

# *Estudios moleculares en pacientes colombianos con fibrosis quística*

Genoveva Keyeux, Dora Sánchez, Pilar Garavito, Iván Stand, Clemencia Rodas, Thierry Bienvenu, Gustavo Aristizábal, Ignacio Zarante, Juan Carlos Prieto, Fabio Anaya, Ricardo Aristizábal, Oscar Barón, Antonio Bermúdez, María Luisa Bravo, Luz Libia Cala, Alvaro Correa, Elida Dueñas, José Miguel Escamilla, María Mercedes Naranjo, William Parra, Silvia Plaza, María Eugenia Ramírez, Diego Saa, Alvaro Sánchez, Sandra Jimena Silva, Santiago Ucrós, Jean-Claude Kaplan, Jaime Eduardo Bernal

La fibrosis quística (FQ), la enfermedad autosómica recesiva más frecuente en poblaciones caucásicas, tiene una incidencia promedio de 1/2.500 recién nacidos. La frecuencia de portadores de la principal mutación, DF508, es de 1/25 con variaciones mundiales importantes, al igual que en la incidencia de las demás mutaciones, de las cuales se han informado más de 600 hasta el momento. En Latinoamérica ha sido poco estudiada hasta el momento, teniéndose datos acerca de su incidencia y de la frecuencia de la mutación DF508 en pocos países. Cuba es el país con mayor incidencia (1/3.862), y Argentina el de mayor frecuencia de la mutación DF508 (63%). En Colombia hasta el

momento no se conocen la incidencia real de la enfermedad ni sus características moleculares; de ahí la importancia de iniciar estudios moleculares en pacientes en quienes, a pesar de su sintomatología y exámenes paraclínicos, no se llegó a un diagnóstico concluyente de fibrosis quística. En este primer informe sobre pacientes colombianos identificamos la mutación DF508 en 92 pacientes procedentes de seis regiones del país, así como los haplotipos asociados con el gen CFTR. Los resultados muestran una frecuencia de DF508 de 48% nacional, con variaciones regionales que van de 25% en Bolívar a más de 60% en Caldas y Santander. La variabilidad regional tanto de los haplotipos como de la frecuencia de DF508 es probablemente el reflejo de la heterogeneidad étnica de nuestro país. La frecuencia de portadores sanos de la mutación DF508 observada es de 1:65, con una frecuencia génica de 0,0076.

## Introducción

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad autosómica recesiva más frecuente en la población caucásica, con una incidencia promedio de 1/2.500 recién nacidos. Las frecuencias de la enfermedad y de la mutación DF508 varían considerablemente en las diferentes poblaciones (1). En caucásicos europeos se presenta en uno de cada 1.700 individuos en el norte de Irlanda, 1/7.700 en Suecia, con frecuencia de portadores de DF508 de 1/20 y 1/44 respectivamente. Existe, además,

Dres. Genoveva Keyeux, Dora Sánchez, Pilar Garavito, Clemencia Rodas, Ignacio Zarante, Juan Carlos Prieto, Silvia Plaza, Jaime Eduardo Bernal: Instituto de Genética Humana, Facultad de Medicina, Universidad Javeriana, Santa Fe de Bogotá; Dres. Iván Stand, Gustavo Aristizábal, Oscar Barón: Escuela Colombiana de Medicina, Santa Fe de Bogotá; Dres. Fabio Anaya, José Miguel Escamilla: Universidad de Cartagena; Dr. Antonio Bermúdez: Instituto Nacional de Salud, Santa Fe de Bogotá; Dres. María Luisa Bravo, William Parra, Departamento de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín; Dres. Luz Libia Cala, María Eugenia Ramírez: Bucaramanga; Dres. Alvaro Correa, Sandra Jimena Silva: Manizales; Dres. María Mercedes Naranjo, Diego Saa: Hospital Infantil Club Noel, Cali; Dres. Elida Dueñas, Santiago Ucrós: Fundación Santa Fe de Bogotá; Dres. Thierry Bienvenu, Jean-Claude Kaplan: Institut Cochin de Génétique Moléculaire, INSERM U129, París, Francia; Dr. Ricardo Aristizábal: Hospital Santa Clara, Santa Fe de Bogotá; Dr. Alvaro Sánchez: Cali.

un gradiente de distribución geográfica de la frecuencia de esta mutación que va de 26% de los cromosomas de fibrosis quística en Turquía hasta 88% en Dinamarca (2).

La FQ es mucho menos frecuente en negros norteamericanos, 1/17.000 (3), y muy rara en orientales y africanos, probablemente menos de 1/40.000 y 1/100.000, respectivamente (1,4). Más aún, la variación en las diferentes poblaciones no es sólo en la frecuencia de la mutación DF508 sino también en la de las otras mutaciones conocidas.

Los estudios realizados hasta el momento en Latinoamérica muestran que en México la incidencia de la enfermedad es de 1/8.000 o 9.000 recién nacidos (5) y en Cuba de 1/3.862 (6), pero se desconoce la incidencia de ésta en la mayoría de los países de América Latina, y existen reportes de estudios de la mutación DF508 en sólo cinco países de esta parte del continente (6-10). El gen responsable de la FQ se identificó y clonó en 1989; se encuentra localizado en el cromosoma siete en la banda 7q31.2 y el gen codifica para una proteína de membrana denominada CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) (11). Más de 600 mutaciones han sido identificadas hasta el momento (12, 13), pero aproximadamente 70% de los cromosomas con FQ son portadores de la mutación DF508, una delección de 3pb en el exón 10 del gen que causa la pérdida de un residuo de fenilalanina en la posición 508 de la proteína (11, 14, 15).

El gen CFTR se halla ligado a varios marcadores extragénicos que fueron descubiertos simultáneamente con él. De éstos, dos

(KM 19 y XV2c) resultaron ser particularmente útiles en estudios poblacionales, ya que son polimórficos y definen cuatro haplotipos posibles. Estos haplotipos (A, B, C y D) se hallan en fuerte desequilibrio de ligamiento con mutaciones particulares en las poblaciones estudiadas (16).

No hay información acerca de la incidencia real y de las características moleculares de la FQ en Colombia. En este informe presentamos los resultados del estudio piloto, el segundo en tamaño en América Latina, llevado a cabo en una población colombiana de pacientes con diagnóstico clínico de FQ, con el fin de determinar la frecuencia de la mutación DF508. Fueron analizados 92 pacientes procedentes de varias regiones del país: Santa Fe de Bogotá, Antioquia, Bolívar, Caldas, Santander, Valle y otras regiones. En paralelo se estudiaron 130 controles sanos, sin antecedentes familiares de FQ ni de enfermedad pulmonar crónica.

En el mismo estudio fueron determinados los haplotipos asociados tanto con la mutación DF508, como con las otras mutaciones en los pacientes negativos para DF508 (heterocigotos DF508/No-DF508 o No-DF508/No-DF508), con el fin de orientar el posterior análisis mutacional en los cromosomas negativos para la mutación DF508.

Además del diagnóstico molecular de los pacientes, se ofreció asesoría genética a las familias que participaron en el estudio, sobre todo en la identificación de los familiares portadores de la mutación (hermanos y hermanas sanos) quienes deberán tener en cuenta este factor de ries-

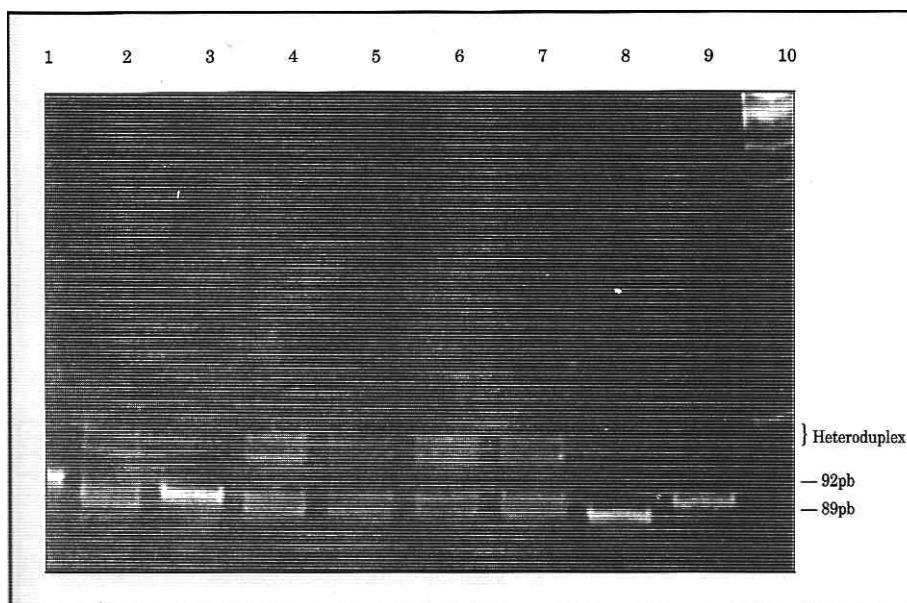
go en el momento de decidir su futuro reproductivo.

### Material y métodos

Se analizaron 92 pacientes provenientes de diferentes departamentos del país, así: 13 de Antioquia, 30 de Santa Fe de Bogotá, seis de Bolívar, siete de Caldas, tres de Santander, 11 del Valle y seis de regiones varias. El diagnóstico de FQ fue hecho por neumólogos, neumólogos-pediatras, gastroenterólogos-pediatras y pediatras. Se basó tanto en aspectos clínicos como en valores de electrolitos en sudor (Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>) superiores a 70 meq/L. Los datos clínicos incluyeron edad, peso y talla expresados como percentiles, edad de aparición de síntomas y edad de diagnóstico. La insuficiencia pancreática se determinó según el requerimiento enzimático. Además se valoró a los pacientes mediante el puntaje clínico de Shwachman y radiológico de Brasfield (17, 18). Se incluyeron en el estudio los familiares en primer grado (padres y hermanos) de los pacientes.

Además, se analizó un grupo de 130 individuos de 20 a 43 años de edad, residentes en Santa Fe de Bogotá, sin historia familiar ni personal de FQ y sin enfermedad respiratoria crónica. Se obtuvieron muestras de sangre venosa de todos los individuos, y el DNA fue extraído de los leucocitos por el método de fenol-cloroformo (19), y en algunos casos mediante la técnica de DTAB-CTAB (20).

La mutación DF508 y los haplotipos fueron analizados mediante la técnica de amplificación enzimática o PCR (Polimerase Chain Reaction) (21, 22). Para la amplificación de la mu-



**Figura 1.** Separación electroforética de los productos de amplificación del exón 10 entre los X-primers DFA y DFB. Electroforesis en PAGE de los productos de amplificación del exón 10 en dos familias. Los productos fueron sometidos previamente a la formación de heteroduplex, visibles como dos bandas de movilidad retardada en los individuos heterocigotos (carriles 2, 4-7). El carril 7 muestra la formación artificial de heteroduplex del DNA del paciente (carril 8) con un DNA control normal. Controles normales (carril 1, 9). Familia 1, carriles: 2-padre, 3-madre, 4-paciente (heterocigoto DF508/No-DF508). Familia 2, carriles: 5-padre, 6-madre, 7-heteroduplex paciente/normal, 8-paciente (homocigoto DF508). Marcador de peso molecular (carril 10).

Mutación	N=152	%
DF508	73	48,0
Otras (No-DF508)	79	51,9

**Tabla 1.** Frecuencia de la mutación DF508 en la población total de pacientes con fibrosis quística (23, 24).

tación DF508, se utilizaron los oligonucleótidos DFA y DFB según el método descrito previamente (T. Bienvenu, comunicación personal) y modificaciones de nuestro laboratorio.

Las muestras amplificadas se colocaron a 94°C para la formación de heteroduplex. La electroforesis se realizó en gel denaturante de poliacrilamida y los productos fueron visualizados en un transiluminador UV. La homocigosidad para la mutación DF508 en los pacientes fue confirmada por la formación de

heteroduplex en presencia de DNA control normal amplificado, en las mismas condiciones descritas arriba.

Las comparaciones estadísticas se realizaron con la prueba de  $\chi^2$  utilizando la corrección de Yates para muestras pequeñas.

### Resultados

#### Frecuencia de la mutación DF508 en Colombia

El fragmento del exón 10 amplificado correspondiente al alelo normal tiene un tamaño de 92 pares de bases (pb), y el del alelo mutante DF508 con una delección de tres pares de bases de 89 pb. Por lo tanto, los individuos homocigotos normales y los pacientes con FQ que tienen mutaciones diferentes a DF508, presentan únicamente un fragmento de 92 pb (Figura 1). De la misma manera, los individuos

homocigotos para la delección DF508 presentan un solo fragmento de 89 pb, mientras que los pacientes con FQ heterocigotos que tienen en un cromosoma la mutación DF508 y en el otro una mutación diferente, no localizada en la porción del exón 10 que se amplifica, presentan bandas de 92 y 89 pb, correspondientes a los homoduplex, y un heteroduplex que migra retardado, producto de una reasociación ilegítima entre los dos fragmentos. Igualmente, los individuos sanos portadores de una mutación DF508 en el estado heterocigoto en uno solo de los dos cromosomas siete presentan dos bandas de 92pb y 89pb, correspondientes al gen normal y al mutante (DF508), respectivamente, y las bandas de heteroduplex.

En el grupo control sano se encontraron dos individuos, de 130 analizados, portadores de la mutación DF508 en el estado heterocigoto, que representan una frecuencia de portadores de 1:65 y una frecuencia génica de 0,0076 para la mutación DF508 en la población general.

De los 92 pacientes con FQ analizados, se descartaron 16 en el cálculo de frecuencia de la mutación DF508 por ser parientes en primer grado de un individuo afectado o porque la ausencia de la mutación DF508 coincidió con un diagnóstico dudoso de FQ. La frecuencia de la mutación DF508 en el grupo de pacientes fue de 48% en todos los cromosomas analizados (73 de 152) (13, 14) (Tabla 1), con variaciones en los diferentes departamentos y regiones estudiados (Antioquia, Santa Fe de Bogotá, Bolívar, Caldas, Santander, Valle y otros), con el valor más bajo

(25%) en el Departamento de Bolívar y el más alto (66,6%) en Santander (Tablas 2 y 3). Se consideró como otros a un grupo de pacientes provenientes de varios departamentos, y de los cuales no había sino un individuo afectado.

Los haplotipos de los controles y pacientes fueron determinados por el análisis de dos marcadores ligados XV2c/TaqI y KM 19/PstI (16). La frecuencia del haplotipo B asociado con la mutación DF508 en los pacientes con FQ es de 83,7%, mientras que este mismo haplotipo se halla asociado con las otras mutaciones en 37,2% de todos nuestros pacientes, con diferencias marcadas entre los departamentos estudiados. Comparativamente, la frecuencia del haplotipo B observada en los cromosomas normales de los controles es de 8,7% (25, en preparación).

#### Correlación clínico-molecular

Algunos estudios en otros países señalan una correlación genotipo-fenotipo observada en pacientes homocigotos DF508, caracterizada por una mayor severidad de la enfermedad, presentación temprana y alteración de las funciones pulmonar y pancreática (26).

La correlación entre la clínica y el genotipo DF508 se pudo evaluar solamente en los pacientes remitidos de la Fundación de Fibrosis Quística de Santa Fe de Bogotá, de los cuales teníamos la historia clínica completa, lo que reduce este análisis a 35 pacientes (27). Al correlacionarlos tres posibles genotipos (DF508/DF508, DF508/No-DF508 y No-DF508/No-DF508) con todas las variables clínicas características de la enfermedad, no se encon-

Departamento	N = 152	% Cromosomas DF508	% Cromosomas No-DF508
Antioquia	26	57,7	42,3
Santa Fe de Bogotá	60	45,0	55,0
Bolívar	12	25,0	75,0
Caldas	14	64,3	35,7
Santander	6	66,6	33,3
Valle	22	45,5	54,5
Otros	12	41,7	58,3

Tabla 2. Frecuencia de la mutación DF508 por Departamentos en pacientes con fibrosis quística (23, 24).

Departamento	Regiones	N=152	% Cromosomas DF508 (N)	% Cromosomas No-DF508 (N)
Antioquia, Caldas, Quindío	Centro-Occidente	42	61,9 (26)	38,1 (16)
Santa Fe de Bogotá, Santander, Boyacá	Centro-Oriente	68	45,6 (31)	54,4 (37)
Bolívar, Atlántico, Magdalena	Costa Norte	16	31,2 (5)	68,8 (16)
Valle, Huila, Nariño	Sur-Occidente	26	42,3 (11)	57,7 (15)

Tabla 3. Frecuencia de la mutación DF508 por regiones en pacientes con fibrosis quística.

traron diferencias significativas estadísticamente entre los diferentes genotipos en relación con las características clínicas estudiadas: edad de inicio de síntomas, edad de diagnóstico, síntomas iniciales, presencia de insuficiencia pancreática, enfermedad pulmonar, presencia de diabetes u otras complicaciones severas y valor de electrolitos en sudor (27), sugiriendo la necesidad de ampliar la muestra para evaluar este aspecto en nuestra población.

#### Discusión

La frecuencia de la mutación DF508 observada en los pacientes colombianos con FQ (48%) es inferior a la informada en los países de Europa del norte, USA y Canadá y similar a la que presentan los países de Europa del sur (28) y América Latina, a excepción de Cuba (34%) (6) y Chile (29,2%) (10) (Tabla 4).

El análisis de nuestros pacientes por departamentos, el cual refleja la composición étnica del país, es interesante pues muestra que, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de la mutación DF508 entre Bolívar y Caldas ( $X^2 = 2,58$ , GL = 1 y  $p > 0,05$ ) y Bolívar y Antioquia ( $X^2 = 2,33$ , GL = 1 y  $p > 0,05$ ), parece evidente que, dado un mayor tamaño de la muestra, podrá observarse una menor frecuencia de esta mutación en las poblaciones de origen africano en Colombia. Igualmente, al hacer el análisis estadístico agrupando los pacientes por regiones (Tabla 3) no se hallaron diferencias significativas entre ninguna de ellas, aunque se preserva la tendencia de una menor frecuencia de mutaciones DF508 en las poblaciones costeras del país. La similitud con los países de Europa del sur es posiblemente debida a la colonización de Co-

País	Frecuencia %	X <sup>2</sup>
Israel	31,5	6,417
Turquía	26,7	4,628
Grecia	54,1	1,637
Italia	47,7	0,007
España	51,8	0,574
Portugal	52,4	0,415
Francia	66,5	15,085
Gran Bretaña	55,6	2,564
Bélgica	67,0	15,057
Irlanda	77,0	19,158
Alemania	77,3	50,567
Bulgaria	56,3	1,593
Finlandia	45,0	0,116
Cerdeña	57,1	1,094
Checoslovaquia	67,0	11,841
Escocia	73,0	23,783
USSR	44,8	0,172
Holanda	76,3	25,861
Dinamarca	86,8	79,163
Yugoslavia	39,5	0,894
México	41,0	1,018
Cuba	34,0	5,981
Chile	27,8	8,25
Brasil	47,0	0,037
Hispánicos USA	45,7	0,147
Colombia	48,0	

**Tabla 4.** Frecuencia de DF508 en América, Europa y otros países.  $p$  = probabilidad de X<sup>2</sup> para observar igualdad de grupos. El nivel de significación de esta prueba fue 2,5%.

	Individuos (N)	Frecuencia (%)
DF508/DF508	24	39,3
DF508/No-DF508	15	24,7
No-DF508/No-DF508	22	36,0
<b>Total</b>	<b>61</b>	<b>100,0</b>

**Tabla 5.** Frecuencias genotípicas en los pacientes colombianos con fibrosis quística.

lombia por inmigrantes de esa región, principalmente españoles. En lo que se refiere a la población latinoamericana, ésta es básicamente mestiza, con un "pool" genético constituido por genes de origen amerindio, negro y caucásico, en diferentes proporciones en los distintos países latinoamericanos y en las diversas regiones colombianas, lo que explica la heterogeneidad observada, la cual se ve también influenciada por factores como los migratorios y la presión de selección, que son diferentes en las distintas poblaciones.

Con respecto a la distribución de haplotipos, y aunque ésta será objeto de una publicación posterior (25), existe una clara asociación de la mutación DF508 con el haplotipo B en los distintos departamentos. Esta misma asociación es absoluta en Antioquia, lo que podría deberse a un posible efecto fundador.

Por el contrario, en los cromosomas FQ con mutaciones distintas de DF508, se observa una marcada heterogeneidad haplotípica. Santa Fe de Bogotá es la única región que presenta asociación con el haplotipo D, siendo la población más heterogénea de todas. Esta situación podría explicarse por los diferentes patrones de migración externa e interna que se presentan en las distintas regiones del país, particularmente en Santa Fe de Bogotá, así como también por el diferente aporte genético (genes de origen amerindio, negro y caucásico) en las distintas poblaciones colombianas.

En consecuencia, al hablar de los cromosomas FQ asociados con mutaciones No-DF508 en los pacientes colombianos, debemos considerarlos como un

grupo heterogéneo. Esta información resulta valiosa para el posterior tamizado mutacional en estos cromosomas, ya que orienta la búsqueda de un panel específico de mutaciones de acuerdo con los distintos haplotipos encontrados.

La identificación de las otras mutaciones que está actualmente en curso para cada una de las regiones de Colombia, proporcionará una herramienta de gran utilidad para el diagnóstico molecular y una asesoría genética más acertada en la población colombiana. Como se puede observar en la tabla 5, el porcentaje de pacientes con genotipo homocigoto DF508/DF508 es de 39,3%. Esto significa que, aun cuando la frecuencia general de esta mutación es de 48% en Colombia, actualmente 60.7% de los pacientes no puede ser diagnosticado con certeza, debido al desconocimiento que aún tenemos acerca de cuáles son las otras mutaciones predominantes en nuestro país. La posibilidad de ofrecer un diagnóstico molecular temprano a los pacientes es, sin duda, una gran ayuda para el médico tratante, ya que los valores a veces ambiguos de electrolitos en sudor, junto con síntomas y signos clínicos inespecíficos, en especial en grupos heterogéneos, hace que el diagnóstico y el manejo del paciente sean difíciles. La posibilidad de confirmación de un genotipo de FQ hace que el manejo del paciente sea más oportuno y su calidad de vida mejor, en la medida en que se dé este diagnóstico tan pronto como aparecen los primeros síntomas compatibles con FQ, y en forma particular en poblaciones de riesgo.

La ausencia de una correlación genotipo-fenotipo, que se observó en nuestra población, está en concordancia con los informes en poblaciones étnicamente heterogéneas con una frecuencia baja de la mutación DF508, en particular con poblaciones hispanas (9, 29, 30). Esta correlación deberá ser aumentada con los nuevos pacientes provenientes de otros departamentos y revisada a la luz de las otras mutaciones encontradas en los genotipos DF508/No-DF508 y No-DF508/No-DF508.

Los datos preliminares de la frecuencia de portadores que hemos obtenido en el presente estudio (1:65) en una población de controles sanos sin ningún antecedente familiar de FQ, indican que es importante realizar un tamizaje poblacional a nivel nacional y regional, con el fin de establecer la frecuencia de portadores de DF508 y de las mutaciones más frecuentes en cada región.

Aunque preliminar, esta información es indicativa de una frecuencia relativamente alta de portadores, y de una incidencia de la enfermedad mucho mayor que la sospechada inicialmente. Finalmente, el número cada vez mayor de pacientes que estamos diagnosticando mediante métodos moleculares, confirma que esta enfermedad venía siendo subdiagnosticada en Colombia.

### Summary

Cystic Fibrosis (CF) is the most frequent autosomal recessive disease in Caucasians, with a mean incidence of 1/2.500 newborns. The carrier frequency of the main mutation, DF508, is 1/25 and varies significantly around the

world, as well as the other more than 600 mutations so far described. CF has been barely studied in Latin America until now, and information on its incidence and frequency of DF508 is available in a few countries. Cuba has the highest incidence (1/3.862), and Argentina the highest frequency of DF508 (63%). No data are available for the real incidence of the disease and its molecular characteristics in Colombia; therefore, it proved urgent to start molecular studies in those patients in which, despite symptoms and paraclinic tests, no cystic fibrosis diagnosis was established.

In the present study we report the identification of the DF508 mutation and the CFTR associated haplotypes in 92 Colombian patients from 6 regions of the country. The results show an overall frequency of DF508 of 48%, with regional variations ranging from 25% in Bolivar up to more than 60% in Caldas and Santander. The regional variability of the haplotypes as well as DF508 frequency probably reflect the ethnic heterogeneity of our country. The DF508 mutation has been found in 1/65 healthy carriers, corresponding to a gene frequency of 0.0076.

### Agradecimientos

La presente investigación fue posible gracias a la cofinanciación de Colciencias, Proyecto 1308-04-52-94, y del INSERM (Institut National de la Santé et Recherche Médicale), Francia, a través de una red norte-sur, contrato 94NS3. Queremos agradecer al Dr. Lawrence Silverman (North Carolina School of Medicine, USA) por sus valiosos comentarios y al Dr. Thomas White (Roche Molecular Systems) por su apoyo incondicional a ésta y otras investigaciones durante varios años. Queremos además expresar nuestros sinceros agradecimientos a los Dres. C. Malabet, decano. B. de Torres, Proyectos Académicos, y G. Carvajalino, Depto. Química y Biología de la Universidad del Norte por su apoyo a P. Garvito.

### Referencias

1. Tsui LC. The spectrum of cystic fibrosis mutations. *Trends Genet* 1992; **8**: 392-398.
2. Tsui LC. Worldwide survey of the DF508 mutation. *Am J Hum Genet* 1990; **44**: 319-326.
3. Phillips OP, Sherman E, Woods BS, Aram SH, et al. Cystic Fibrosis mutations in white and black Americans: An approach to identification of unknown mutations with implications for cystic fibrosis screening. *Am J Obstet Gynecol* 1993; **4**: 1076-1082.
4. McIntosh I, Cutting GR. Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator and the etiology and pathogenesis of cystic fibrosis. *FASEB J* 1992; **6**: 2775-2782.
5. Grebe T, Seltzer WK, DeMarchi X, Silva DK, Doane W, Gozal D, Ritcher SF, Bowman C, Norman RA, Rhodes S, Hernried L, Murphy S, Harwood Y, Accurso F, Jain K. Genetic analysis of hispanic individuals with cystic fibrosis. *Am J Hum Genet* 1994; **54**: 443-446.
6. Collazo T, Magarino C, Chávez R, Suarez B, Gispert S, Gómez M, Rojo M, Herebero L. Frequency of delta-F508 mutation and XV2C/KM19 haplotypes in Cuban cystic fibrosis families. *Hum Hered* 1995; **45**: 55-57.
7. Raskin S, Phillips HI, Krishnamani C, Parker RA. DNA analysis of Cystic Fibrosis in Brazil by Direct PCR Amplification from Guthrie Cards. *Am J Med Genet* 1993; **46**: 665-669.
8. Pivetta OH, Olek K. Relación entre la mutación DF508 y la expresión clínica en pacientes con fibrosis quística. Publicación oficial del IV Congreso Latinoamericano de Fibrosis Quística, Montevideo, Uruguay, 1992.
9. Orozco L, Lezana JL, Chávez M, Valdez H, Moreno M, Carnevale A. Estudio molecular de la mutación DF508 y análisis genético de una muestra de pacientes con fibrosis quística. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1993; **7**: 457-462.
10. Ríos T, Orellana O, Aspíllaga M, Avendaño Y, Largo Y, Riveros N. CFTR mutations in Chilean cystic fibrosis patients. *Hum Genet* 1994; **94**: 291-294.
11. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem BS, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989; **245**: 1059-1065.
12. Pucelle E. CFTR: une protéine à multiples fonctions. *Médecine/Sciences* 1994; **10**: 627-629.
13. CFGA Consortium. Cystic fibrosis genetic analysis consortium. Newsletter 1996; **68**: May 23
14. Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of the complementary DNA. *Science* 1989; **245**: 1066-1073.
15. Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA. Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic Analysis. *Science* 1989; **245**: 1073-1080.

## Estudios moleculares en fibrosis quística

16. **Beudet AL, Feldman GL, Fernbach SD, Buffone GJ, O'Brien WE.** Linkage disequilibrium in cystic fibrosis, and genetic counseling. *Am J Hum Genet* 1989; **44**: 319-326.
17. **Shwachman H.** Long term study of 105 patients with CF. *Am J Dis Child* 1958; **96**: 6-15.
18. **Brasfield D, et al.** The chest roentgenogram in CF: a new scoring system. *Pediatrics* 1979; **63**: 24-29.
19. **Keyeux G, Lefranc MP, Chevailler A, Lefranc G.** Molecular analysis of the IGHA and MHC class III region genes in one family with IgA and C4 deficiencies. *Exp Clin Immunogenet* 1990; **7**: 170-180.
20. **Del Sal G, Manfioletti G, Schneider C.** The CTAB-DNA precipitation method: a common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. *Bio Tech* 1989; **5**: 514-519.
21. **Saiki RK, Sharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N.** Enzymatic amplification of (3-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; **230**: 1350-1354.
22. **Keyeux G.** La PCR (Polymerase Chain Reaction): aplicaciones en el diagnóstico clínico. *Universitas Médica* 1995; **4**: 122-126.
23. **Sánchez D.** Estudio molecular de pacientes bogotanos con fibrosis quística. Tesis de Magister en Biología 1995; Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias.
24. **Garavito P.** Estudio molecular de pacientes de diferentes regiones de Colombia con fibrosis quística. Tesis de Magister en Biología 1996; Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias.
25. **Keyeux G, Garavito P, Sánchez D, Rodas C, Bienvenu T, Stand I, Aristizabal G, Zarante I, Prieto JC, Kaplan JC, Bernal JE.** Regional variation of the frequency of DF508 and linked haplotypes in CF patients from Colombia: implications for local and regional (Latin American) molecular screening test and multifocal origin of the disease 1997; (en preparación)
26. **Kerem E, Corey M, Kerem B, et al.** The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis: analysis of the most common mutation (DF508). *N Engl J Med* 1990; **323**: 1517-1522.
27. **Stand I.** Asociación genotipo-fenotipo en la fibrosis quística. Análisis de la mutación DF508 en población colombiana. Trabajo de grado 1995; Post-grado Neumología Pediátrica. Escuela Colombiana de Medicina
28. European Working Group on Cystic Fibrosis Genetics (EWGCFG). Gradient of distribution in Europe of the major CF mutation and of its associated haplotypes. *Hum Genet* 1990; **38**: 445.
29. **Lester L, Kraut J, Lloyd J.** DF508 genotype does not predict disease severity in an ethnically diverse cystic fibrosis population. *Pediatrics* 1994; **93**: 114-118.
30. **Gan K, Heijerman H, Bakker W.** Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. *Lancet* 1994; **330**: 865-867.