones del país, ya que estudios previos de este grupo, sugieren que las incidencias en otras regiones del país, podrían ser superiores a las de la población de Bogotá.

Un mayor y mejor conocimiento de las prevalencias mutacionales del gen, por regiones, permitirían recomendaciones población-específicas, que permitirían mayor costo-efectividad, menor sub-diagnóstico y cambios en la historia natural de la enfermedad en las personas afectadas.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

**Alonso MJ, Heine-Sunyer D, Calvo M, Rosell J, Giménez J, Ramos MD, y cols.** (2007) [Spectrum of mutations in the CFTR gene in Cystic fibrosis patients of Spanish ancestry.](#) *Ann Hum Genet*; 71: 194–201

**Alper Ö. M, Wong L-J, Young S, Pearl M, Graham S, Sherwin J, Nussbaum E, Nielson D, Platzker A, Daviess Z, Lieberthal A, Chin T, Shay G, Hardy K, Kharrazi M. (2004)** [Identification of Novel and Rare Mutations in California Hispanic and African American Cystic Fibrosis Patients.](#) *HUMAN MUTATION Mutation in Brief*, 24: 353-365

**Barak A, Dulitzki M, Efrati O, Augarten A, Szeinberg A, Reichert N. (2004)** [Pregnancies and outcome in women with cystic fibrosis.](#) *IMAJ*; 7: 95-98

**Bear, C. E., Li, C. H., Kartner, N., Bridges, R. J., Jensen, T. J., Ramjee Singh, M. y cols. (1992).** [Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator \(CFTR\).](#) *Cell*; 68(4), 809–818.

**Bobadilla J.L, Macek M, Fine J.P, Farrell P.M. (2002)** [Cystic Fibrosis: A Worldwide Analysis of CFTR Mutations. Correlation With Incidence Data and Application to Screening.](#) *Human Mutation*; 19: 575-606

**Boucher R.C. (2004)** [New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease.](#) *Eur Respir J.*; 23(1):146-158.

**Bowling F.G, Watson A.R.A, Rylatt D.B, Elliot J.E, Bunch R.J, Bundesen P.G.** (1987) [Monoclonal antibody-based trypsinogen enzyme immunoassay for screening of neonates for CF](#). *Lancet*, i: 826–827.

**Briel M, Greger R, Kunzelmann K.** (1998) [Cl<sup>-</sup> transport by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator \(CFTR\) contributes to the inhibition of epithelial Na<sup>+</sup> channels \(ENaCs\) in Xenopus oocytes co-expressing CFTR and ENaC](#). *Journal of Physiology*; 508.3: 825—836

**Cardoso H, Crispino B, Mimbacas A, Cardoso M.E.** (2004) [A low prevalence of cystic fibrosis in Uruguayans of mainly European descent](#). *Genet Mol Res*. 30;3(2):258-63.

**Carrillo J.C.**(1986) [Detección de Hipotiroidismo Congénito en Colombia](#). *Acta Pediátrica Colombiana*; IV:(1);31-37

**Castellani C, Bonizzato A, Cabrini G, Mastella G.** (1997) [Newborn screening strategy for cystic fibrosis: a field study in an area with high allelic heterogeneity](#). *Acta Paediatr*, 86: 497-502

**Castellani C, Picci L, Tamanini A.** (2009) [Association Between Carrier Screening and Incidence of Cystic Fibrosis](#) *JAMA*; 302:2573-2579

**Collazo T, Magarino C, Chavez R, Suardiaz B, Gispert S, Gomez M, Rojo M y cols.** (1995) [Frequency of delta-F508 mutation and XV2C/KM19 haplotypes in Cuban cystic fibrosis families](#). *Hum Hered*; 45: 55-57

**Comeau A.M, Accurso F.J, White T. B, Campbell P. W, Hoffman G, Parad R.B, Wilfond B. S, Rosenfeld M, Sontag M. K, Massie J, Farrel P. M, O’Sullivan B.P.** (2007) [Guidelines for Implementation of Cystic Fibrosis Newborn Screening Programs: Cystic Fibrosis Foundation Workshop Report](#) *PEDIATRICS*: 119: e495-e519

**Cyr D.M.** (2005) [Arrest of CFTR  \$\Delta\$ F508 folding](#). *Nature Structural & Molecular Biology*, 12: 2-3

**Chakraborty R, Srinivasan M.R, Raskint S.** (1993) [Estimation of the Incidence of a Rare Genetic Disease through a Two-Tier Mutation Survey](#). *Am.J. Hum. Genet*, 52:1129-1138

**Chambers L.A, Rollins B.M, Tarran R.** (2007) [Liquid Movement Across the Surface Epithelium of Large Airways](#). *Respir Physiol Neurobiol*; 159(3): 256–270.

**Crossley J.R, Elliott R.B, Smith P.A.** (1979) [Dried-blood spot screening for cystic fibrosis in the newborn](#). *Lancet*, 1:472–474

**D´Alessandro V, Renteria F, Fernandez A, Martinez, M.I, Segal E.** (2009) [Comparación del estado clínico-funcional en niños con Fibrosis Quística detectados por pesquisa neonatal o por síntomas clínicos](#). *Arch Argent Pediatr*, 107(5):430-435

**Da Paula A.C, Sousa M, Xu Zhe, Dawson E.S, Boyd A.C, Sheppard D.N, Amaral M.D.** (2010) [Folding and Rescue of a CFTR Trafficking Mutant Identified Using Human-Murine Chimeric Proteins](#). *The Journal of Biological Chemistry*; 285: 27033-27044

**Dankert-Roelse, Mérelle ME.** (2005) [Review of outcomes of neonatal screening for cystic fibrosis versus non-screening in Europe](#). *J Pediatr*, 147(3 Suppl):S15-20

**Davis P.B.** (2006) [Cystic Fibrosis Since 1938](#). *Am J Respir Crit Care Med*; 173: 475–482

**Dawson K.P, Frossard P.M.** (2000) [The Geographic Distribution of Cystic Fibrosis Mutations Gives Clues About Population Origins](#). *Eur J Pediatr*, 159: 496-499

**De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J, Sinaasappel M.** (2006) [Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms.](#) *Thorax*; 61: 627–635

**Dequeker E, Stuhmann M, Morris M, Casals T, Castellani C, Claustres M, Cuppens H, des Georges M, Ferec C, Macek M, Pignatti P.F, Scheffer H, Schwartz M, Witt M, Schwarz M y Girodon E.** (2009) [Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders – updated European recommendations.](#) *European Journal of Human Genetics*; 17:51–65

**de Gracia J, Mata F, Alvarez A, Casals T, Gatner S, Vendrell M, de la Rosa D, Guarner L, Hermosilla E.** (2005) [Genotype-phenotype correlation for pulmonary function in CF](#) *Thorax*; 60: 558–563

**Di Sant’Agnese P. A., Darling R. C, Perera G. A y Shea E.** (1953) [Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas.](#) *Pediatrics*; 12: 549–563

**Du K, Sharma M y Lukac G.L.** (2005) [The  \$\Delta F508\$  cystic fibrosis mutation impairs domain-domain interactions and arrests post-translational folding of CFTR.](#) *Nature Structural & Molecular Biology*; 12: 17-25

**Du M, Liu X, Welch E. M, Hirawat S, Peltz S. W, Bedwell D. M.** (2008) [PTC124 is an Orally Bioavailable Compound that Promotes Suppression of the Human CFTR-G542X Nonsense Allele in a CF Mouse Model.](#) *Proc Natl Acad Sci U S A*; 105(6): 2064-2069

**Durand J y Massey D.S.** (2010) [New World Orders: Continuities and Changes in Latin American Migration](#) *Ann Am Acad Pol Soc Sci*; 630(1): 20–52

**Farber S.** (1945) Some organic digestive disturbances in early life. *J.Mich State. Med. Soc.*; 44: 587–594

**Farrell P.M, Rosenstein B.J, White T.B y cols.** (2008) [Guidelines for Diagnosis of Cystic Fibrosis in Newborns Through Older Adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report](#). *J Pediatr*, 153(2): S4-S14

**Farrell P.M, Ksorok M.R, Rock M.J y cols.** (2002) [Lung disease in patients with cystic fibrosis diagnosed through neonatal screening or after delays associated with traditional methods](#). *Pediatr Pulmonol*; S24:319.

**Gadsby D.C, Vergani P, Csanády L.** (2006) [The ABC Protein Turned Chloride Channel Whose Failure Causes Cystic Fibrosis](#). *Nature*; 440: 477-483

**Gregg R.G, Wilfond B.S , Farrell P.M, Laxova A, Hassemer D, Mischler E.H.** (1993) [Application of DNA Analysis in a Population-screening Program for Neonatal Diagnosis of Cystic Fibrosis](#) (CF): Comparison of Screening Protocols. *Am. J. Hum. Genet*; 52: 616-626

**Gregg R.G, Simantel A, Farrell P.M, Kosciuk R, Kosorok M.R, Laxova A, Laessig R, Hoffman G, Hassemer D, Mischler E.H, Splaingard M.** (1997) [Newborn Screening for Cystic Fibrosis in Wisconsin: Comparison of Biochemical and Molecular Methods](#). *PEDIATRICS*; 99: 819-824

**Grody W.W, Cutting G.R, Klinger K.W, Richards C.S, Watson M.S, Desnick R.J.** (2001) [Laboratory standards and guidelines for population based cystic fibrosis carrier screening](#). *Genetics in Medicine*; 3: 149-154

**Hammond K.B, Abman S.H, Sokol R.J, Accurso F.J.** (1991) [Efficacy of statewide neonatal screening for cystic fibrosis by assay of trypsinogen concentrations](#). *N Engl J Med*.;325(11): 769-774

**Hale J.E, Parad R.B, Comeau A.M.** (2008) [Newborn Screening Showing Decreasing Incidence of Cystic Fibrosis](#). *NEJM*; 358: 973-974

**Huang P, Gilmore E, Kultgen P, Barnes P, Milgram S, Stutts M.J.** (2004) [Local Regulation of Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator and Epithelial Sodium Channel in Airway Epithelium](#). *Proc Am Thorac Soc*; 1: 33–37

**Hudson V.M.** (2001) [Rethinking cystic fibrosis pathology: the critical role of abnormal reduced glutathione \(GSH\) transport caused by CFTR mutation](#). *Free Radical Biology and Medicine*; 30: 1440-1461

**Jay L, Mateus H, Fonseca D, Restrepo C.M, Keyeux G.** (2006) [PCR-heterodúplex por agrupamiento: Implementación de un método de identificación de portadores de la mutación más común causal de fibrosis quística en Colombia](#). *Colombia Medica*; 37: 176-182

**Kammesheidt A, Kharrazi M, Graham S, Young S, Pearl M, Dunlop C, Keiles S.** (2006) [Comprehensive genetic analysis of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator From Dried Blood Specimens - Implications For Newborn Screening](#). *Genetics In Medicine*; 8: 557-562

**Kerem B-S, Rommens J.M, Buchanan J.A, Markiewicz D, Cox T.K, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui L-C.** (1989) [Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Genetic Analysis](#). *Science*; 245: 1073-1079

**Keyeux G, Rodas C, Gelvez N, Carter D.** (2002) [Possible migration routes into South America deduced from mitochondrial DNA studies in Colombian Amerindian populations](#). *Hum Biol.*; 74(2):211-33.

**Keyeux G, Rodas C, Bienvenu T, Garavito P, Vidaud D, Sanchez D, Kaplan J-C, Aristizabal G.** (2003) [CFTR Mutations in Patients from Colombia: Implications for Local and Regional Molecular Diagnosis Programs](#). *Human Mutation*; 22: 259-268

**Kleven D.T, McCudden C.R, Willis M.S** (2008) [Cystic fibrosis: newborn screening in America](#). *Medical Laboratory Observer*; 40: 16-27

**Kloosterboer M, Hoffman G, Rock M, Gershan W, Laxova A, Li Z, Farrell P.M.** (2009) [Clarification of Laboratory and Clinical Variables That Influence Cystic Fibrosis Newborn Screening With Initial Analysis of Immunoreactive Trypsinogen.](#) *Pediatrics*; 123 (2): e338 -e346

**Kreindler J.L.** (2010) [Cystic fibrosis: Exploiting its Genetic Basis in the Hunt for New Therapies.](#) *Pharmacology & Therapeutics*; 125: 219–229

**Landsteiner K.** (1905) [Darmverschluss durch eingedicktes Meconium. Pankreatitis.](#) *Centr. Allg. Pathol.*;16: 903–907

**Layer P, Keller J, Lankisch P.G.** (2001) [Pancreatic enzyme replacement therapy.](#) *Curr Gastroenterol Rep.*;3(2):101-108.

**Lesser J.** (2006) [La Negociación del Concepto de Nación en un Brasil Étnico: Los Inmigrantes Sirio-Libaneses y Nikkei y la Reestructuración de la Identidad Nacional.](#) In: [Wehr, Ingrid, editor.](#) *Un Continente en Movimiento: Migraciones en América Latina.* Madrid, Spain: Editorial Iberoamericana; p. 19-38.

**Li L, Zhou Y, Bell C.J, Earley M.C, Hannon W.H, Mei J.V** (2006) [Development and Characterization of Dried Blood Spot Materials for the Measurement of Immunoreactive Trypsinogen.](#) *J Med Screen*; 13:79-84

**Lima Leão L, Burle de Aguiar M.J.** (2008) [Newborn screening: what pediatricians should know.](#) *Jornal de Pediatria*; 84 (4 Suppl): S80-90

**Liou T.G, Rubenstein R.C.** (2009) [Carrier Screening, Incidence of Cystic Fibrosis, and Difficult Decisions.](#) *JAMA*; 302:2595-2596

**Löhr J.M, Hummel F.M, Pirilis K.T, y cols.** (2009) [Properties of different pancreatin preparations used in pancreatic exocrine insufficiency.](#) *Eur J Gastroenterol Hepatol*; 21(9): 1024-1031

**Maclea JE, Solomon M, Corey M, Selvadurai H** (2011) [Cystic fibrosis newborn screening does not delay the identification of cystic fibrosis in children with negative results.](#) *J Cyst Fibros.*;10(5):333-337

**Malcolm S.** (1990) [Recent Advances in the Molecular Analysis of Inherited Disease.](#) *Eur. J. Biochem*; 194, 317-321

**Massie R. J, Wilcken B, Van Asperen P, Dorney S, Gruca M, Wiley V, Gaskin K.** (2000) [Pancreatic function and extended mutation analysis in DeltaF508 heterozygous infants with an elevated immunoreactive trypsinogen but normal sweat electrolyte levels.](#) *J Pediatr.*;137(2):214-220

**Massie J, Curnow L, Tzanakos N, Francis I, Robertson C.F.** (2006) [Markedly elevated neonatal immunoreactive trypsinogen levels in the absence of cystic fibrosis gene mutations is not an indication for further testing.](#) *Arch Dis Child.*;91(3):222-225

**Mateus, H.E** (2005) Identificación de mutaciones y correlación genotipo-fenotipo en pacientes colombianos afectados por Fibrosis Quística. Tesis de Grado Maestría Genética Humana. Universidad Nacional de Colombia.

**Mateus, H.E, Fonseca D.J, Sanchez L.S, Peñaloza I.F, Forero D.V, Perdomo P.A, Quiasua y cols.** (2007) [Frecuencia de la mutación F508del en estudiantes de la Facultad de Medicina de la Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.](#) *Colombia Médica.* 38: 352-356

**Mayell, S. J, Munck, A, Craig J. V, Sermet, I, Brownlee, K. G, Schwarz, M. J, Castellani, C, Southern, K. W; European Cystic Fibrosis Society Neonatal Screening Working Group** (2009) [A European consensus for the evaluation and management of infants with an equivocal diagnosis following newborn screening for cystic fibrosis.](#) *J Cyst Fibros*; 8(1):71-78

**Mishra A, Greaves R, Smith K, Carlin J.B, Wootton A, Stirling R, Massie J.** (2008) [Diagnosis of cystic fibrosis by sweat testing: age-specific reference intervals.](#) *J Pediatr.*;153 (6):758-763

**Mogayzel P.J, Flume P.A.** (2009) [Update in Cystic Fibrosis 2009.](#) *Am J Respir Crit Care Med*; 181: 539-544

**Monestrol I, Klint A, Sparen P, Hjelte L.** (2011) [Age at diagnosis and disease progression of cystic fibrosis in an area without newborn screening.](#) *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 25(3), 298–305

**Montgomery J, Wittwer C. T, Kent J. O, Zhou L.** (2007) [Scanning the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene using high-resolution DNA melting analysis.](#) *Clin Chem.*;53(11): 1891-1898

**Moskowitz S, Chmiel J, Stern D, Cheng E, Cutting G.** (2008) [CFTR-Related Disorders.](#) *GeneReviews/NCBI/NIH/UW*

**[National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement on genetic testing for cystic fibrosis.](#)** (1999) Genetic testing for cystic fibrosis. *Arch Intern Med.*;159 (14):1529-39.

**Ntimbane T, Comte B, Mailhot G, Berthiaume, Poitout V, Prentki M, Rabasa-Lhoret R, Levy E.** (2008) [Cystic Fibrosis-Related Diabetes: From CFTR Dysfunction to Oxidative Stress.](#) *Clin Biochem Rev.*; 30: 153-169.

**Oller A.M, Ramos M.D, Jimenez J, Ghio A, Melano M, Rezzonico C.A, Marques I, Pereyro S, Casals T, Dodelson R.** (2006) [Mutational spectrum of cystic fibrosis patients from Córdoba province and its zone of influence: Implications of molecular diagnosis in Argentina.](#) *Molecular Genetics and Metabolism*; 87: 370–375

**Orozco I, Velasquez R, Zielenski J, Tsui L.C, Chavez M, Lezana J.L y cols.** (2000) [Spectrum of CFTR mutations in Mexican cystic fibrosis patients:](#)

[identification of five novel mutations \(W1098C, 849delT, P750L, 4160insGGGG and 297-1G>A\)](#) *Hum Genet*; 106: 360-365

O`Sullivan B.P, Freedman S.D. (2009) [Cystic fibrosis](#). *Lancet*; 373: 1891–904

Ott C.J, Blackledge N.P, Leir S-H, Harris A. (2009) [Novel regulatory mechanisms for the CFTR gene](#). *Biochemical Basis of Respiratory Disease* ; 37: 843–848

Pérez M, Luna M, Pivetta O, Keyeux G. (2006) [CFTR gene analysis in Latin American CF patients: Heterogeneous Origin and Distribution of Mutations Across the Continent](#). *Journal of Cystic Fibrosis*; 6: 194-208.

Pitt J. (2010) [Newborn Screening](#). *Clin Biochem Rev*; 31: 57-68

Price J. F. (2006) [Newborn Screening for Cystic Fibrosis: Do we Need a Second IRT?](#) *Arch Dis Child.*; 91(3): 209-210.

Quinton P.M. (1999) [Physiological Basis of Cystic Fibrosis: A Historical Perspective](#). *Physiological Reviews*; 79: S3-S14

Restrepo C.M, Pineda L, Rojas-Martínez A, Gutiérrez C.A, Morales A, Gomez Y, Villalobos M.C, Borjas L, Delgado W, Myers A, y Barrera-Saldana H.A. (2000) [CFTR Mutations in Three Latin American Countries](#). *American Journal of Medical Genetics*; 91:277–279.

Raskin S, Pereira-Ferrari L, Reis F. C, Abreu F, Marostica P, Rozov T, Cardieri J, Ludwig N, Valentin L y cols. (2008) [Incidence of cystic fibrosis in five different states of Brazil as determined by screening of p.F508del, mutation at the CFTR gene in newborns and patients](#). *Journal of Cystic Fibrosis*; 7: 15–22

Raskin S, Phillips J.A, Krishnamani M.R, Vnencak-Jones C, Parker R.A, Rozov T, y cols (1992) [Cystic fibrosis genotyping by direct PCR analysis of Guthrie blood Sports](#). *Am J Med Genet* 1992; 46:665-669

Riordan J.R, Rommens J.M, Kerem Bat-Sheva, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou J.L, Drumm M.L, Iannuzzi M.C, Collins F.S, Tsui L.C (1989) [Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complimentary DNA](#). *Science*; 245: 1066-1072

Rodas C, Gelvez N, Keyeux G. (2003) [Mitochondrial DNA studies show asymmetrical Amerindian admixture in Afro-Colombian and Mestizo populations](#). *Hum Biol.*; 75 (1):13-30.

Rodrigues R, Gabetta C.S, Pedro K.P, Valdetaro F, Fernandez M, Magalães P, Januario J, Maciel L. (2008) [Cystic Fibrosis and Neonatal Screening](#). *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro*; 24 Sup 4: S475-S484

Rodríguez Z, Veloza L, Baena J, Ramos E, Gómez C, Gómez D. (2009) [Parámetros Hematológicos de Pacientes con Fibrosis Quística de la Costa Caribe Colombiana: Análisis y Asociación con Aislamiento de Pseudomonas aeruginosa](#). *Ciencias Biomédicas*; 7: 92-102

Rock M. J, Hoffman G, Laessig R. H, Kopish G. J, Litsheim T. J, Farrell P. M. (2005) [Newborn screening for cystic fibrosis in Wisconsin: nine-year experience with routine trypsinogen/DNA testing](#). *J Pediatr.*; 147(3 Suppl): S73-77

Rommens J.M, Iannuzzi M.C, Kerem B-S, Drumm M.L, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole J.L, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan J.R, Tsui L-C, Collins, F.S. (1989) [Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Chromosome Walking and Jumping](#). *Science*; 245: 1059-1065

Rottner M, Freyssinet J-M, Martinez M.C. (2009) [Mechanisms of the noxious inflammatory cycle in cystic fibrosis](#). *Respiratory Research*; 10: 23

Ross L. F. (2008) [Newborn Screening for Cystic Fibrosis: a Lesson in Public Health Disparities](#). *J Pediatr.*; 153(3): 308-313

**Rowe S. M, Miller S, Sorscher E.J.** (2005) [Cystic Fibrosis](#). *N Engl J Med*; 352: 1992-2001

**Rowntree R. K and Harris A.** (2003) [The Phenotypic Consequences of CFTR Mutations](#). *Annals of Human Genetics*; 67: 471–485

**Ryley H. C, Robinson P. G, Yamashiro Y, Bradley D. M.** (1981) [Assay of serum immunoreactive trypsin in dried blood spots and the early detection of cystic fibrosis](#). *J Clin Pathol.*; 34(8): 906-910

**Sánchez I, Pérez M.A, Boza M.L, Lezana V., Vila M.A, Repetto G y cols.** (2001) [Consenso Nacional de Fibrosis Quística](#). *Rev Chil Pediatr.*; 22(4): 356-380

**Sands D, Zybert K, Nowakowska A.** (2010) [Cystic fibrosis newborn screening enables diagnosis of elder siblings of recalled infants--additional benefit](#). *Folia Histochemica et Cytobiologica*; 48 (1): 163-165

**Satizabal J.M, Erazo M.L, Solorzano M.C, Herrera E, Velez O, Lopez P.** (2001) [Tamizaje Neonatal de Hipotiroidismo Congénito en Colombia: ¿Qué muestra utilizar?](#) *Acta Biológica Colombiana*; 6(2): 71-73

**Schwiebert E.M, Benos D.J, Egan M.E, Stutts M.J, Guggino W.B** (1999) [CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel](#). *Physiol Rev.*;79(1 Suppl):S145-66

**Sikkens E.C.M, Cahen D.L, Kuipers E,J, Bruno M.J.** (2010) [Pancreatic enzyme replacement therapy in chronic pancreatitis](#). *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*; 24: 337-347

**Sims E.J., Clark A, McCormick J, Mehta G, Connett G, Mehta A.** (2007) [Cystic Fibrosis Diagnosed After 2 Months of Age Leads to Worse Outcomes and Requires More Therapy](#). *Pediatrics*; 119 (1); 19 -28

**Sontag M.K, Hammond K.B, Zielenski J, Wagener J.S, Accurso F.J.** (2005) [Two-Tiered Immunoreactive Trypsinogen-Based Newborn Screening For Cystic Fibrosis In Colorado: Screening Efficacy And Diagnostic Outcomes.](#) *J Pediatr*; 147:S83-S88

**Southern K.W y Peckham D.** (2004) [Establishing a diagnosis of Cystic Fibrosis.](#) *Chronic Respiratory Disease*; 1: 205–210

**Southern K.W, Munck A, Pollitt R, Travert G, Zanolla L, Dankert-Roelse J, et al.** (2007) [A survey of newborn screening for cystic fibrosis in Europe.](#) *J Cyst Fibros*; 6: 57–65

**Southern K.W, Mérelle M.M, Dankert-Roelse J.E, Nagelkerke A.D.** (2009) [Newborn screening for cystic fibrosis.](#) *Cochrane Database Syst Rev*;(1):CD001402

**Soultan Z. N, Foster M. M, Newman N. B, Anbar R. D.** (2008) [Sweat Chloride Testing in Infants Identified as Heterozygote Carriers by Newborn Screening.](#) *J Pediatr.* ; 153(6): 857-859

**Stephan U, Busch E.W, Kollberg H, Hellsing K.** (1975) [Cystic fibrosis detection by means of a test strip.](#) *Pediatrics*; 55: 35–38

**Sugarman E.A, Rohlfs E.M, Silverman L.M, Allitto B.A.** (2004) [CFTR mutation distribution among U.S. Hispanic and African American individuals: Evaluation in cystic fibrosis patient and carrier screening populations.](#) *Genetics in Medicine*; 6: 392-399

**Turnbull E.L, Rosser M, Cyr D.M.** (2007) [The role of the UPS in cystic fibrosis.](#) *BMC Biochemistry*; 8: S1-S11

**Tsui L.-C., Buchwald M, Barker D, Braman J.C, Knowlton R, Schumm J.W, Eiberg H, Mohr J, Kennedy D, Plavsic N.** (1985) [Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker.](#) *Science*; 230: 1054–1057

**Vásquez C, Aristizábal R, Daza W.** (2008) [Fibrosis Quística en Colombia.](#) [www.neumologia-pediatrica.cl](http://www.neumologia-pediatrica.cl).

**Waqlkowiak J, Sands D, Nowakowska A, Piotrowski R, Zybert Katarzyna, Herzig K-H Milanowski A.** (2005) [Early Decline of Pancreatic Function in Cystic Fibrosis Patients with Class 1 or 2 CFTR Mutations.](#) *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*; 40:199–201

**Wang W, Wu J, Bernard K, Li G, Wang G, Bevensee M. O, Kirk K. L.** (2010) [ATP-independent CFTR channel gating and allosteric modulation by phosphorylation.](#) *PNAS*; 107: 3888-3893

**Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, Driscoll DA, Klinger K, Mennuti M, y cols.** (2004) [Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel.](#) *Genet Med* 2004; 6: 387–391

**Whitcomb D.C.** (2010) [Genetic Aspects of Pancreatitis.](#) *Annual Reviews*; 61: 413-424

**Wilcken B.** (2007) [Newborn screening for cystic fibrosis: techniques and strategies.](#) *J Inherit Metab Dis*; 30(4): 537-543

**Xu W.M, Chen J., Chen H., Diao R.Y, Fok K.L, Dong J.D y cols** (2011) [Defective CFTR-Dependent CREB Activation Results in Impaired Spermatogenesis and Azoospermia.](#) *PLoS ONE* 6(5): e19120. doi:10.1371/journal.pone.0019120

**Zielenski J.** (2000) [Genotype and Phenotype in Cystic Fibrosis.](#) *Respiration*; 67:117–133

## 12. ANEXOS

### ANEXO 1

- 1) Se depositaron discos de 3 mm de diámetro en los pozos, ponchados con la ayuda de ponchador automático o manual, según la disponibilidad del mismo. Se evitó el extremo de la muestra.
- 2) Se depositaron además discos del mismo diámetro de cada calibrador propio del kit a utilizar.
- 3) Se pipeteo 100  $\mu$ l de Reactivo Anticuerpo Neonatal TIR en cada pozo.
- 4) Se cubrieron las placas con la tapa correspondiente y se incubaron por 10 minutos en placa agitadora a temperatura 20-25 °C.

- 5) Se incubaron las placas por 24 horas sin movimiento a temperatura de 20-25°C.
- 6) Al día siguiente se incubaron por 10 minutos en placa agitadora a la misma temperatura (20-25 °C).
- 7) Después de la incubación se removieron los discos.
- 8) Se lavaron los pozos cuatro veces con 250 µl de solución de lavado. Después del último lavado se invirtieron las placas y se procedió a darles golpes secos sobre papel absorbente para quitar solución de lavado restante y se verificó que no quedaran burbujas en los pozos.
- 9) Se pipetearon 100 µl de solución de reactivo de amplificación neonatal TIR en cada pozo.
- 10) Se cubrieron las placas con tapa y se incubaron por 10 minutos en placa agitadora a 20-25 °C.
- 11) Posteriormente se repitió el ciclo de 4 lavados con solución de lavado.
- 12) Se pipetearon 100 µl de la solución de sustrato en cada pozo, teniendo en cuenta que se debían contabilizar 10 minutos desde el momento en el que se adiciona el sustrato dentro del primer pozo.
- 13) Se cubren las placas y se incuban a 20-25°C.
- 14) Una vez cumplido el tiempo para el primer pozo, se pipetea 50 µl de solución de parada estabilizadora con la misma secuencia de tiempo con la que se adicionó el sustrato.
- 15) Se llevaron a lectura a 450 nm dentro de 30 minutos posterior a la terminación de la reacción.

## **ANEXO 2**

### **UNIVERSIDAD DEL ROSARIO**

#### **TAMIZAJE NEONATAL PARA FIBROSIS QUISTICA**

Fecha de reporte: XX / XX / 2009

Hijo(a) de: XX XXX

Fecha nacimiento: XX / XX / 09

Sexo: F \_\_\_ M \_\_\_

Fecha de toma de segunda muestra: XX / XX / 09

Valor cordón (1ª prueba): \_\_\_\_\_ Valor referencia > 60 µg/l: positivo  
< 60 µg/l: negativo

Valor talón (2º prueba): \_\_\_\_\_ Valor referencia > 50 µg/l: positivo  
< 50 µg/l: negativo

FIRMA: \_\_\_\_\_

### ANEXO 3

El análisis de mutación por medio de corte con enzimas de restricción para las 3 mutaciones restantes previa amplificación por PCR según condiciones previamente establecidas, p.G542X con la enzima BSTNI, c.1811+1,6kbA>G con la enzima FOKI y c.621+1KbG>T con la enzima MSEI incubándolas en calor seco por 2 hrs a 37°C. Esta técnica permite la identificación de la mutación al obtenerse bandas de diferentes pesos moleculares ya establecidos según el sitio donde se localiza la mutación y bandas íntegras cuando tal mutación no está presente.

