

Tesis de Maestría en Biología opción Biología Celular y Molecular
Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)
Lic. Lucilla Pizzo

“Desarrollo de herramientas para mejorar el diagnóstico molecular y asesoramiento genético de Fibrosis Quística en Uruguay”

Orientador: Dra. Mónica Marín

Co-orientador: Dra. Arlinet Kierbel

Co-orientador: Dra. Alicia Vaglio

Sección Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias
Laboratorio de Biología Celular de Membranas, Institut Pasteur de Montevideo
Instituto de Genética Médica, Hospital Italiano



Abril 2013

Resumen

La Fibrosis Quística (FQ) es la enfermedad recesiva letal más frecuente en Caucásicos, causada por mutaciones en el gen *CFTR*. Se ha estudiado la epidemiología de la FQ en Uruguay, sin embargo, no existen datos oficiales de la frecuencia de mutaciones causantes de FQ. A nivel mundial, se han identificado 1900 mutaciones en el *CFTR* y sólo 1000 serían causantes de enfermedad. Las restantes son de efecto desconocido y, dado que muy pocas fueron estudiadas funcionalmente, es difícil predecir sus consecuencias clínicas. El poco conocimiento de la afección en nuestro país, sumado a las interrogantes planteadas a nivel mundial, dificultan el diagnóstico, pronóstico y asesoramiento genético de FQ en Uruguay.

El interés de este trabajo consiste en profundizar en el conocimiento de FQ en Uruguay desde el punto de vista epidemiológico y analizar el efecto de mutaciones en la funcionalidad del *CFTR*. Con el objetivo de establecer la frecuencia de mutaciones en individuos con FQ de Uruguay, se analizó la base de datos de FQ del Instituto de Genética Médica. A partir del análisis de 31 individuos con FQ, las mutaciones pF508del, G542X, R334W, R1162X, N1303K y 2789+5 G>A, se encontraron como las más frecuentes en Uruguay. Este trabajo reporta por primera vez la frecuencia de mutaciones en nuestro país discerniendo entre las distintas presentaciones clínicas de FQ.

Con el objetivo de entender posibles efectos funcionales de mutaciones sinónimas en el *CFTR*, y de predecir sitios donde éstas podrían comprometer la funcionalidad proteica, se analizó el uso de codones del *CFTR* en humanos y su conservación en Primates. Se encontraron regiones conservadas enriquecidas en codones frecuentes o raros, las cuales no pueden ser explicadas por una conservación de la secuencia. Estos resultados sugieren una implicancia funcional y que mutaciones sinónimas encontradas en el *CFTR* deben ser analizadas con precaución.

En este trabajo se diseñó, puso a punto y validó un sistema experimental capaz de cuantificar, mediante análisis de imágenes de microscopía confocal, la llegada del *CFTR* a la membrana apical de células epiteliales, compartimiento donde normalmente se expresa. Con este fin, se construyeron proteínas fusionadas a GFP de la forma salvaje del *CFTR* humano y de la mutación pF508del, la cual queda retenida en el retículo endoplásmico. Este sistema es capaz de determinar si una mutación compromete o no la llegada de la proteína a la membrana celular, ya sea total o parcialmente. Cuatro variantes del *CFTR* portadoras de mutaciones sinónimas fueron analizadas en este sistema y no mostraron alteraciones en su llegada a la membrana celular respecto a la proteína salvaje.

Consideramos que las herramientas presentadas en este trabajo contribuirán al diseño de un algoritmo de diagnóstico molecular para FQ específico para la población uruguaya así como a profundizar en el conocimiento del efecto de mutaciones no caracterizadas aún funcionalmente.

Abreviaturas:

AHFQMU: Asociación Honoraria Fibrosis Quística Mucoviscidosis del Uruguay

AVD: Ausencia de Vasos Deferentes

CFMDB: *Cystic Fibrosis Mutation Database*

CFTR: *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*

dNTP: desoxi-nucleótido trifosfato

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FQ: Fibrosis Quística

FQ-IP: Fibrosis Quística con insuficiencia pancreática

FQ-SP: Fibrosis Quística con suficiencia pancreática

GFP: *Green Fluorescent Protein*

IGM: Instituto de Genética Médica

kDa: kilo Daltons

Mmol: milimol

mM: milimolar

min: minuto

MSD: Dominio Transmembrana

NBD: Dominio de Unión a Nucleótido

OMIM: *Online Mendelian Inheritance of Man*

OMS: Organización Mundial de la Salud

P-gp: *P glycoprotein*

psf: point spread function

SD: *Standard Deviation*

Seg: segundo

TM: Segmento Transmembrana

YFP: *Yellow Fluorescent Protein*

Índice

1. Introducción.....	7
1.1 Fibrosis Quística	8
1.1.2 Manifestaciones clínicas de Fibrosis Quística.....	8
1.1.3 Diagnóstico	11
1.2 Alteración molecular subyacente en FQ	15
1.2.1 CFTR	15
1.2.2 Mutaciones en el gen CFTR causantes de FQ.....	17
1.2.3 Terapia en FQ	21
1.2.4 Alteraciones en el CFTR: lo que falta conocer	22
1.3 Mutaciones sinónimas en la enfermedad.....	23
1.4 FQ En Uruguay.....	24
2. Objetivos.....	27
3. Materiales y métodos	29
3.1 Estimación de las mutaciones más frecuentes de Fibrosis Quística en Uruguay	30
3.1.1 Análisis de la base de datos de FQ del Instituto de Genética Médica.....	30
3.2 Análisis del uso de codones del gen CFTR.....	33
3.2.1 Organismos y secuencias.....	33
3.2.2 Tablas de uso de codones	33
3.2.3 %MinMax	34
3.2.4 Evolución molecular (dS)	35
3.3 Diseño de un sistema cuantitativo para evaluar la localización sub-celular del CFTR.	36
3.3.1 ADNc de CFTR humano.....	36
3.3.2 Diseño de oligonucleótidos	36
3.3.3 Medida de la concentración de ADN.....	37
3.3.4 Cultivo de bacterias	37
3.3.5 Transformación de células quimiocompetentes	37
3.3.6 Ligación de fragmentos de ADN en vectores pGEM-T Easy y pEGFP-C1	37

3.3.7 Extracción de ADN plasmídico.....	38
3.3.8 Electroforesis en gel de agarosa.....	38
3.3.9. Generación de la construcción GFP-wtCFTR.....	39
3.3.10 Mutagénesis	40
3.3.11 Secuenciación.....	41
3.3.12 Líneas celulares.....	41
3.3.13 Metodologías estándar de cultivo de células	41
3.3.14 Inducción de la polarización de la monocapa	42
3.3.15 Evaluación de localización de pF508del en células extendidas.....	43
3.3.16 Transfección de GFP-CFTR	43
3.3.17 Inmunofluorescencia.....	44
3.3.18 Adquisición de imágenes por microscopía confocal de fluorescencia.....	44
3.3.19 Determinación de la point spread function experimental.....	46
3.3.20 Procesamiento y análisis de imágenes.....	47
3.3.21 Estadística	47
4. Resultados y Discusión	48
4.1 Análisis de la población de Fibrosis Quística de Uruguay	49
4.1.1 Individuos diagnosticados con Fibrosis Quística	51
4.1.2 Estimación de las mutaciones más frecuentes en FQ en Uruguay.....	58
4.1.3 Pacientes sin confirmación diagnóstica (“Inconcluso”).....	64
4.1.4 Pacientes diagnosticados con AVD.....	66
4.1.5 Pacientes con diagnóstico poco probable de FQ	67
4.1.6 Mutaciones de consecuencias clínicas desconocidas.....	68
4.2 Análisis del uso de codones en el gen CFTR.....	72
4.2.1 Uso de codones en el CFTR humano	72
4.2.2 Conservación en Primates y otros mamíferos de agrupamientos de codones raros/frecuentes del CFTR.....	75
4.2.3 Mutaciones sinónimas reportadas en el CFTR.....	80

4.3 Diseño de un sistema cuantitativo para evaluar la localización sub-celular del CFTR.	82
4.3.1 Clonado del CFTR en el vector de expresión pEGFP-C1	82
4.3.2 Expresión de GFP-wtCFTR y GFP-pF508delCFTR en células MDCK polarizadas.	83
4.3.3 Cuantificación de CFTR apical a través de análisis de imágenes.	86
4.3.4 Deconvolución de imágenes confocales aumenta el rango dinámico del sistema.	89
4.3.5 Detección del rescate de pF508 por temperatura.....	93
4.3.6 Presentación de un sistema cuantitativo para evaluar la localización sub-celular del CFTR por análisis de imágenes	94
4.3.7 Evaluación de mutantes sinónimos de CFTR en el sistema experimental.	97
6. Conclusiones y perspectivas	100
8. Anexo	103
9. Agradecimientos.....	108
10. Bibliografía	110

1. Introducción

Toda enfermedad es el resultado de la acción combinada de los genes y el ambiente, aunque la contribución relativa del componente genético puede ser significativa o escasa. Entre los trastornos causados por factores genéticos se pueden percibir, en función del número de genes involucrados y del impacto del ambiente en el desarrollo de la enfermedad, desordenes monogénicos, oligogénicos, poligénicos y cromosómicos. Los defectos monogénicos están causados por alteraciones (mutaciones) en genes individuales. La mutación puede causar enfermedad al estar presente en un sólo cromosoma del par homólogo (herencia dominante) o en ambos cromosomas (herencia recesiva). La mayoría de estos defectos son raros, con frecuencias que como mucho alcanzan a un individuo afectado en 500 de la población. Aunque individualmente son raros, como grupo, los trastornos monogénicos son responsables de una importante proporción de enfermedades y muertes: afectan al 2% de la población mundial, su incidencia en niños recién nacidos es, en conjunto, de 0,36%, mientras que en niños hospitalizados de 6-8%. La Fibrosis Quística es un ejemplo de enfermedad monogénica con herencia recesiva, causada por mutaciones en un único gen cuya deficiencia genera alteraciones en distintos órganos y sistemas, los que finalmente terminan en mortalidad en la infancia, adolescencia o adultez temprana.

1.1 Fibrosis Quística

1.1.2 Manifestaciones clínicas de Fibrosis Quística

La Fibrosis Quística (FQ) es el trastorno autosómico recesivo letal más frecuente en Caucásicos, con una incidencia de aproximadamente 1/3.300 nacimientos [1]. Es causada por la disfunción del canal de cloruro *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR) [2, 3].

Mutaciones en el gen *CFTR* dan lugar a la enfermedad por una función alterada del canal de cloruro o por su ausencia en la membrana. Esto resulta en una conductancia anormal de cloro desde el espacio intracelular al extracelular, a través de la membrana apical de las células epiteliales. Debido a que el transporte iónico genera un gradiente osmótico, la disminución en la secreción de cloruro también genera una disminución de transporte de agua a la superficie epitelial [4]. Este no es el único mecanismo pato-fisiológico posible, ya que otro de los roles propuestos para CFTR sería inhibir la absorción de sodio, y por lo tanto la pérdida de la proteína podría causar una absorción excesiva de este ión (y de agua) [5, 4]. Cuál de los dos mecanismos (reducción de secreción de cloruro o hiperabsorción de sodio) es más relevante en el desarrollo de FQ, no es claro.

Dado que CFTR se expresa en la membrana apical de epitelio secretor y absorptivo de páncreas, intestino, hígado, vía aérea, *vas deferens* y glándulas sudoríparas, su disfunción afecta varios órganos. En el pulmón, este desequilibrio resulta en una depleción de líquido en la superficie respiratoria y, dada su esencialidad para la estabilidad y el funcionamiento de las cilias, éstas colapsan y disminuye el transporte muco-ciliar. A partir de este desequilibrio se forma un moco anormalmente espeso, característico de la enfermedad, el que se cree que da lugar a la obstrucción de la vía aérea e infecciones pulmonares recurrentes y progresivas (Figura 1A). Los individuos afectados presentan inflamación de la vía aérea inferior e infecciones endobronquiales crónicas (particularmente con *Pseudomonas aeruginosa* y *Burkholderia cepacia*) progresando en una enfermedad pulmonar crónica caracterizada por un amplio daño en la vía aérea (quistes, bronquiectasias y abscesos) y fibrosis del parénquima del pulmón [5, 6]. La enfermedad pulmonar es la causa principal de morbilidad y mortalidad en FQ [6].

La alteración en el CFTR también afecta la funcionalidad de las enzimas pancreáticas, originando insuficiencia pancreática. Esto se produce por la obstrucción de los ductos intralobulares proximales del páncreas por tapones proteicos. La susceptibilidad del páncreas a la obstrucción de los ductos internos debido a la disfunción del CFTR se cree que es debido a la alta concentración de macromoléculas en las secreciones y la dependencia del transporte de cloruro a cargo de CFTR, fundamental para mantener el balance de fluidos. La obstrucción ductal progresiva y la fibrosis del tejido acinar se presenta como insuficiencia pancreática desde del nacimiento o la infancia temprana. La deficiencia pancreática exócrina completa es vista en 85%-90% de pacientes con FQ [7]. La disfunción pancreática conlleva a mala absorción de grasas y proteínas, generando trastornos nutricionales, y junto con la deficiencia en la absorción de vitaminas liposolubles, retraso cognitivo y falla de crecimiento.

Más del 95% de los hombres con FQ son infértiles, como resultado de azoospermia causada por la ausencia de los vasos deferentes, de estar presentes, son atróficos o fibróticos. CFTR sería importante en el desarrollo normal de los vasos deferentes, ya que las mutaciones con consecuencias más leves en la proteína causan la Ausencia de los Vasos Deferentes (AVD). A su vez, también se han registrado anomalías en parámetros del semen en hombres con FQ, sugiriendo que otras funciones del CFTR, como la secreción de bicarbonato (HCO_3^-), podrían estar vinculadas con la azoospermia registrada [8].

De esta manera, la forma clásica de FQ es una enfermedad multi-orgánica: el epitelio del tracto respiratorio, el páncreas exócrino, intestino, el sistema hepato-biliar y el tracto genital masculino se encuentran afectados (Figura 1B). La supervivencia media reportada para individuos con presentación clásica de FQ es de 36,9 años [6].

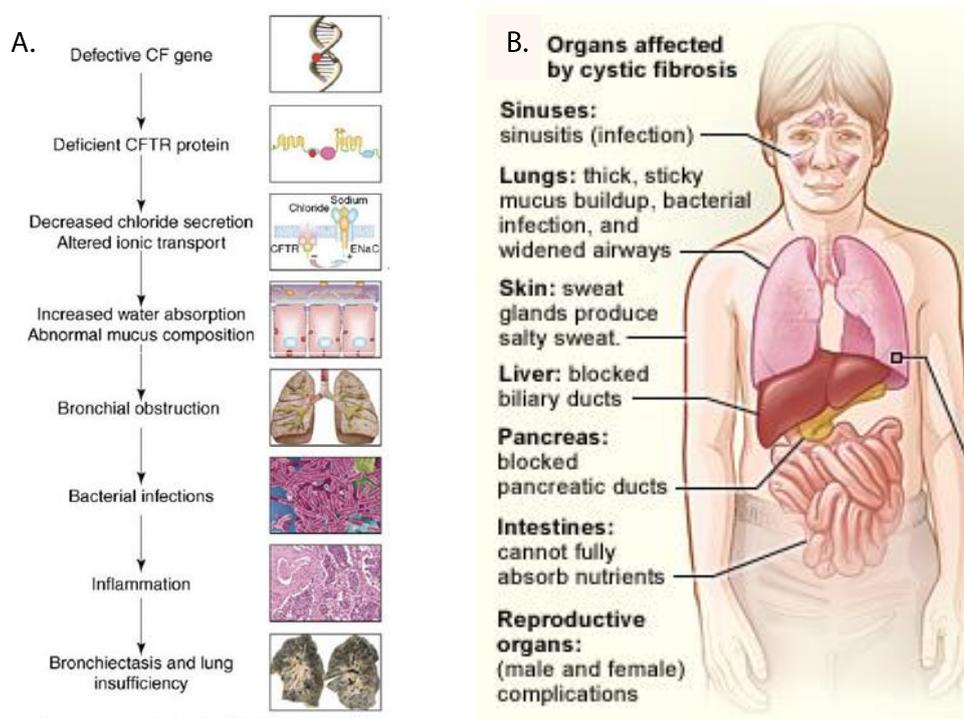


Figura 1. (A) Alteración en la funcionalidad del CFTR que lleva a la enfermedad pulmonar. (B) órganos afectados en FQ [10, 11].

Si bien la mayor parte de pacientes con FQ sufren de la forma clásica, se pueden distinguir formas más leves de la enfermedad, ocasionalmente referidas como FQ atípica o no clásica. La mayoría de los pacientes afectados con estas formas leves de FQ presentan suficiencia pancreática, enfermedad pulmonar leve y/o estudios de funcionalidad del CFTR normales o en el rango umbral. Los individuos afectados con estas formas presentan un compromiso de al menos un órgano o sistema [9, 5].

También se presentan fenotipos con un único compromiso de órgano producto de la disfunción del CFTR. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), estos fenotipos deberían ser más apropiadamente denominados “Desórdenes Asociados al CFTR”. La Tabla 1 muestra los fenotipos de un único órgano que se han encontrado asociados a mutaciones en el *CFTR*. La AVD es una de las manifestaciones clínicas más comúnmente identificadas en los Desórdenes Asociados al CFTR.

Si bien es útil clínicamente categorizar estas distintas expresiones clínicas vinculadas a mutaciones en el gen *CFTR*, no es conveniente ser rígido en esta clasificación, ya que el

fenotipo de FQ es un continuo de síntomas y no puede ser herméticamente definido en categorías distintas.

La FQ se caracteriza por una gran variabilidad fenotípica: la severidad y la tasa de progresión de la enfermedad en los órganos afectados varían considerablemente, incluso hasta en la forma clásica. Esta variabilidad fenotípica puede ser explicada por distintos factores: el genotipo en *CFTR*, la acción de genes modificadores y de factores ambientales [12]. Ciertos polimorfismos en genes específicos están asociados con una enfermedad pulmonar más severa y dos o más genes modificadores parecen ser los determinantes principales en la obstrucción intestinal de recién nacidos afectados con FQ [13].

Tabla 1. Fenotipos de único órgano asociados con mutaciones en *CFTR* (según OMS). Adaptado de De Boeck [5].

<p>Azoospermia obstructiva aislada</p> <p>Pancreatitis crónica</p> <p>Aspergilosis broncopulmonar alérgica</p> <p>Bronquiectasis diseminada</p> <p>Panbronquiolitis difusa</p> <p>Colangitis esclerosante</p> <p>Hipertripsionogemia neonatal</p>

1.1.3 Diagnóstico

El diagnóstico de FQ es establecido en presencia de un fenotipo clínico consistente (Tabla 2), sumado a la evidencia de la disfunción del CFTR (concentración anormal de cloruro en el sudor, o diferencia de potencial transepitelial nasal anormal), o la identificación de dos mutaciones causantes de FQ en distintos cromosomas [14].

El test del sudor, que determina la concentración de cloruro en el sudor, es el estudio paraclínico de preferencia para evaluar la funcionalidad del CFTR. Desde el desarrollo de la técnica descrita por Gibson y Cooke en 1959, la iontoforesis con pilocarpina es el método preferido para estimular la producción de sudor [5, 15]. El límite superior de la concentración de cloruro en el sudor en individuos no afectados es de 60 mmol/L.

Otro bioensayo disponible para evaluar la funcionalidad del CFTR es la diferencia de potencial transepitelial nasal. Esta herramienta ayuda a resolver dilemas diagnósticos en pacientes con

formas no clásicas de la enfermedad, y test del sudor normales, considerando o descartando una disfunción asociada al CFTR [5].

En la mayoría de los individuos afectados con la forma clásica, el diagnóstico es claro y se realiza fácilmente: las características clínicas son típicas y las concentraciones anormales (mayores a 60 mmol/L) de cloruro en el sudor apoyan el diagnóstico. En estas situaciones el análisis genético no es estrictamente necesario, aunque es útil para confirmar el diagnóstico y permitir el estudio de portadores y el estudio prenatal en la familia [12].

Sin embargo, en las formas no clásicas de la enfermedad las concentraciones de cloruro en el sudor se encuentran en el rango umbral (40-60 mmol/L) o normal (menor a 40 mmol/L), dificultando el diagnóstico [12,14, 16] . De esta manera, para confirmar una vinculación de la enfermedad con una disfunción del CFTR, es necesaria la detección de una mutación causante de enfermedad en cada alelo del gen *CFTR*. Alternativamente, puede recurrirse a la cuantificación directa de la disfunción del CFTR por la medida de la diferencia de potencial transepitelial nasal [5,14].

En cuanto a Desórdenes Asociados al CFTR, de acuerdo a la base de datos *Online Mendelian Inheritance of Man* (OMIM), el diagnóstico de AVD asociada al *CFTR*, se establece en presencia de azoospermia, ausencia del *Vas Deferens* y una mutación identificada en uno o en los dos alelos del *CFTR* [17].

La superposición de síntomas entre estas condiciones motiva un debate importante acerca de dónde establecer el límite del diagnóstico entre FQ y Desórdenes Asociados al CFTR. A su vez, los estudios de funcionalidad del CFTR presentan valores superpuestos entre individuos con presentaciones leves de la enfermedad e individuos sin FQ, dificultando aún más establecer el diagnóstico [7].

Tabla 2. Manifestaciones clínicas sugestivas de FQ. Adaptado de De Boeck [5].

Altamente sugestivas	Sugestivas pero menos específicas
<i>Manifestaciones gastrointestinales</i>	<i>Manifestaciones gastrointestinales</i>
Íleo meconial	Falla para tragar
Insuficiencia pancreática en niños	Hipoproteinemia
	Deficiencia de vitaminas liposolubles
	Síndrome de obstrucción intestinal distal
	Prolapso rectal
	Cirrosis biliar
	Hipertensión portal
	Colelitiasis en niños sin desorden hemolítico
	Colangitis esclerosante primaria
	Insuficiencia pancreática exócrina en adultos
	Pancreatitis recurrente
<i>Manifestaciones sinopulmonares</i>	<i>Manifestaciones sinopulmonares</i>
Infección respiratoria recurrente con <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Infecciones respiratorias persistentes o recurrentes con <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Achromobacter xylosoxidans</i> o <i>Haemophilus influenzae</i> .
Bronquiectasis en ambos lóbulos superiores	Evidencia radiológica de bronquiectasias, atelectasias, hiperinflación o infiltrados persistentes en radiografía de tórax
Infección respiratoria persistente con <i>Burkholderia cepacia</i>	Hemoptisis asociada con enfermedad pulmonar difusa distinta que tuberculosis o vasculitis
Pólipos nasales en niños	Tós crónica y/o productiva
	Aspergilosis broncopulmonar alérgica
	Pólipos nasales en adultos
	Eviencia radiológica de pansinusitis
<i>Otros</i>	<i>Otros</i>
Alcalosis hipoclorémica en ausencia de vómito	Dedos en palillo de tambor
Ausencia Bilateral de Vasos Deferentes	Osteopenia/osteoporosis
	<40 años de vida

El diagnóstico molecular de FQ se basa en la identificación de dos alelos del gen *CFTR* con mutaciones causantes de la enfermedad [18]. Distintos procedimientos pueden ser aplicados con este fin, que van desde el estudio de las mutaciones más frecuentes a la secuenciación parcial del gen. Se requiere un conocimiento profundo de las enfermedades asociadas al *CFTR* y su patología molecular, al momento de elegir las herramientas y estrategias del estudio, así como también al interpretar los resultados [12].

Con el objetivo de establecer criterios para optimizar el uso de estudios genéticos para el diagnóstico de FQ, en el año 2007 la Sociedad Europea de Fibrosis Quística convocó a una conferencia. Allí se acordó que el diagnóstico molecular debe comenzar con la búsqueda de las mutaciones más frecuentes en la población estudiada, es decir, aquellas que presentan una frecuencia mayor a 0,5% en pacientes con FQ [12, 5]. Con esta aproximación, es de esperar una tasa de detección de mutación superior al 95%. Sin embargo, la variabilidad de las frecuencias de mutaciones en el *CFTR* entre poblaciones impide lograrlo.

Ante el fracaso de encontrar mutaciones en ambos alelos, se aplican herramientas de escaneo de mutaciones, es decir, técnicas diseñadas para buscar anomalías en el gen exón por exón. Luego, se continúa con la secuenciación de la secuencia codificante del *CFTR*. Aún así, el uso combinado de las técnicas mencionadas, no garantiza la detección de ambos alelos mutados en todos los pacientes con FQ: 1-5% de los alelos permanecen sin ser identificados [12]. Esto podría ser explicado, al menos parcialmente, porque incluso los estudios genéticos del *CFTR* más avanzados, analizan solamente la región codificante y la unión exón/intrón. Las mutaciones localizadas en las regiones intrónicas y en el promotor, así como también aquellas ubicadas en las regiones reguladoras distantes, no son estudiadas rutinariamente y, por consiguiente, no serían detectadas [12, 18].

1.2 Alteración molecular subyacente en FQ

1.2.1 CFTR

El gen *CFTR* (GenBank GeneID: 1080) fue identificado como relacionado a FQ en 1989 [2, 3, 19, 20]. Con una extensión de 230 kb y 27 exones, *CFTR* mapea en el brazo largo del cromosoma 7 (7q31.2). Su alelo normal produce un transcrito de ARN mensajero (ARNm) que luego codifica una proteína de 1480 aminoácidos y un peso molecular de 168 kDa. Si bien CFTR se expresa principalmente en la membrana apical de células epiteliales, también ha sido evidenciado en otros tejidos, tales como en miocitos cardíacos, músculo liso, endotelio y eritrocitos [21].

El CFTR presenta cinco dominios: dos dominios transmembrana (MSD1 y MSD2), dos dominios de unión a nucleótido (NBD1 y NBD2) y un dominio regulador (dominio R) (Figura 2). Pertenecer a la gran superfamilia de transportadores *ATP-binding cassette* (ABC), que involucra proteínas integrales de membrana que usan la energía generada de la unión y la hidrólisis de ATP para translocar una gran variedad de moléculas a través de las membranas. Sin embargo, el CFTR es el único de esta familia con función de canal iónico [21, 22].

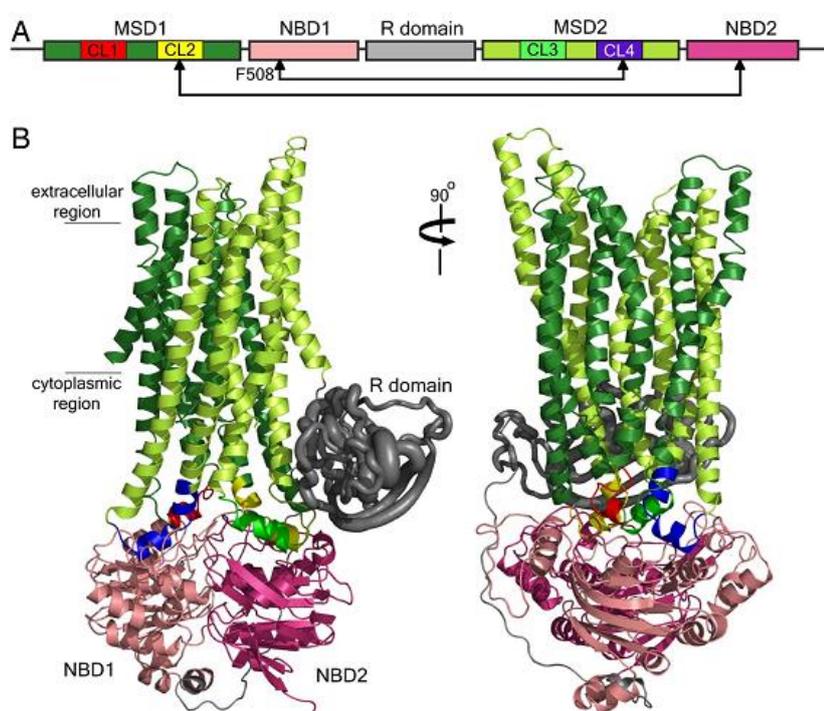


Figura 2. Estructura del CFTR. A. Esquema de la estructura primaria del CFTR. Presenta dos dominios de unión a nucleótido (NBD1 y NBD2), dos dominios transmembrana (MSD1 y MSD2) y un dominio regulador (R domain). Cada MSD contiene dos bucles intra-citoplásmicos (CL1-4) que forman la interfase con los dominios NBD. B. Modelo teórico de la estructura tridimensional del CFTR con sus dos vistas laterales [23].

Hasta el momento, sólo los dominios de unión a nucleótido han sido cristalizados [24,25]. La información disponible acerca de la estructura y dinámica del canal son producto de estudios de modelado molecular [26, 22, 23].

En el CFTR, los dos dominios transmembrana se ensamblan para formar un poro selectivo a aniones, de baja conductancia (6-10pS) [21]. Los dominios de unión a nucleótido son los encargados de unir e hidrolizar ATP, determinando la apertura y cierre del poro: forman una asociación (cabeza con cola) y en la interfase de la misma (donde se ubican motivos aminoacídicos conservados) se establece la interacción con dos moléculas de ATP [27,24]. El cambio conformacional mediado por la hidrólisis de ATP en el NBD2 junto con la presencia de la primer molécula en el NBD1 determinaría el cierre del poro [22].

La fosforilación de varios residuos en el dominio regulador por la proteína quinasa A (PKA) también modula la apertura y cierre del canal, aunque se desconoce exactamente cómo se transmite esta información al resto de la proteína [28]. El CFTR conduce cloruro bajo la mayoría de las condiciones fisiológicas, cuando la concentración externa de cloruro se encuentra por encima de 40 mM [8]. La cantidad de iones cloruro que pasa por un ciclo de apertura-cierre no se conoce hasta el momento.

Como toda proteína que tiene como destino final la membrana, el CFTR es sometido al sistema de transporte intracelular. La proteína es traducida en el retículo endoplásmico donde azúcares basales son agregados en el cuarto bucle extracelular. Luego, continúa hacia la red *trans*-golgi donde los residuos de azúcar son modificados en carbohidratos complejos y finalmente, es llevada a la membrana apical. Una vez en la membrana, el CFTR es removido mediante endocitosis mediada por clatrin, utilizando señales de tráfico presentes en la secuencia aminoacídica de la proteína. Una vez endocitado, puede ser reciclado a la superficie celular (directamente o vía endosomas de reciclaje), o puede ser degradado en lisosomas (Figura 3) [29].

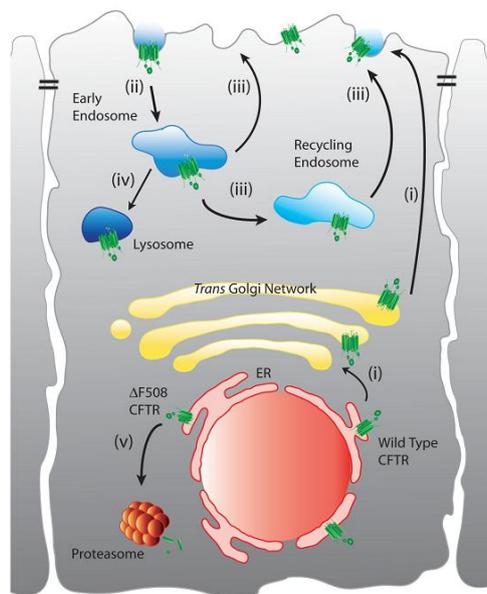


Figura 3. Modelo de tráfico intracelular del CFTR. (i) Traducción en el retículo endoplásmico, tráfico a la red transgolgi y finalmente a la membrana. (ii-iv) El CFTR es removido de la superficie mediante endocitosis. Una vez en los endosomas, el CFTR puede ser reciclado (iii) o degradado en los lisosomas (iv) [29].

Una vez en la membrana, además de estar implicado en la secreción de cloruro, el CFTR cumpliría otras funciones: conduce el ión HCO_3^- , contribuyendo a su secreción en un número de tejidos, incluyendo la vía aérea, intestino y páncreas [8]. Sin embargo, la permeabilidad del CFTR a HCO_3^- es mucho menor que para cloruro (Cl^-). También, el CFTR ha sido descrito como un regulador de otros canales de membrana, tales como el canal de sodio epitelial (ENaC) y el canal de cloruro (*Outwardly rectifying chloride channel*) y parecería actuar en el transporte de proteínas, como de glutatión. Recientemente se ha demostrado que el CFTR interactúa con muchas otras proteínas intracelulares, aunque la relevancia de estas interacciones no ha sido dilucidada aún [4].

1.2.2 Mutaciones en el gen *CFTR* causantes de FQ

Más de 1.900 mutaciones han sido identificadas en el gen *CFTR*, y la lista se actualiza continuamente en la base de datos *Cystic Fibrosis Mutation Database* (CFMDB) [30]. De acuerdo a la misma, las mutaciones de cambio de aminoácido son el 40% de los alelos de individuos con FQ, cambio de marco de lectura, 16%; alteraciones en el splicing, 12%; sin sentido, 8%; inserciones/delecciones sin cambio del marco de lectura, 2%; grandes inserciones/delecciones, 3%; mutaciones en el promotor, 0,8%, y variaciones de secuencia que se desconoce si son causantes de enfermedad constituyen el 18% de los alelos [30].

Las mutaciones del *CFTR* han sido clasificadas según su efecto funcional (Figura 4). Éstas incluyen la síntesis de la proteína incompleta debido a una terminación de la traducción prematura o alelos sin sentido (clase I), la maduración defectiva de la proteína y degradación prematura (clase II), la regulación alterada del CFTR debido a una disminución en la unión e hidrólisis de ATP (clase III), conductancia de cloruro defectiva exhibiendo actividad parcial (clase IV), número reducido de transcritos de CFTR (clase V), y menor estabilidad del CFTR en la superficie celular (clase VI) (Figura 4) [13]. Las primeras tres clases están asociadas con una pérdida completa de la función del canal de cloruro y han sido identificadas como mutaciones “severas”.

La primera mutación encontrada en el *CFTR* fue pF508del, una delección de 3pb (CTT) en el exón 11 que causa la pérdida del residuo de fenilalanina 508 ubicado en el dominio NBD1 y una mutación sinónima en el residuo de isoleucina 507 (Figura 2). Esta mutación se encuentra presente en aproximadamente el 90% de los cromosomas de pacientes con FQ, aunque su prevalencia varía considerablemente entre distintas poblaciones [31, 16]. pF508del genera una alteración en el plegamiento del CFTR, que causa la retención de la proteína por el sistema de control de calidad en el retículo endoplásmico [32]. Dado el efecto de la delección de F508 en el procesamiento de CFTR, se creyó que el defecto en el plegamiento debería ser muy severo. Sin embargo, al cristalizar el dominio NBD1 portando pF508del, se observó sólo una alteración estructural en los residuos inmediatos a F508 [25]. Los modelos estructurales que fueron elaborados del CFTR proponen que la F508 participa en la interacción del primer dominio de unión a nucleótido con el bucle intracelular del segundo dominio transmembrana, interacción que resulta fundamental para la regulación de la apertura y cierre del canal. Se postuló entonces que esta mutación afectaría el plegamiento de CFTR al comprometer la correcta interacción entre ambos dominios [26].

Años atrás se evidenció que esta retención en el retículo endoplásmico podía ser evadida si las células que expresaban pF508del eran cultivadas a temperaturas menores a 37 °C, restaurando parcialmente la llegada de la proteína a la membrana [33]. Una vez en la membrana, pF508del presenta una conductancia normal, aunque es menos estable; es endocitada y degradada más frecuentemente que la proteína salvaje [34].

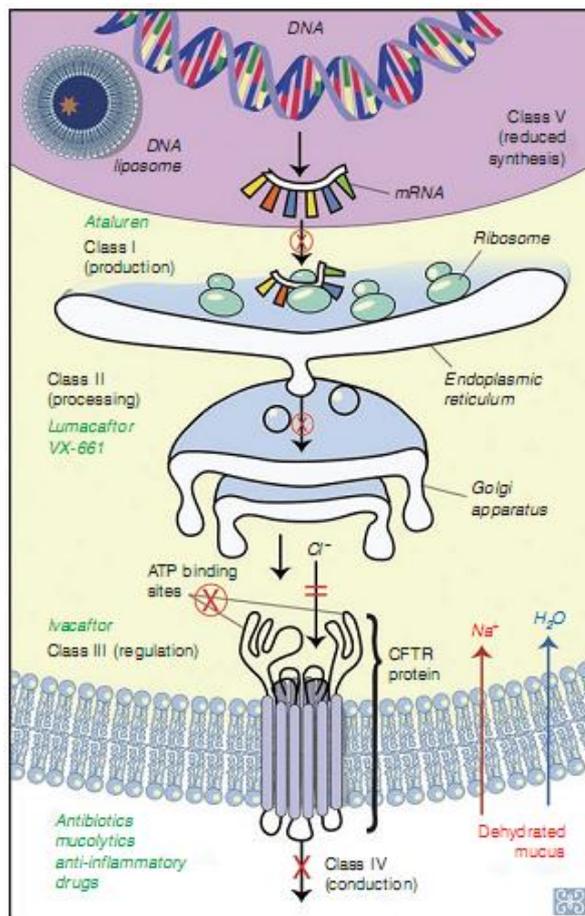


Figura 4. Clasificación de mutaciones en el *CFTR* según su efecto funcional [13].

Otras mutaciones, tales como G542X, G551D, R553X, W1282X y N1303K, pueden alcanzar frecuencias de 1-2% en pacientes con FQ [5]. La mayoría de las mutaciones han sido asociadas con poblaciones descendientes de europeos. Sin embargo, también se presentan mutaciones en poblaciones no europeas, tales como africanas y de Asia del Este, pero ningún alelo ha alcanzado la elevada frecuencia de pF508del [12].

Existe un gran interés en establecer la influencia del genotipo en la expresión fenotípica de FQ, sin embargo, no se ha establecido una correlación clara de este tipo. El impacto relativo del genotipo del *CFTR* en el fenotipo sería órgano-específico: los vasos deferentes son los más sensibles a una reducción en la función del CFTR, y los pulmones los menos afectados. De hecho, la AVD se ha asociado con la mutación R117H y los alelos, 5T o 7T, o la homocigosidad para los alelos 5T, polimorfismos de repetición de timinas que afectarían el número de transcriptos maduros correctos. Éstas son mutaciones con consecuencias funcionales más leves ya que para el alelo 5T un 6-37% de transcriptos producidos dan lugar a forma salvaje del CFTR [12, 13].

Adicionalmente, la correlación genotipo-fenotipo cambia para distintos órganos: es fuerte entre el genotipo en el *CFTR* y la afectación pancreática, mientras que en la expresión pulmonar la correlación es inexistente, sugiriendo que gran parte de la variabilidad fenotípica sería debida a la acción de genes modificadores [12]. De esta manera, individuos con dos mutaciones de clase I, II o III (severas) casi invariablemente presentan insuficiencia pancreática, mientras que mutaciones en las clases IV, V y VI pueden conservar función del *CFTR* residual y están usualmente asociadas con fenotipos más leves y suficiencia pancreática (Tabla 3).

Las mutaciones en el *CFTR* han sido clasificadas según sus consecuencias clínicas posibles en cuatro categorías (Tabla 3) [12]:

- A. Mutaciones que causan FQ
- B. Mutaciones que resultan en un Desorden Asociado al *CFTR*
- C. Mutaciones sin consecuencias clínicas conocidas
- D. Mutaciones con relevancia clínica no demostrada o incierta

Existe cierta superposición entre los grupos A, B, ya que algunas mutaciones pueden ser detectadas en asociación con suficiencia pancreática, o con un Desorden Asociado al *CFTR*, como AVD. De hecho, individuos portadores de mutaciones D115H junto con pF508del pueden presentar un fenotipo clínico desde AVD a FQ con funcionalidad pancreática normal pero con compromiso pulmonar.

Tabla 3. Clasificación de mutaciones en el *CFTR* según sus consecuencias clínicas [7].

CFTR mutations and their associated clinical consequences				
Association	Mutations			Phenotype
CF-causing	F508del*	6542X*	G85E*	Usually PI
	R553X*	G551D*	711+1G>T*	
CFTR-related disease	R1162X*	W1282X*	1898+1G>A	Usually PS
	R1158X	N1303K*	S549N	
	2184delA*	621+1G>T*	E822X	
	2184insA	1717-1G>A*	1078delT	
	3120+1G>A*	1898+1G>T*	2789+5G>A*	
	I507del*	R560T*	3659delC*	
	1677delTA			
	A455E*	711+3A>G	D1152H	
	R334W*	3849+10kbC>T*	L206W	
	R347P*	R117H-T5*	TG13-T5	
No clinical consequences	R117H-T7*	TG12-T5	TG11-T5	Usually PS
	D1152H	S997F	R74W-D1270N	
	TG13-T5	R297Q	R668C-G576A-	
	D565G	L997F	D443Y	
Unknown or uncertain clinical consequence	I148T	T854T	1521F	-
	R75Q	P1290P	F508C	
	875+40A/G	2752-15G/C	1506V	
	M470V	I807M	TG11-T5	
	E528E			
Unknown or uncertain clinical consequence	Mainly missense mutations with subclinical molecular consequences (e.g. M470V), which may co-segregate on the same chromosome and exert a more potent, cumulative phenotypic effect.			-

1.2.3 Terapia en FQ

El tratamiento paliativo de pacientes con FQ incluye el suministro de enzimas pancreáticas por terapia de reemplazo enzimático, antibióticos para el tratamiento de patógenos asociados a la enfermedad *S. aureus*, *H. influenzae* y *Pseudomonas Aeruginosa* y antiinflamatorios [13].

Desde que se descubrió el gen causante de la enfermedad, se han concentrado los esfuerzos en identificar moléculas que puedan dirigirse específicamente al CFTR o a proteínas vinculadas a su transporte en la célula, como terapia específica de FQ. Dada la elevada frecuencia de pF508del en pacientes con FQ, los intereses se centran en esta mutación, en el diseño de “correctores” que le permitan a este mutante llegar a la membrana apical. Hasta el momento, estos intentos no han llevado a una droga aprobada para su uso en pacientes afectados.

Recién a comienzos del año 2012, se introdujo *Ivacaftor*, la primera droga diseñada para tratar la causa subyacente de FQ, la cual es específica para la mutación G551D (clase III), presente en el 4% de los pacientes con FQ [35]. Esta mutación hace que el CFTR llegue a la membrana celular pero falla en abrirse apropiadamente. *Ivacaftor* actúa entonces como un potenciador para abrir el canal, promoviendo el flujo iónico. Esta droga, hasta el momento, ha mostrado tener una gran eficacia [35]. Dos ensayos clínicos mostraron la mejora significativa de la función pulmonar y la ganancia de peso luego de la administración de esta droga. *Ivacaftor* está siendo evaluada en combinación con un corrector que mejoraría el tráfico del CFTR al impedir la degradación de la proteína, y contribuyendo a que llegue a la superficie celular [13].

Otros fármacos están siendo desarrollados para contrarrestar el efecto de las mutaciones de clase I, que producen proteínas truncadas del CFTR. *Altaluren*, el cual se encuentra en la última fase de ensayo clínico, actúa forzando a la maquinaria de traducción a continuar leyendo el mensajero, salteándose el codón de terminación, y permitiendo entonces que se produzca la proteína completa [36].

Finalmente, la terapia génica, es decir la inserción de una copia de ADN del gen funcional en células afectadas, es otra de las herramientas posibles para el tratamiento de FQ. Los ensayos clínicos de FQ empleando vectores virales no han sido muy exitosos, ya que generaron importantes efectos adversos. La mayoría de los ensayos realizados han usado agentes de transferencia basados en lípidos, es decir, liposomas conteniendo ADN plasmídico con el gen *CFTR*, los cuales son inhalados para su transporte hacia el epitelio. La eficacia ha sido variable, con resultados positivos en ensayos funcionales, aunque la vida media del CFTR expresado sería reducida [13].

1.2.4 Alteraciones en el *CFTR*: lo que falta conocer

De las 1900 mutaciones descritas en la base de datos de FQ, cerca de 1000 se conoce que son causantes de la enfermedad. Las restantes estarían involucradas con Desórdenes Asociados al *CFTR*, o no causarían FQ [12, 5, 4].

Para la gran mayoría de mutaciones comunes en FQ (inserciones, deleciones y mutaciones sin sentido), es muy sugerente una vinculación con la enfermedad [12, 5]. En el caso de mutaciones que afectan el corte y empalme del transcrito, la evaluación del efecto puede ser más difícil: en algunos casos solamente se encuentran alterados una fracción de los transcritos, mientras otros son procesados eficientemente. Por consiguiente, las mutaciones que alteran el corte y emplame del ARN pueden causar FQ o Desórdenes Asociados al *CFTR* [12].

Varios polimorfismos en el *CFTR* (secuencias de ADN con una frecuencia de al menos 1% en la población) influyen en la manifestación de la enfermedad en individuos con FQ o Desórdenes Asociados al *CFTR* [37, 38]. Este es el caso de las regiones polimórficas en el intrón 9, en las cuales el número de repetidos de timininas (T) o timina-guanina (TG) afecta la eficiencia del corte y empalme del mensajero. Si bien estos sitios de T y TG son polimórficos, ciertas combinaciones de ellos aumentan las chances de exclusión del exón 9 en el ARNm maduro y por consiguiente, determinan un alelo del *CFTR* causante de enfermedad [39].

El efecto de mutaciones sin evidentes consecuencias funcionales sobre el fenotipo clínico es difícil de evaluar. Por ejemplo, la identificación de una mutación de cambio de aminoácido en una única familia o individuo, hace imposible determinar con seguridad si presenta un efecto deletéreo. Mutaciones de este tipo son vistas comúnmente en la población general, pero también se ven aún más frecuentemente en pacientes con fenotipo clínico consistente con FQ [12]. La evaluación funcional (valoración de localización celular, funcionalidad, regulación) de una variación de secuencia encontrada en el gen *CFTR* resulta fundamental para conocer su implicancia en la enfermedad. Sin embargo, la gran mayoría de las mutaciones no han sido caracterizadas funcionalmente, y por consiguiente, su potencial efecto no es claro [12].

Actualmente es un desafío para los clínicos interpretar el resultado de genética molecular del *CFTR*, y de integrarlo en el proceso diagnóstico. Este conflicto impacta en el diagnóstico de la enfermedad, y así, en la posibilidad de ofrecer un tratamiento adecuado al paciente, asegurando un mejor pronóstico y calidad de vida. Actualmente, a nivel mundial existe un interés particular en entender el efecto de variaciones de secuencia encontradas en pacientes con síntomas clínicos de la enfermedad. De hecho, en este momento, la base de datos *CFMDB*

está desarrollando un nuevo proyecto, llamado *CFTR2: The Clinical and Functional Translation of CFTR* [40]. Consiste en una iniciativa internacional liderada por un grupo de investigadores y clínicos, apoyada por la *United States Cystic Fibrosis Foundation* que busca proveer con información completa, avanzada y revisada por expertos acerca de la información clínica y funcional de las mutaciones en el *CFTR*.

1.3 Mutaciones sinónimas en la enfermedad

Al menos cincuenta enfermedades han sido asociadas con mutaciones sinónimas. El síndrome Treacher-Collins, la Atrofia Muscular Infantil Ligada al cromosoma X, el Síndrome Seckel son ejemplos de enfermedades en las que el gen causante de enfermedad presentó una mutación sinónima en un paciente afectado [41].

Las mutaciones sinónimas podrían afectar los niveles de proteína y su funcionalidad, por distintos mecanismos: el procesamiento de ARN, la regulación post-transcripcional, los niveles de degradación del ARNm, la tasa de traducción, y el plegamiento co-traducciona [41]. Su posible efecto en la elongación de la traducción está vinculado con el uso diferencial de codones en el genoma y por las correlaciones halladas entre la frecuencia de uso de un codón y la concentración del ARN de transferencia (ARNt) que lo reconoce [42,43,44]. De esta manera, se propone que codones poco frecuentes, al ser reconocidos por ARNt menos abundantes implicarían una pausa en el avance del ribosoma en comparación con codones más frecuentes. Por consiguiente, podrían constituir un mecanismo adicional de modulación de la cinética de traducción y el plegamiento co-traducciona.

Estudios en procariontas, en los que se cambiaron codones con distinta frecuencia de aparición en el genoma, llevaron a una reducción de la actividad biológica, la eliminación de ciertas pausas en la traducción y alteraciones en el plegamiento [45,46,47]. En eucariotas, sin embargo, el rol del uso de codones en el plegamiento de proteínas es un asunto aún en discusión [48].

En dos proteínas de la familia de transportadores ABC, la glicoproteína P (P-gp) y *CFTR*, se han evidenciado cambios funcionales luego de mutaciones sinónimas. En 2007 se mostró que una variación sinónima en P-gp dio lugar a una alteración funcional, la cual no pudo ser explicada por una alteración en el corte y empalme, ni por cambios en los niveles de ARNm y proteína [49].

Recientemente se postuló que el cambio sinónimo en *CFTR* en el residuo de I507 (concomitante a la delección de F508) altera la estructura secundaria del ARNm. Al revertir el codón de I507 al codón original, pero manteniendo la delección de F508, se obtiene un ARNm

correctamente plegado y mayores niveles de proteína madura que lo que se observa para la mutación pF508del nativa [50].

Estas observaciones hacen poner en cuestión la idea que mutaciones sinónimas identificadas en el gen *CFTR* en pacientes afectados con FQ son neutras. Si bien los mecanismos moleculares subyacentes no son claros aún, hay evidencias que, como otras alteraciones moleculares, los cambios sinónimos pueden alterar la funcionalidad de la proteína y asociarse a la enfermedad.

1.4 FQ En Uruguay

La FQ como entidad nosológica es reconocida de larga data en Uruguay, siendo a partir del Primer Congreso Latinoamericano de FQ, llevado a cabo en Argentina en 1986, que se crearon asociaciones de padres y médicos dedicados al tema, e incluso Uruguay fue sede del IV Congreso Latinoamericano de FQ en Noviembre de 1991. A partir de 1999 se lleva un Registro Uruguayo de FQ que, en agosto del 2006 sumaba 83 pacientes. Si bien no todos los pacientes diagnosticados eran registrados, el porcentaje que no lo hacía era escaso. Al considerarse el sub-diagnóstico de FQ por el conocimiento incompleto de la misma y de sus múltiples formas de manifestación, se presentó al Ministerio de Salud Pública el "Protocolo de atención para pacientes portadores de Fibrosis Quística" y fue el 21 de marzo de 2007 que se aprobó la Ordenanza Nº 213, la que establece la obligatoriedad de su aplicación [51].

El impacto de la enfermedad en la familia, llevó a que en setiembre del año 2004, se formara la Asociación Honoraria Fibrosis Quística Mucoviscidosis del Uruguay (AHFQMU). La misma se trata de una asociación civil sin fines de lucro creada por padres y afectados con la finalidad de cooperar con los medios y los centros de atención médica del país en la divulgación de información sobre el diagnóstico y tratamiento de FQ. Su principal objetivo actual consiste en difundir información sobre FQ y la creación del Primer Centro Especializado en Fibrosis Quística en el Uruguay [51]. Entre los logros alcanzados por esta Asociación, se destacan: el ingreso al país de enzimas pancreáticas y de los antibióticos tobramicina inhalatoria y colimicina, importantes para el tratamiento; la creación y la aprobación por parte del Ministerio de Salud Pública del Protocolo Médico para el tratamiento de FQ y finalmente, por decreto del Poder Ejecutivo se estableció el 4 de setiembre como "Día de la Prevención y Control de la Fibrosis Quística en el Uruguay". Esta Asociación cuenta que, a pesar de los logros alcanzados, el promedio de supervivencia de individuos afectados se reduce a la niñez o adolescencia, en claro contraste con el promedio de vida por encima de los 30 años de los afectados en otros países del mundo.

En Uruguay desde julio del año 2010, todos los recién nacidos vivos son estudiados para FQ. Para esto, se aplica un algoritmo de diagnóstico con el ensayo de tripsina inmunoreactiva y test del sudor. Si es confirmada la sospecha de la enfermedad, se realiza el estudio de las mutaciones más frecuentes.

No existe al momento actual datos oficiales de prevalencia, incidencia o mutaciones más frecuentes de FQ en Uruguay. Sin embargo, la investigación se ha enfocado en la epidemiología de FQ en nuestro país. De los estudios llevados a cabo, se destaca el de Luzardo *et al.* del año 2002 que estableció, en un grupo de 52 individuos con fenotipo clínico sospechable de FQ, la frecuencia de mutaciones en el *CFTR*. De acuerdo al mismo, la mutación más frecuente en individuos caucásicos, pF508del, alcanzó un valor de frecuencia génica de 40,4%, mientras que otras mutaciones causantes de FQ: G542X, R1162X, G85E, N1303K, R334W, R75Q, R74W, D1270N, W1282X, I507del, 2789+5G->A, R1066C, -816C/T, y R553X alcanzaron en conjunto un valor de 30,7%. En el 28,9% de los alelos, no se logró identificar con las técnicas utilizadas una mutación en el *CFTR* [52]. Luego, la prevalencia de la enfermedad fue estimada por Cardoso y *et al.* en el año 2004, a partir de los datos de frecuencia génica reportados por Luzardo y la frecuencia de heterocigotos de pF508del en 500 individuos sanos estudiados, obteniendo un valor de 1/9600 [53].

Las dificultades presentadas para confirmar el diagnóstico de FQ a nivel molecular en el mundo, también se presentan en Uruguay. El Instituto de Genética Médica (IGM) con su experiencia en el diagnóstico de enfermedades desde 1975, incluye en su base de datos cerca de 100 pacientes con posible diagnóstico de FQ. En su práctica en el diagnóstico de FQ, el IGM también ha evidenciado esta situación [54]. Se han presentado individuos con fenotipo no clásico de FQ, con una concentración de cloruro en el sudor normal o umbral, lo que dificulta precisar o confirmar el diagnóstico mediante la evidencia de disfunción del *CFTR*. Luego, al no encontrarse disponible en nuestro país el estudio que mide la diferencia de potencial transepitelial nasal, resulta difícil evidenciar la disfunción del canal. Al estudiar el defecto a nivel molecular mediante la secuenciación de los exones y límites exón/intrón del gen *CFTR*, en un gran número de pacientes con fenotipo clínico de FQ no clásica no se encontraron mutaciones causantes de enfermedad, si bien esta es la técnica con mayor cobertura, dentro de las disponibles con fines diagnósticos. Sin embargo, se encontraron en algunas ocasiones mutaciones de consecuencia clínica desconocida, asignadas en la base de datos *CFMDB* como variaciones neutras o potencialmente polimórficas. Estudios realizados en nuestro país avalan también esta situación [52].

La información disponible de FQ es más rica en los restantes países de Latinoamérica que en nuestro país, sin embargo, debido a diferencias en composiciones étnicas, es difícil comparar los resultados de poblaciones conocidas con los de Uruguay. Los latinoamericanos principalmente son una combinación de tres poblaciones: Amerindios, Africanos y Caucásicos. Las características genéticas de poblaciones mezcla de Latinoamérica varían a lo largo de todo el continente de acuerdo a la localización, origen de los inmigrantes caucásicos y africanos, y la distribución de los amerindios. Debido a que FQ se trata de la enfermedad recesiva más frecuente en Caucásicos, profundas investigaciones se han realizado en el hemisferio norte. Nuevamente, si bien está disponible información de frecuencias génicas en grupos europeos, claramente no es extrapolable a nuestra población: la población uruguaya está compuesta principalmente por caucásicos (86% o más) con un 6-11% individuos descendientes de africanos y un 1-2% de individuos descendientes de amerindios [55].

El escaso conocimiento epidemiológico de FQ en nuestro país es un problema actual en la salud. Su impacto se evidencia en las dificultades en el diagnóstico molecular, donde se maximiza el número de mutaciones estudiadas con el fin de asegurar que la mayoría de los alelos causantes de enfermedad se encuentren considerados, haciendo más compleja la interpretación del análisis molecular. Adicionalmente, causa que la sensibilidad clínica que se estima del estudio (proporción de individuos con FQ que tienen un estudio molecular positivo: con dos mutaciones causantes de enfermedad), si bien es aproximada, no sea precisa para nuestra población.

En suma, la FQ se trata de una enfermedad multi-orgánica con una evolución aterradora, la cual si bien ha podido ser paliada por las mejoras en el tratamiento, la supervivencia media en países donde el tratamiento está disponible es cercana a los 37 años. De acuerdo al registro de la AHFQMU, el número de individuos con FQ de Uruguay sería de 98 y su expectativa de vida no alcanzaría la obtenida en otras partes del mundo [51]. Es importante conocer la frecuencia génica de los alelos del *CFTR* causantes de enfermedad en nuestro país, dato sustancial para optimizar el diagnóstico, y el ofrecimiento de un tratamiento adecuado, mejorando el pronóstico del paciente y brindando asesoramiento genético en familias afectadas.

2. Objetivos

El interés de este trabajo es profundizar en el conocimiento de Fibrosis Quística en Uruguay, desde el punto de vista epidemiológico así como comprender el efecto de ciertas mutaciones en la funcionalidad del CFTR.

Nuestro objetivo es contribuir con información que permita diseñar un algoritmo de diagnóstico molecular para FQ en Uruguay y con herramientas que asistan a entender cuáles variaciones de las encontradas en individuos con fenotipo de FQ son causantes de enfermedad y cuáles se tratan de variaciones sin consecuencias funcionales. A su vez, evaluar la posibilidad que mutaciones sinónimas alteren la funcionalidad del CFTR y generen FQ. Disponer de estas herramientas permitirá conocer mejor estas mutaciones y a largo plazo, contribuir a mejorar el diagnóstico, tratamiento, pronóstico y asesoramiento genético de FQ.

Para alcanzar este fin, nuestros objetivos específicos son:

- i. Estimar la frecuencia de mutaciones de Fibrosis Quística más frecuentes en Uruguay, distinguiendo entre las distintas presentaciones de la enfermedad. Este objetivo se completará en tres etapas:
 - a. Acceso a la base de datos de Fibrosis Quística del Instituto de Genética Médica, que contiene información clínica, paraclínica y molecular. Relevar los datos de frecuencia génica de alelos del *CFTR* causantes de enfermedad distinguiendo en las distintas presentaciones de Fibrosis Quística.
 - b. Recabar datos de individuos afectados con Fibrosis Quística en otros centros diagnósticos de Uruguay, con el fin de completar esta información.
 - c. Comparar los datos de frecuencia alélica de mutaciones causantes de enfermedad en individuos afectados de Uruguay con respecto a registros a nivel regional y mundial.
- ii. Analizar el uso de codones en *CFTR* con el fin de predecir, en un marco teórico, sitios donde mutaciones sinónimas podrían comprometer la funcionalidad del canal.
- iii. Diseñar y poner en marcha un sistema experimental que permita evaluar el efecto de alteraciones en el *CFTR* en la localización de la proteína en células de mamífero. En la puesta a punto se analizarán: 1) mutaciones causantes de FQ, de defecto bioquímico/celular conocido 2) variantes portadoras de mutaciones sinónimas interesantes, según lo predicho a partir del análisis teórico. Además, se propondrán variantes a ser analizadas en un futuro.

3. Materiales y métodos

3.1 Estimación de las mutaciones más frecuentes de Fibrosis Quística en Uruguay

3.1.1 Análisis de la base de datos de FQ del Instituto de Genética Médica

Una muestra de 69 pacientes, no relacionados, fue seleccionada de un grupo de 172 individuos derivados al IGM desde enero del año 2006 a mayo del 2012, para estudio molecular del *CFTR*. Estos pacientes fueron derivados por renombradas instituciones de la salud de nuestro país: Banco de Previsión Social (BPS), Salud Pública, Sindicato Médico del Uruguay (CASMU), Servicio Médico Integral (SMI), Sociedad Universal, Casa de Galicia y FEMI (Federación Médica del Interior integrada por cooperativas médicas del interior del País).

Individuos que presentaron uno o más de los siguientes síntomas fueron incluidos:

- i. enfermedad respiratoria asociada a FQ, definida por la presencia de cultivos de esputo positivo para *Pseudomonas aeruginosa*, bronquiectasias, tos crónica, neumonía, enfermedad reactiva de la vía aérea, resultados anormales de la función pulmonar, sinusitis crónica, y pólipos nasales
- ii. malformaciones de los conductos *Vas Deferens*
- iii. enfermedad gastrointestinal, definida por valores fecales de grasa (medidos por el test de *Van de Kamer*), prolapso rectal o episodios recurrentes de pancreatitis.

Para cada individuo, se registraron los resultados de estudios de funcionalidad del *CFTR* (test del sudor y diferencia de potencial nasal). Muy pocos individuos presentaron el estudio de la diferencia de potencial transepitelial nasal, dado que no se encuentra disponible en nuestro país.

La “secuenciación parcial” del gen *CFTR* involucra la secuenciación de los exones 3, 4, 5, 6, 8, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 20, 22, 23 y 24 y las regiones colindantes exón-intrón, mientras que en la secuenciación de toda la región codificante se secuencian los 27 exones y las regiones colindantes exón-intrón. En ambos casos, el ADN genómico fue extraído según Grimberg *et al.* a partir de sangre periférica, se amplificó por PCR y se realizó secuenciación bidireccional de cada amplicón utilizando oligonucleótidos marcados (Applied Biosystems). Las secuencias resultantes fueron analizadas por electroforesis capilar automática (ABI 310, Applied Biosystems) [56]. Todo este trabajo fue realizado por el equipo de Biología Molecular del IGM.

Se aplicó el algoritmo de diagnóstico adaptado de De Boeck *et al.* (Figura 5) [5]. En función de la presentación clínica, estudios paraclínicos y resultado molecular, los posibles diagnósticos de los pacientes fueron clasificados en *FQ*, *Disfunción del CFTR (FQ no clásica)* y *Desórdenes*

Asociados al CFTR), *Inconcluso* y *FQ poco probable* (Figura 5). Para aquellos individuos que no fueron vistos clínicamente en el IGM, y por lo tanto no se tiene acceso a información clínica y paraclínica, se contactaron los médicos que derivaron a los pacientes al IGM, se accedió a la historia clínica, y se completó la información restante.

Individuos con AVD fueron identificados en los grupos *Inconcluso* y *Disfunción del CFTR*. AVD fue diagnosticado en hombres con: azoospermia, ausencia del *Vas Deferens* (determinada por el médico tratante) y una mutación identificada en uno o los dos alelos del *CFTR*, tal como sugiere la base de datos OMIM [17].

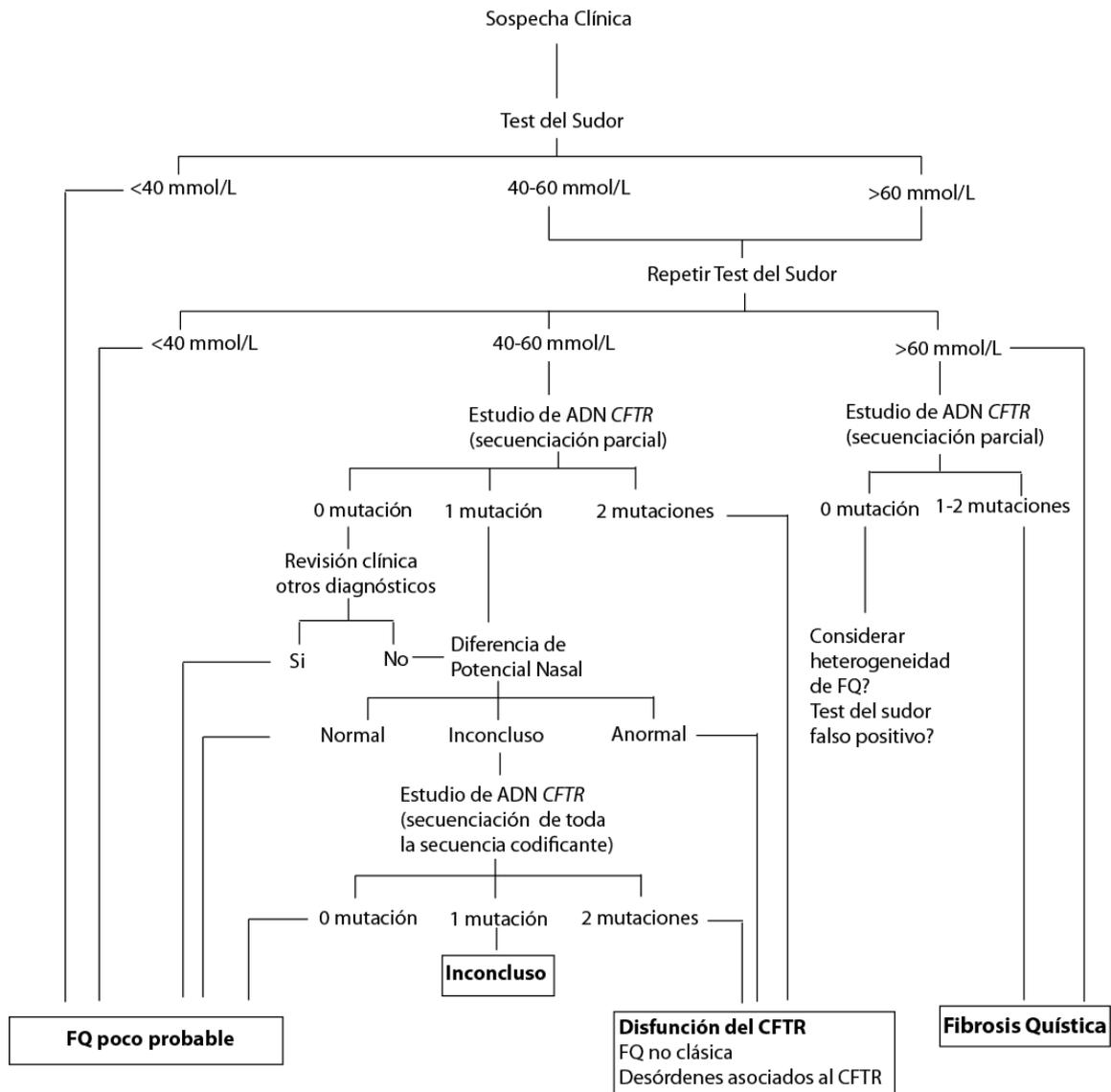


Figura 5. Algoritmo de diagnóstico de FQ a partir de información clínica y test del sudor. Adaptado de Boeck *et al* [5, 6].

3.2 Análisis del uso de codones del gen CFTR.

3.2.1 Organismos y secuencias

Las secuencias codificantes del *CFTR* de los siguientes primates fueron descargadas de *NCBI GenBank Database*, utilizando la herramienta *PROTEIN PSI-BLAST*: *Aotus nancymae*, *Ateles geoffroyi*, *Callicebus moloch*, *Callithrix jacchus*, *Cercopithecus aethiops*, *Colobus guereza*, *Gorilla gorilla*, *Homo sapiens*, *Lemur catta*, *Macaca fascicularis*, *Macaca mulatta*, *Macaca nemestrina*, *Microcebus murinus*, *Nomascus leucogenys*, *Otolemur garnettii*, *Pan troglodytes*, *Papio anubis*, *Pongo abelii* (Tabla 4) [20]. Las secuencias traducidas fueron alineadas utilizando el programa *ClustalW* y luego analizadas a nivel aminoácido y nucleotídico [57].

Tabla 4. Secuencias del *CFTR* analizadas. Las secuencias fueron descargadas de la base de datos Genbank [20].

Organismo	Número de Acceso	
	Proteína	Nucleótido
<i>Aotus nancymae</i>	ABJ08890.1	DP000197.1
<i>Ateles geoffroyi</i>	ABI75275.1	DP000177.1
<i>Callicebus moloch</i>	ABB89795.1	DP000019.1
<i>Callithrix jacchus</i>	ABA90397.1	DP000014.2
<i>Cercopithecus aethiops</i>	ABC87491.1	DP000029.1
<i>Colobus guereza</i>	ABJ08857.1	DP000193.1
<i>Gorilla gorilla</i>	ABC87455.1	DP000025.1
<i>Homo sapiens</i>	NP_000483.3	NM_000492.3
<i>Lemur catta</i>	AAY88996.1	DP000004.1
<i>Macaca fascicularis</i>	AAF80467.1	AH009552.1
<i>Macaca mulatta</i>	AAC14011.1	AF013753.1
<i>Macaca nemestrina</i>	AAD46905.1	AH008050.1
<i>Microcebus murinus</i>	ABB89826.1	DP000022.2
<i>Nomascus leucogenys</i>	ABJ08867.1	DP000194.1
<i>Otolemur garnettii</i>	ABA90408.1	DP000013.2
<i>Pan troglodytes</i>	NP_001073386.1	NM_001079917.1
<i>Papio anubis</i>	NP_001106085.1	NM_001112615.1
<i>Pongo abelii</i>	ABC87466.1	DP000026.2
<i>Saimiri boliviensis</i>	ABI75310.1	DP000180.1

3.2.2 Tablas de uso de codones

Las tablas de uso de codones fueron construidas para todos los primates cuyas secuencias codificantes (CDSs) curadas y con identificación acorde a *HUGO Gene Nomenclature*

Committee (HGNC) estaban disponibles en la versión 58 de la base de datos *Ensembl* [58]. Las secuencias fueron descargadas a través del sistema de manejo de información *Biomart* [59]. Las secuencias repetidas o conteniendo codones de terminación internos fueron descartadas. Las Tablas de uso de codones fueron construidas con el siguiente número de CDSs: *C. jacchus*, 10556; *G. gorilla*, 11805; *H. sapiens*, 14872; *M. mulatta*, 10143; *M. murinus*, 10303; *O. garnettii*, 9786; *P. troglodytes*, 10579; *P. abelii*, 9344.

3.2.3 %MinMax

La frecuencia relativa de codones en las secuencias de *CFTR* fue calculada con el algoritmo %MinMax [60]. Este algoritmo se aplicó en una ventana deslizante de 18 codones y reporta un valor para cada ventana con un mínimo de -100, cuando todos los codones analizados en la ventana son los más raros para cada aminoácido, y un máximo de 100, cuando todos los codones utilizados son los más frecuentes para la secuencia aminoacídica. La Figura 6 esquematiza el cálculo del algoritmo %MinMax. La salida de cada ecuación %MinMax es, por definición, siempre positiva. Si las frecuencias de uso de codones para una ventana dada son mayores que el promedio, se otorgará un valor para %Max, si es menor que el promedio, un valor será dado para %Min (una ventana puede dar sólo un valor para %Max o %Min, pero no para ambos). Por claridad, valores %Min son graficados y reportados como valores negativos.

Una ventana fue definida como enriquecida en codones raros si el resultado de %MinMax se encontraba por debajo del promedio de %MinMax del organismo menos un desvío estándar (SD) (calculado a partir de todas las ventanas del organismo). De igual manera, una ventana fue considerada enriquecida en codones frecuentes cuando %MinMax se encontraba por encima del promedio de %MinMax más un SD. Ventanas consecutivas con el mismo sesgo fueron consideradas que definen un *cluster*. Ventanas no consecutivas fueron consideradas que forman un *cluster* si parte de la secuencia de la primer ventana se encontraba contenida en la segunda. Ventanas de %MinMax fueron consideradas conservadas cuando se presentaba la misma tendencia de enriquecimiento en los ocho organismos con tablas de uso de codones disponibles.

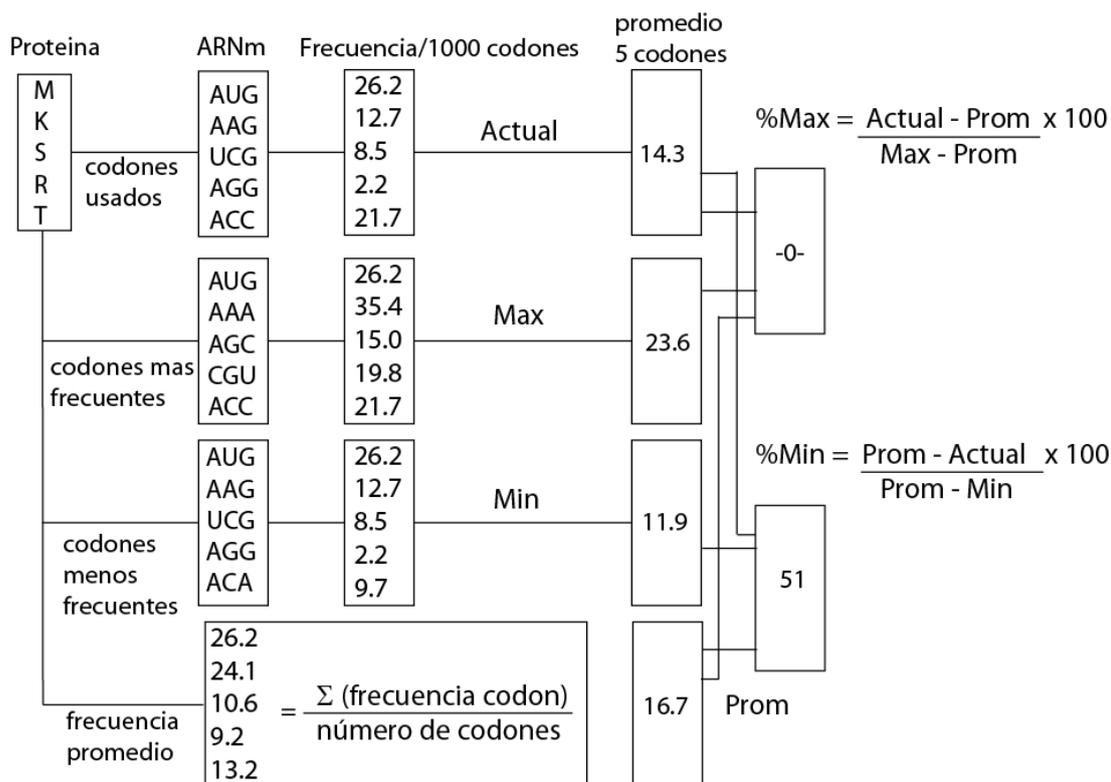


Figura 6. Algoritmo %MinMax para un péptido MKSRT. Para cada codón tres frecuencias relativas fueron tabuladas, utilizando las tablas de uso de codones construidas (i) la frecuencia con la cual el codón es utilizado en el genoma del organismo (Actual), (ii) la frecuencia de uso del codón más frecuente codificante para ese aminoácido (Max) y (iii) la frecuencia de uso del codón menos frecuente codificante de ese aminoácido (Min). La frecuencia promedio (Prom) también fue calculada para cada aminoácido. Estas cuatro frecuencias de uso fueron utilizadas para calcular %Max y %Min con las ecuaciones mostradas. Un valor %Min de 51 significa que esta secuencia está aproximadamente en la mitad entre la secuencia más rara y la secuencia promedio y es graficada como -51.

3.2.4 Evolución molecular (dS)

Las distancias sinónimas (dS) fueron estimadas en una ventana deslizante de 18 codones utilizando el programa *Codeml*, incluido en PAML 4.0 [61]. La dS representa el número de sustituciones sinónimas por sitio sinónimo. Para las ventanas deslizantes, implementamos modelos de codones específicos de rama (modelo = 2) permitiendo que grupos de ramas específicos tengan distintos valores de dN/dS. Se construyó un cladograma basado en información taxonómica para los 19 primates utilizando la plataforma del sitio *ItoI* [62]. Valores totales de dS (determinados por la suma del largo de dS para todas las ramas del grupo) fueron obtenidos para los tres grupos monofiléticos: *Catarrhini*, *Platyrrhini* y *Lemuriformes*. Una secuencia incluida en una ventana fue definida como restringida en cambios sinónimos cuando el valor estimado de dS se encontraba por debajo del promedio del gen para cada uno de los tres grupos monofiléticos.

3.3 Diseño de un sistema cuantitativo para evaluar la localización sub-celular del CFTR.

3.3.1 ADNc de CFTR humano

El ADN copia (ADNc) de CFTR humano (*CFTR*) fue otorgado por el Dr. Pablo Artigas (*Texas Tech University, Health Sciences Center, School of Medicine*), clonado en el plásmido de expresión pGEMHE. *CFTR* presenta la secuencia consenso de según *Genbank* (NM_000492.3) [20].

3.3.2 Diseño de oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados según la secuencia consenso de *CFTR* (NM_000492.3). La Tabla 5 muestra la secuencia de cada oligonucleótido empleado y su aplicación.

Tabla 5. Diseño de oligonucleótidos. Se muestra nombre, secuencia y aplicación de cada oligonucleótido utilizado.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Aplicación
CFTR forward	CTCGAGCTATGCA GAGTCCCTCTGG	Amplificación CFTR
CFTR reverse	CTGCAGCTAAAGCCTTGATCTTGCACCTC	Amplificación CFTR
EGFP-Fw	ACTA CCTGAGCACCCAGT	Secuenciación CFTR
Sec2	TCTAGGCATAGCCTTATGCC	Secuenciación CFTR
sec3	AACTGACTCGGAAAGCAGCC	Secuenciación CFTR
sec4v2	CTCATGGGATGTGATCTTTTCG	Secuenciación CFTR
sec5	CAGGCAACTTGACTGAACTGG	Secuenciación CFTR
sec6	ATGACCTTCTGCCTCTTACC	Secuenciación CFTR
sec7	CAGTTATCTAGATCCGGTGGATCC	Secuenciación CFTR
endrev2	TGCTTGTGGCCATGGCTTAGG	Secuenciación CFTR
endrev	AGGACAGTTGTGGCGGTTGC	Secuenciación CFTR
forward_R75_cluster1 (ronda 1)	CTAAACTCATTAA TGCCCTTCGGAGA TGTTTTCTGGAGATTTATG	Mutagénesis cluster 1 ronda 1
reverse_R75_cluster1 (ronda 1)	CATAAATCTCCAGAAAACATCTCCGAAAGGCATTAA TGAGTTTAG	Mutagénesis cluster 1 ronda 1
forward_L88L90_cluster1 (ronda 2)	GGAGATTTATGTTCTATGGAATCTTCTGTACTGGGGAAAGTCA CCAAAGCAGTACAG	Mutagénesis cluster 1 ronda 2
reverse_L88L90_cluster1 (ronda 2)	GCTGTA CTGCTTTGGTACTCCCCAGATACAGAAAGATTCCATAGAACAATAATCTC	Mutagénesis cluster 1 ronda 2
forward_R170L172I175_cluster2	GAAGACTTTAAAGCTGTCAAGCAGAGTTCTGGATAAAATCAGTATTGGACAACCTGTT	Mutagénesis cluster 2
reverse_R170L172I175_cluster2	GGAGACTAA CAAGTTGTCCAATACTGATTTTATCCA GAACTCTGCTTGACAGCTTTAAA	Mutagénesis cluster 2
forward_L375_cluster4 (ronda 1)	GGAGCAATAAACAAAATACAGGATTTCTGCAAAAGCAAGAATATAAGACATTGG	Mutagénesis cluster 4 ronda 1
reverse_L375_cluster4 (ronda 1)	CCAATGCTTATATTCTGCTTTGCAGGAAATCCTGTATTTTGTATTGCTCC	Mutagénesis cluster 4 ronda 1
forward_L387T388_cluster4 (ronda 2)	CAAGAATATAAGACATTGGAATATAA CACTGACCCTACAGAAAGTAGTGATGGAGAAT	Mutagénesis cluster 4 ronda 2
reverse_L387T388_cluster4 (ronda 2)	GTTACATTCTC CATCACTACTTCTGTAGTGGTCAGGTTATATTCCAATGT	Mutagénesis cluster 4 ronda 2
forward_V392_cluster4 (ronda 3)	CCTGACCACTACAGAGTGGTGGAGAAATGTAACAGC	Mutagénesis cluster 4 ronda 3
reverse_V392_cluster4 (ronda 3)	GCTGTTACATTCTCATCA CCACTCTGTAGTGGTCAGG	Mutagénesis cluster 4 ronda 3
forward_L570L571_cluster6 (ronda 1)	GCAAGAGCAGTATACA AAGATGCTGATTTGTATCTGCTGGACTCTCTTTGGATACCT	Mutagénesis cluster 6 ronda 1
reverse_L570L571_cluster6 (ronda 1)	CATCTAGGTATCCAAAAGGAGAGTCCA GCAGATACA AATCAGCATCTTTGTACTGCT	Mutagénesis cluster 6 ronda 1
forward_L578L581_cluster6 (ronda 2)	GTATCTGCTGGACTCTCTTTGGATA CCTGGATGTTCTGACGAAAAA GAAATTTTG	Mutagénesis cluster 6 ronda 2
reverse_L578L581_cluster6 (ronda 2)	CACAGCTTCAAATA TTTCTTTTCTGTGAGAACCCAGGTATCCAAAAGGAGAGTCC	Mutagénesis cluster 6 ronda 2
forward_I586_cluster6 (ronda 3)	CCTGGATGTTCTGACGAAAAA GAAATCTTTGAAA GCTGTGTGTAAC	Mutagénesis cluster 6 ronda 3
reverse_I586_cluster6 (ronda 3)	GTTTACAGACACAGCTTCAAAGATTTCTTTTCTGTGAGAACATCCAGG	Mutagénesis cluster 6 ronda 3

3.3.3 Medida de la concentración de ADN

La cuantificación de ADN se realizó en el espectrofotómetro de gota ACTGene (tipo Nanodrop). La concentración de ADN se calcula a partir de la medida de su absorbancia (A) a 260nm, teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia corresponde a una concentración de 50µg/mL de ADN doble hebra. Para estimar la pureza de la muestra se determina también la A280 (longitud de onda a la que presentan un máximo de absorción las proteínas). Se considera que el ADN se encuentra en una pureza aceptable cuando se obtiene una relación de A260/A280 de 1,8 o superior.

3.3.4 Cultivo de bacterias

Los cultivos líquidos de bacterias se hicieron en medio LB (bactotripton 10g/L, extracto de levadura 5g/L, NaCl10g/L, pH 7,0). En el caso de bacterias transformadas con plásmidos portadores de marcadores de resistencia a ampicilina o kanamicina, se agregó al medio el antibiótico a una concentración de 50 – 100 µg/mL (en función del antibiótico utilizado). Las células transformadas con la reacción mutagénesis fueron crecidas en medio S.O.C (2% tripton, 0,5% extracto de levadura, 10mM de NaCl, 2,5mM de KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20mM glucosa). Las bacterias también se cultivaron en medio semisólido en placas de Petri con LB agar (1% bactotripton, 0,5% extracto de levadura, 0,17M NaCl, 1,5% agar) con 100 µg/ml de Ampicilina y 0.5mM IPTG y 80µg/ml X-Gal para las bacterias transformadas con pGEM-T Easy (Promega) y 50µg/mL de kanamicina para el vector pEGFP-C1. Los stocks de bacterias se conservaron a -80°C en medio LB suplementado con 15% de glicerol.

3.3.5 Transformación de células quimiocompetentes

Para la transformación, se utilizaron 50µL de células *DH5α competent cells subcloning efficiency* (Invitrogen) o *MAXEfficiency DH5α competent cells* (Invitrogen). Según indicaciones del proveedor, se agregó el ADN a la suspensión y se colocaron las células competentes durante 30 min en hielo. Luego de la incubación, se realizó un *shock* térmico de 45 seg a 42°C y luego en hielo por 2 min adicionales. Posteriormente, se agregaron 900 µL de medio LB (*DH5α subcloning efficiency*) o SOC (*MAXefficiency*) y se incubó a 37°C durante una hora con agitación. Se sembraron alícuotas de las células transformadas con rastrillo sobre placas de LB agar suplementadas con el antibiótico adecuado.

3.3.6 Ligación de fragmentos de ADN en vectores pGEM-T Easy y pEGFP-C1

Las reacciones de ligación se hicieron en una relación molar 2:1 de *CFTR* en relación con los vectores pGEM-T Easy o pEGFP-C1. Se incubó durante toda la noche (O.N) a temperatura ambiente (TA) con la enzima T4 DNA ligasa (Promega). Las bacterias competentes fueron

transformadas con un volumen equivalente a 1ng de plásmido ligado (diluído 1/5 en buffer Tris-HCl pH=7,5, EDTA 1mM).

3.3.7 Extracción de ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico en pequeñas cantidades se realizó por el método de lisis alcalina descrito anteriormente a partir de 3mL de cultivos de la cepa de *E. coli* transformada con el plásmido correspondiente [63]. Brevemente, se resuspendió el cultivo en fase estacionaria en buffer Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM y ARNasa 50µg/mL y se lisaron las células con una solución NaOH 0,2N, SDS 1%. Se neutralizó el pH de la solución con acetato de sodio 3M pH 4,8 y se centrifugó a 4°C y 12.000g durante 20 min conservando el sobrenadante. Luego se precipitó el ADN de la solución con el agregado de 0,7 volúmenes de isopropanol y se lavó el pellet con etanol 70%. Finalmente, se resuspendió el pellet en agua purificada por miliQ (generalmente 30µL).

Para las construcciones de GFP-wtCFTR y todos los mutantes generados se extrajo el ADN plasmídico a mayores concentraciones con el kit de *Maxiprep EndoFree Purification Maxi Kit* (Qiagen), según las indicaciones del proveedor. Con este *stock* se transfectaron las líneas celulares.

En todos los casos se evaluó la concentración y calidad de dicho ADN mediante espectrofotometría y se guardó a -20°C.

3.3.8 Electroforesis en gel de agarosa

Los fragmentos de ADN se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 0,8-1% (g/L) dependiendo del rango de tamaño de los fragmentos a separar. El gel fue preparado en tampón TAE 1x (TAE 10x: Tris-HCl 0,4M, EDTA 50mM pH 8,0, ácido acético hasta pH 7,2) conteniendo 0,05 µl de GoodView (SBS Genetech, China) por cada mL de agarosa. El gel fue corrido a 90V en buffer TAE. Para la visualización de los geles se utilizó un transiluminador UV.

3.3.9. Generación de la construcción GFP-wtCFTR.

3.3.9.1. Amplificación del CFTR a partir de pGEMHE por PCR.

El protocolo de PCR fue ajustado de acuerdo a las indicaciones del proveedor de la enzima *Pfu Ultra High-Fidelity* DNA polimerasa (Agilent Technologies, Inc.), así como las condiciones del ciclado de acuerdo a los oligonucleótidos *CFTRForward* y *CFTRreverse* utilizados (Tabla 5) que contienen colas con sitio de restricción de las enzimas *XhoI* (5'CTCGAG3') y *PstI* (5'CTGCAG3'), respectivamente.

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ L conteniendo una mezcla de: 1x PfuUltra HF reaction buffer, 250 μ M de cada dNTP, 0,4 μ M de cada oligonucleótido, 1 Unidad de PfuUltra HF ADN polimerasa, 2,5 μ L de ADN de una dilución 1/100 del plásmido pGEMHE en agua ultrapura. Las condiciones de la amplificación fueron: 95°C durante 4 minutos, 32 ciclos de 95°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto, 72°C durante 4,5 minutos y 72°C durante 10 minutos. Luego de la amplificación, la mezcla de reacción fue analizada por electroforesis en gel de agarosa 0,8 % y su peso molecular fue determinado comparándolo con el marcador de peso molecular (MPM) Fermentas GeneRuler 1kb Mix (Fermentas Life Technologies).

3.3.9.2. Clonado de CFTR en pGEM-TEasy.

El producto de PCR de *CFTR* fue purificado de la reacción con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Estados Unidos) de acuerdo a las indicaciones del proveedor. El vector pGEM-T Easy se encuentra linearizado con una única timina terminal en los extremos 3' del vector. El amplicón de *CFTR* fue incubado 30 min a 72°C con la enzima *UTaq* para la incorporación de un nucleótido de adenina en el extremo 3' (SBS Genetech Corp.). Luego de la ligación, las colonias candidatas a presentar el inserto se seleccionaron de acuerdo al criterio blanco/azul. La presencia del fragmento de *CFTR* fue evaluada mediante PCR de *CFTR* (según punto 3.3.9.1) y por digestión del plásmido con las enzimas *XhoI* (Fermentas) y *PstI* (New England Biolabs) en condiciones según las proporcionadas por el fabricante.

3.3.9.3 Subclonado de CFTR en pEGFP-C1

El plásmido pEGFP-C1 fue provisto por el Dr Agrelo (Institut Pasteur Montevideo). Éste presenta la secuencia codificante de una variante de la proteína fluorescente *Green Fluorescent Protein* (GFP). Al digerir pEGFP-C1 con las enzimas *XhoI* y *PstI* e insertar a *CFTR* en esa posición, se obtiene la proteína de fusión GFP-CFTR (Figura 7).

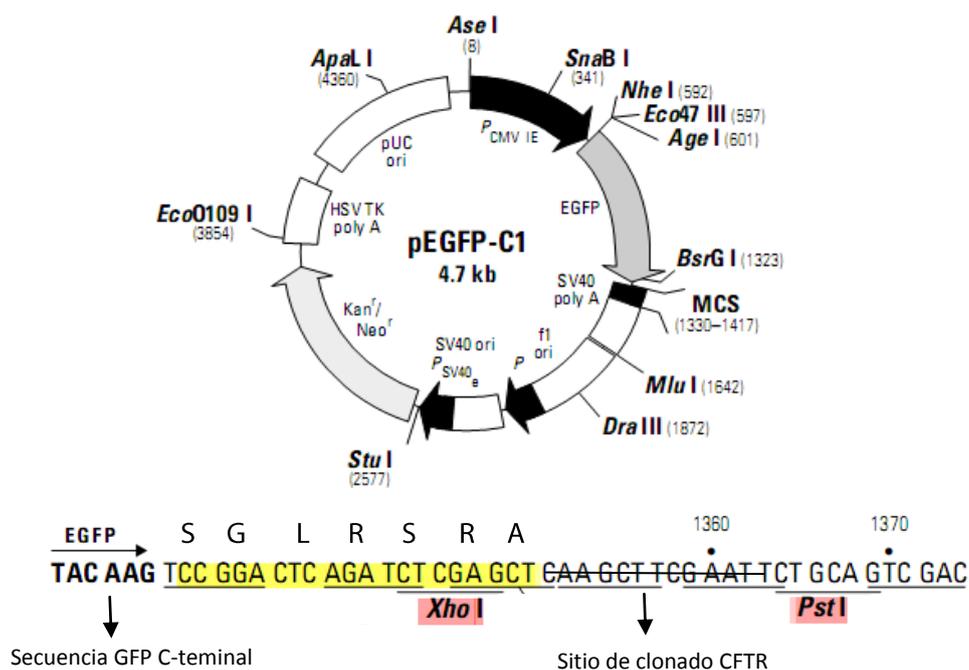


Figura 7. Mapa del vector pEGFP-C1. Se muestra la secuencia terminal de EGFP, y en amarillo la secuencia codificante del linker de 7 aminoácidos. Mediante el corte con las enzimas *XhoI* y *PstI* se inserta a *CFTR* en pEGFP-C1.

Los plásmidos pGEM-T-CFTR y pEGFP-C1 fueron digeridos con las enzimas *XhoI* (Fermentas) y *PstI* (New England Biolabs) según las indicaciones del fabricante. Ambas reacciones fueron corridas en gel de agarosa y las bandas correspondiente al plásmido pEGFP-C1 lineal y el inserto CFTR liberado de pGEM-T fueron purificadas con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Estados Unidos) de acuerdo a las indicaciones del proveedor. *CFTR* fue ligado al plásmido pEGFP-C1 y se confirmó la presencia del inserto *CFTR* en pEGFP-C1 por digestión con las enzimas *XhoI* y *PstI*, por PCR de *CFTR* y por secuenciación.

3.3.10 Mutagénesis

Los mutantes pF508del, cluster1, cluster2, cluster4, cluster6 fueron generados por mutagénesis dirigida a partir de la construcción GFP-wtCFTR. Los cebadores fueron diseñados de acuerdo al kit QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Agilent Technologies) (Tabla 5).

En los casos que la generación de los mutantes involucró varios cambios cercanos, éstos fueron generados mediante rondas de mutagénesis sucesivas. Para los mutantes cluster4 y cluster6, se hicieron tres rondas de mutagénesis, para el cluster1, dos rondas y el cluster2 y pF508del una única reacción. Una vez que fue confirmada por secuenciación la incorporación de la mutación, se procedió a la siguiente reacción de mutagénesis. Los oligonucleótidos de las

rondas sucesivas fueron diseñados considerando las mutaciones incorporadas en la reacción anterior.

El protocolo de PCR fue ajustado de acuerdo a las indicaciones del proveedor de la enzima Phusion High-Fidelity DNA polimerasa (Finnzymes, New England Biolabs). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L conteniendo una mezcla de: 1x Phusion HF buffer, 250 μ M de cada dNTP, 200ng de cada oligonucleótido, 1 Unidad de Phusion ADN polimerasa, 150ng de ADN molde. Las condiciones de la amplificación fueron: 95°C durante 30 segundos, 18 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 18,4 minutos. 10 μ L de la reacción fueron digeridos con la enzima *DpnI* Fast Digest (Fermentas Life Sciences) según indicaciones de fabricante y se transformaron células de alta eficiencia de transformación MaxEfficiency DH5 α Competent Cells (Invitrogen). Se confirmó la presencia de las mutaciones de interés por secuenciación de la región de interés y una vez terminadas todas las rondas de mutagénesis, se secuenció toda la construcción GFP-CFTR.

3.3.11 Secuenciación

Los productos de PCR así como los plásmidos, fueron secuenciados por el servicio de secuenciación automática (Institut Pasteur de Montevideo). Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en un secuenciador automático ABI3130 (Applied Biosystems). Las secuencias se revisaron manualmente y se editaron con el programa BioEdit versión 7.0.5.3.

3.3.12 Líneas celulares

MDCK: Madin-Darby canine kidney tipo II. Línea celular derivada de túbulo proximal de riñón canino.

16HBE14o⁻: Línea celular derivada de epitelio bronquial humano. Mantiene varias características de células epiteliales bronquiales diferenciadas.

Las dos líneas celulares fueron crecidas en medio Mínimo de Eagle (MEM) (Sigma-Aldrich) suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich) (MDCK 5%, 16HBE14o⁻ 10%), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich) e incubadas a 37°C con 5% de CO₂.

3.3.13 Metodologías estándar de cultivo de células

Cambio de medio

El medio fue removido 2 veces por semana, bajo condiciones de esterilidad, con la precaución de no tocar la monocapa con la pipeta. Se agregó nuevo medio de cultivo el cual fue precalentado a 37 °C.

Pasajes de líneas celulares

Se removió el medio de cultivo que cubre la monocapa, y se lavó con 1 ml de solución de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich), moviendo suavemente en forma ondulante, y se aspiró el exceso. Luego se agregó 1 mL de tripsina-EDTA, y se incubó a 37°C y 5% de CO₂ en un rango 10-20 minutos dependiendo de la línea celular. Se observó al microscopio el completo desprendimiento de las células, y se agregó medio para inactivar la acción de la tripsina. Se centrifugó 3 minutos a 400g. Al precipitado se le agregó medio suficiente de manera que permita distribuir las células en los siguientes subcultivos. Se repartieron las células en nuevas placas con el medio de crecimiento de acuerdo al volumen del soporte que se está utilizando. Se colocaron las placas en la estufa a 37°C y 5% de CO₂.

Criopreservación

Se preparó una placa de 10 cm de diámetro de un cultivo joven con una monocapa completa. Se desprendieron las células con tripsina y se resuspendieron en 5 ml de medio de cultivo con SFB. Luego de centrifugar 3 minutos a 400g, se removió el sobrenadante y el pellet se resuspendió con SFB con 5% Dimetil Sulfoxido (DMSO), el cual fue previamente enfriado a 4°C. Se congeló a -80°C durante toda la noche y luego se colocó a -196°C, tanque de nitrógeno líquido donde se mantuvieron almacenadas para futuras experiencias.

Descongelado de células

Se sacó el criotubo del nitrógeno líquido y rápidamente se colocó en agua a 37°C. Bajo flujo, se abrió el criotubo y agregaron las células a un tubo con medio MEM para lavarlas y quitarles el DMSO. Luego de centrifugar 3 minutos a 400g, se resuspendió el pellet en MEM con 5% de SFB y se colocó en la placa. Se llevó a estufa a 37°C y 5% de CO₂.

3.3.14 Inducción de la polarización de la monocapa

Para inducir la diferenciación en células epiteliales polarizadas, éstas fueron crecidas en filtros permeables (*transwells*). Los filtros permeables permiten la llegada diferencial de medio de cultivo a toda la superficie de la membrana celular, permitiendo a las células la toma y secreción de moléculas tanto en su superficie apical, como basolateral y por consiguiente, llevar a cabo las actividades metabólicas de una manera más natural.

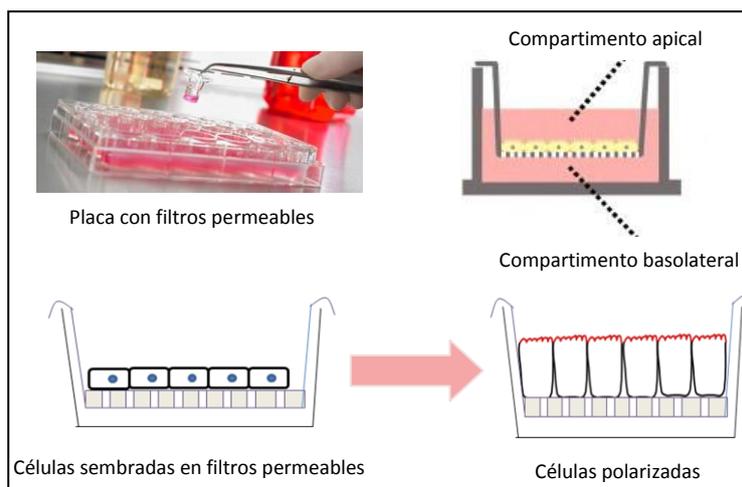


Figura 8. Esquema de filtros permeables utilizados. Se muestran los dos compartimientos y como el crecimiento de las células sobre el filtro permeable contribuye a la polarización.

Para la polarización de las líneas celulares se utilizaron filtros de policarbonato de 12mm de diámetro con $0,4\mu\text{m}$ de diámetro de poro, contenidos en placas de 12 pocillos (Transwell® Permeable Supports, Corning Fisher, New York, Estados Unidos).

Una vez desprendidas las células (de la placa de mantenimiento) con el tratamiento con tripsina-EDTA y resuspendidas en medio de cultivo, una alícuota de éstas fue sembrada en la cámara de *Neubauer* y el número de células fue contado al microscopio, de manera de poder sembrar un número conocido por filtro permeable. Previamente, se agregó un volumen de medio de tal manera que el volumen final sea $500\mu\text{L}$ en el compartimiento apical y $1500\mu\text{L}$ en el compartimiento basolateral. Para MDCK se sembraron $4,5 \times 10^5$ células por filtro, las cuales fueron fijadas a las 72hs. Para 16HBE14o⁻, se sembraron 1×10^5 células, fijadas a los 7 días. Luego de sembradas, se agitó la placa para asegurar la distribución homogénea de las células en el filtro. El medio fue cambiado tal como en placas de mantenimiento.

3.3.15 Evaluación de localización de pF508del en células extendidas.

Para poder evaluar la localización del mutante pF508del, 1×10^5 células MDCK fueron sembradas en cubreobjetos circulares (Thermo Scientific Microscope Cover Glass #1) contenidos en pocillos.

3.3.16 Transfección de GFP-CFTR

Todas las construcciones de GFP-CFTR fueron incorporadas a las células mediante transfección con Lipofectamina 2000 en medio Opti-MEM (Invitrogen) 24hs previo a fijar las células. Previo a la transfección, se le cambió el medio a las células crecidas en filtros permeables o en placas

con MEM y SFB. Se preparó una mezcla de 1µg de la construcción plasmídica con 200µL de Opti-MEM y 6µL de Lipofectamina 2000 con 200µL de Opti-MEM, se agitaron suavemente y se dejaron incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se mezclaron los dos volúmenes y se incubaron 20 minutos para que se formen los complejos Lipofectamina-ADN. De esta mezcla, se le agregó 100µL al compartimiento apical y 300 µL al compartimiento basolateral. Se agitó vigorosamente para asegurar la dispersión de los complejos en toda la superficie. Se incubó durante 6hs a 37°C y 5% CO₂ y luego se le cambió el medio por MEM con SFB y antibiótico. Se incubó a 37°C y 5% CO₂ hasta el día siguiente. En el experimento de evaluación de la restauración de pF508del en la membrana apical, las células fueron incubadas luego de la transfección a 27°C por 24hs.

3.3.17 Inmunofluorescencia

Al día siguiente a la transfección, la membrana fue lavada tres veces con buffer PBS 1X (MgCl 288,5 mM, KCl 0,2g/L, KH₂PO₄ anhidro 0,2g/L, NaCl 8g/L, Na₂HPO₄ 1,15g/L pH=7,4) a TA. Se fijó con para-formaldehído 4% en PBS 30 minutos a TA. Se permeabilizó con Tritón X100 0,1% en PBS, 15 min a 37°C. Se bloqueó con 0,7% de Fish Skin Gelatin (FSG) en PBS, 1 hora a 37°C. Se incubó con anticuerpo primario diluído apropiadamente en FSG ON a 4°C. Para el marcaje de la membrana apical, se utilizó anti-gp135 (ratón) y el de la basolateral se hizo con anti-p58 (ratón) ambos en una dilución 1/3000. El retículo endoplásmico fue marcado con el anticuerpo anti-calnexina (conejo) (ab10286, Abcam) a una dilución 1/200. Luego, se incubó con una dilución 1/1000 del anticuerpo secundario anti-ratón (Invitrogen) o anti-conejo (Invitrogen) (ambos conjugados con tetrametilrodamina) en FSG 0.7%, 1 hora a 37°C. Finalmente se incubó 15 minutos a TA con TO-PRO 3 (Invitrogen) diluído 1/500 en PBS. Todos los pasos fueron separados con tres lavajes con PBS 1X (previo al bloqueo) o FSG 0,7% (posterior al bloqueo).

Los portaobjetos fueron limpiados con alcohol 70% previo a su uso. Se hicieron dos líneas con esmalte de manera de generar una cámara donde podrá colocarse la membrana cortada y luego sumergirla en medio de montaje. Se cortó la membrana con bisturí en forma de cuadrado, se sumergió en agua. Se colocó la membrana en la cámara con la cara apical hacia arriba y se agregaron 13µL de medio de montaje ProLong® Gold antifade reagent (Invitrogen) y el cubreobjeto (Menzel-Glaser 24X40mm #1) pre-limpado cubriendo el filtro. Se dejó curar el medio de montaje por 24hs y se visualizaron al otro día en el microscopio confocal.

3.3.18 Adquisición de imágenes por microscopía confocal de fluorescencia.

Las muestras fueron examinadas por microscopía confocal utilizando el microscopio Leica TCS-SP5 y un objetivo HCX PL APO 63x/NA1.40 CS aceite.

Tamaño de pixel: Las imágenes fueron registradas a valores menores de la tasa Nyquist (43nm lateral and 130nm axial) para evitar *aliasing*. Esto se logró con un zoom adicional 8X y una resolución de la imagen de 1024X1024 pixels. Los *stacks* confocales fueron adquiridos con una separación en el eje z de 0,126 μm , alcanzando un voxel con tamaño final de 0,030 μm (lateral) y 0,126 μm (axial).

Adquisición imagen: Se utilizaron los láseres 488 y 543 en un canal y el láser 633 en otro. La fluorescencia emitida por la excitación con el láser 633 no fue registrada, por lo que incorporar a los láseres 488 y 543 en el mismo canal, disminuyó el tiempo de adquisición de la imagen. Dado que los espectros de emisión y excitación de los fluoróforos utilizados se solapan (ver Figura 9), la longitud de onda a amplificar por los fotomultiplicadores fue ajustada de tal manera de maximizar la especificidad de la señal detectada en cada caso. Como la tetrametilrodamina es excitada a 488nm, y emite desde 540nm, el rango de longitudes de onda a amplificar por el fotomultiplicador de GFP-CFTR fue ajustado a 503-540 nm. Análogamente, para el fotomultiplicador de tetrametilrodamina se consideró que GFP excitado por el láser 488 emite en el rango de emisión de la tetrametilrodamina y TO-PRO 3 es excitado a 543 (Figura 9). Ambos factores acotaron el rango de longitudes de onda a amplificar por el fotomultiplicador de tetrametilrodamina a 600-630 nm. Finalmente, el fotomultiplicador que detecta la señal de TO-PRO 3 se fijo para longitudes de onda mayores a 650nm.

El voltaje del fotomultiplicador, la intensidad del láser y el valor del *offset* fueron ajustados de tal manera de concordar los valores de intensidades de píxeles disponibles con el rango 0 – 255 en la escala de 8 bits utilizada. En la adquisición de la imagen, el valor presentado por pixel fue producto de un promedio 6 escaneos en línea y en campo. Este ajuste aumentó el valor de la relación señal/ruido de la imagen. Las imágenes fueron tomadas con una apertura de *pinhole* correspondiente a una unidad *airy* (95,5 μm de ancho).

Para evaluar la eficiencia de transfección, se fotografiaron 10 planos xy al azar utilizando el objetivo HC PL APO CS 20x/N.A0.70 aceite del microscopio de epifluorescencia. Se contó el número de células transfectadas por número de células capturadas.

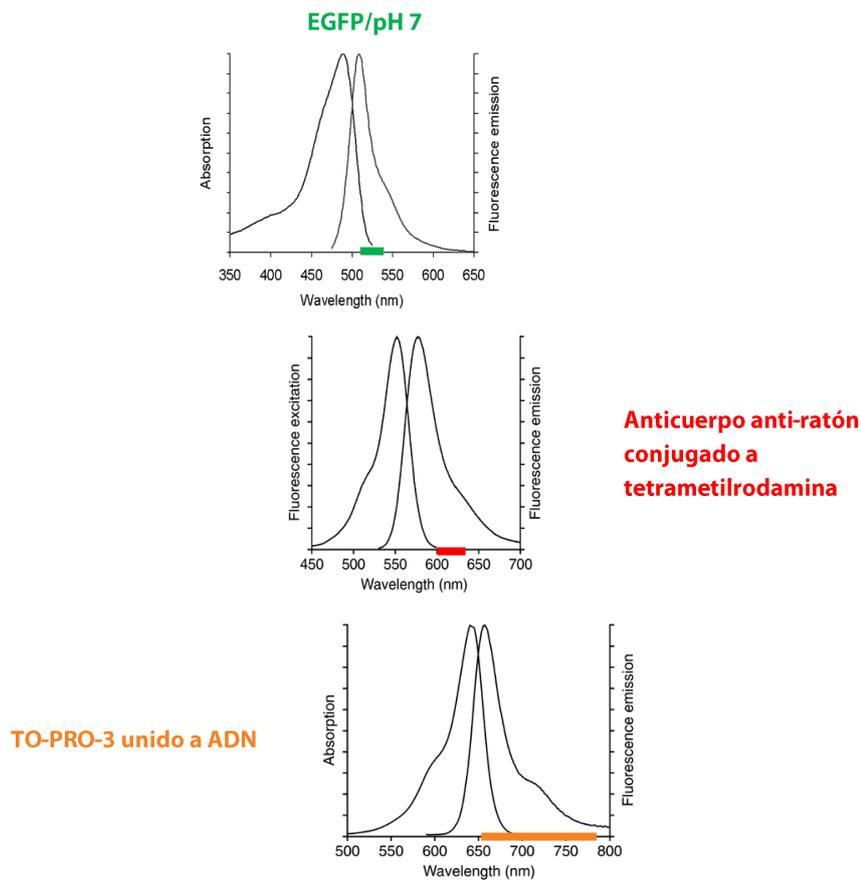


Figura 9. Espectros de absorción y emisión de los EGFP (arriba), anticuerpo anti-ratón conjugado a tetrametilrodamina (medio) y TO-PRO 3 unido a ADN. Se indica el espectro de cada fluoróforo y el rango de longitudes de onda detectadas por el fotomultiplicador: en verde, GFP; en rojo, tetrametilrodamina; en naranja TO-PRO 3.

3.3.19 Determinación de la *point spread function experimental*

La *point spread function (psf)*, función que evidencia la calidad de un sistema óptico, fue calculada a partir de imágenes capturadas de esferas adheridas en cubreobjetos. Se utilizaron esferas de 175nm de diámetro, de acuerdo a las longitudes de onda utilizadas, verde (488nm) y roja (543nm), del kit PS-Speck Microscope Point Source Kit (P7220, Invitrogen). La solución de esferas fue diluida en agua ultra pura y se sembraron aproximadamente 200 esferas por cubreobjeto. Las condiciones de adquisición de la imagen fueron tal como para las muestras problema, con excepción del promedio en línea utilizado, que debido a la baja relación señal/ruido, debió ser llevado a 16. La función *psf* fue calculada con la aplicación *Psf Distiller* del programa *Huygens Professional* (versión 4.1.1 Scientific Volume Imaging, Hilversum, The Netherlands). Se eligieron individualmente los puntos (aproximadamente 8) que presentaban menor intensidad y menor diámetro y se le brindó esa información a la aplicación *Psf Distiller* para que calculara la función. Se comprobó la efectividad de la función obtenida mediante la deconvolución de una esfera.

3.3.20 Procesamiento y análisis de imágenes.

Se aplicó deconvolución “ciega” a las imágenes tomadas por microscopía confocal, utilizando el software Huygens Essential (version 4.2, Scientific Volume Imaging, Hilversum, The Netherlands) y la función *psf* adaptativa. Se aplicó el algoritmo *Classical Maximum Likelihood Estimation* (CMLE), un proceso iterativo que no termina si no se le proporciona criterio de finalización. Este criterio puede ser el número máximo de iteraciones o el valor del “umbral de calidad”. Este valor depende en la calidad deseada de la imagen final. Se evaluaron los parámetros para alcanzar la mejor calidad de la imagen deconvolucionada. Los parámetros utilizados para la deconvolución fueron: posición cubreobjetos: 0 μ m; dirección del escaneo: hacia arriba; índice de refracción del lente: 1,518; índice de refracción del medio de montaje: 1,42; *backprojected pinhole*: 285.15; *excitation fill factor*: 4; valores de longitud de onda de excitación y de detección utilizados. Para las imágenes analizadas, el valor del cociente señal/ruido utilizado fue 20. El valor del “umbral de calidad” (*quality threshold*) 0,001 y un número máximo de 500 iteraciones fueron empleadas, parámetros que mostraron una mejor restauración de la señal de la imagen (Ver Figura 1 Anexo). Las imágenes deconvolucionadas (devueltas en formato 32 bit *float*) fueron exportadas como archivos 16-bit TIFF y para reducir el rango dinámico de intensidades, se utilizó la opción *Linked Scale*. El análisis de imágenes fue llevado a cabo con el software *Image J*.

3.3.21 Estadística

Los resultados fueron expresados como la media +/- SD de n observaciones. Los conjuntos de datos fueron comparados con el test no-paramétrico *Kruskal Wallis*. Las diferencias fueron consideradas significativas si $p < 0.0001$. El test estadístico fue calculado utilizando el software R [64].

4. Resultados y Discusión

4.1 Análisis de la población de Fibrosis Quística de Uruguay

La Fibrosis Quística es el trastorno recesivo más frecuente en Caucásicos. La investigación se ha concentrado en determinar datos de la enfermedad en nuestro país, sin embargo, existe poca información acerca de las mutaciones más frecuentes y prevalencia de FQ en Uruguay [52,53,54,55].

Con el fin de conocer más acerca de las mutaciones más frecuentes en nuestro país, se analizó la historia clínica de 69 pacientes no relacionados que fueron derivados al IGM para realizar el estudio molecular del *CFTR* por un probable diagnóstico de FQ. El IGM es un centro de diagnóstico de enfermedades genéticas de Uruguay que concentra un importante número de estudios moleculares del *CFTR* de nuestro país.

En función de la presentación clínica, los estudios funcionales del *CFTR* y las mutaciones causantes de enfermedad encontradas en el gen *CFTR*, los individuos analizados fueron clasificados en *FQ*, *Disfunción del CFTR/FQ no clásica*, *Inconcluso* o *FQ poco probable* según el algoritmo diagnóstico reportado por De Boeck *et al.* (Figura 5) [5]. Este criterio de clasificación no incluye en el diagnóstico de FQ a los individuos con resultado de test del sudor normal o umbral. Este criterio fue elegido con el fin de ser exigentes en el diagnóstico de la enfermedad. Al ser estrictos en el diagnóstico y no incorporar individuos con resultados del test del sudor umbral o normal, se evita la inclusión de fenotipos clínicos similares a FQ, los cuales pueden tratarse de otra entidad clínica, y por consiguiente afectar los valores de frecuencia de mutaciones causantes de FQ.

En el IGM se encuentran a disposición dos estrategias de análisis molecular del *CFTR*: la secuenciación parcial del gen, que busca las mutaciones más frecuentes en la población mundial (aproximadamente 104, que corresponden al 92% de las mutaciones causantes de enfermedad), y la secuenciación completa de todos los exones del gen y límites exón/intrón. Dado que la secuenciación del ADN permite ver no sólo variaciones vinculadas a la enfermedad, sino también cambios de consecuencias clínicas desconocidas o variantes sin consecuencias clínicas, las mutaciones identificadas fueron clasificadas como “causantes de enfermedad”, “variaciones de secuencia de funcionalidad desconocida” y “sin consecuencias clínicas”, de acuerdo a la base de datos *CFMDB* y bibliografía disponible [30,12].

Como se puede ver en la Tabla 6, la mayoría de los individuos presentaron diagnóstico de FQ, tres pacientes fueron diagnosticados con el Desorden Asociado al CFTR, AVD, veinticinco individuos fueron clasificados como “FQ poco probable”, habiendo presentado en la mayoría de los casos concentraciones de cloruro en el sudor en el rango normal. Finalmente, diez individuos fueron asignados con diagnóstico “Inconcluso” (con concentraciones de cloruro en el sudor en el rango umbral) al no disponerse de suficientes herramientas diagnósticas para poder confirmar o excluir FQ.

Tabla 6. Clasificación diagnóstica de los 69 pacientes estudiados

Diagnóstico	Nro de pacientes	Test del sudor (mmol /L)
FQ	31	> 60
Disfunción de CFTR	3	-----
FQ Poco Probable	25	< 40
Inconcluso	10	40 < T < 60

Al analizar todas las poblaciones clínicas, encontramos una variabilidad en los resultados del Test del Sudor (ver más adelante en detalle en la tabla de cada población): en algunos individuos con diagnóstico de FQ se presentaron valores por debajo del rango patológico, si bien claramente estos valores no se corresponden con las otras concentraciones halladas para el mismo individuo. Esta situación se presenta de forma análoga para individuos con concentraciones de cloruro en el sudor en el rango umbral (grupo *Inconcluso*) que presentaron por única vez valores en la región patológica.

Dado que este estudio se trata de el *gold standard* para el diagnóstico de FQ, distintos centros de diagnóstico especializados publican periódicamente guías para su correcto procedimiento [66]. Según éstas, falsos negativos o positivos pueden ser causados por una estimulación inadecuada del sudor, almacenamiento y recolección inadecuados de la muestra, cantidades inadecuadas de sudor, errores técnicos y, ocasionalmente, malinterpretación de los resultados. Los aspectos técnicos detrás del estudio son demandantes y estos errores ocurren más frecuentemente en instituciones que realizan este estudio de forma periódica, usualmente no en concordancia con las guías publicadas [67]. Todo esto insiste en la importancia de realizar varios estudios de determinación de cloruro en el sudor para la evaluación diagnóstica, tal como lo sugieren los algoritmos diagnósticos de FQ [5].

4.1.1 Individuos diagnosticados con Fibrosis Quística

La FQ es una enfermedad caracterizada por manifestaciones pulmonares y pancreáticas y por concentraciones de cloruro en el sudor que reflejan la disfunción del CFTR. En este trabajo se identificaron 31 individuos con concentraciones de cloruro en el sudor consistentemente por encima de 60 mmol/L lo que, junto con manifestaciones clínicas vinculadas con FQ, establecen el diagnóstico de la enfermedad [12, 5].

Según la prevalencia reportada por Cardoso *et al.* (1/9600), serían 350 los individuos afectados en nuestro país [53]. Sin embargo, al considerar que serían 98 los individuos afectados con FQ registrados en Uruguay, podemos afirmar que este trabajo ha cubierto aproximadamente un tercio de la población afectada y registrada de nuestro país [51].

Distintas causas pueden explicar esta inclusión parcial de los individuos con FQ del Uruguay. En primer lugar, dado que el estudio molecular no es imprescindible para establecer el diagnóstico de FQ en aquellos individuos con la presentación clásica, en muchas instituciones, no se les realiza el estudio genético una vez confirmado el diagnóstico por el Test del Sudor. Estos individuos no pudieron ser alcanzados por este estudio. Además, otros centros de nuestro país realizan el estudio molecular del *CFTR*, información a la cual tampoco se tuvo acceso.

Otra posible explicación es la elección de criterios de diagnóstico estrictos (adaptados de De Boeck *et al.*) para FQ. Vale mencionar en este sentido que varios individuos referidos al IGM con diagnóstico o para confirmación diagnóstica de FQ, no pudieron ser diagnosticados al aplicar el algoritmo utilizado, y fueron clasificados en las categorías *Inconcluso* o *FQ Poco Probable* (Figura 5). A su vez, una importante fracción de los pacientes derivados al IGM no pudieron ser incorporados en este estudio, al no presentar suficiente información que nos permitiera clasificarlos apropiadamente (esto explica, de forma parcial, la incorporación de 69 de los 172 individuos con estudio molecular realizado en el IGM).

Tal como se reporta en la bibliografía, pacientes con FQ pueden o no presentar compromiso en la funcionalidad del páncreas [12]. De los 31 pacientes diagnosticados con FQ, dieciséis presentaron un compromiso pulmonar con insuficiencia pancreática (FQ-IP), mientras que once presentaron suficiencia pancreática (FQ-SP). En dos de los cuatro individuos restantes (pacientes 1 y 14), se pudo establecer diagnóstico de FQ por el hallazgo de dos mutaciones “severas” causantes de enfermedad en el *CFTR*, si bien no se pudo obtener información clínica y paraclínica. El paciente 29 fue diagnosticado por el programa de Pesquisa Neonatal donde, al encontrar valores elevados de tripsina inmunoreactiva, y test del sudor por encima de 60

mmol/L, recurrieron al estudio molecular del *CFTR*. Al momento del estudio, el paciente no presentaba aún síntomas de la enfermedad. Del individuo restante (paciente 31), no se pudieron obtener datos más precisos de las manifestaciones clínicas. Sin embargo, se lo incorporó en esta categoría al ser referido al IGM por el médico tratante con el dato clínico “Fibrosis Quística diagnosticada por Test del Sudor positivos”. La Tabla 7 muestra la presentación clínica de los individuos diagnosticados con FQ, indicando en cada caso si presentó afectación pancreática (en rojo) o no (en verde).

Tabla 7. Pacientes diagnosticados con FQ. Se indica el fenotipo clínico, test del sudor y genotipo del *CFTR*

Paciente	Clínica		Test del sudor (mmol/L)	Estudio molecular (secuenciación)	Genotipo	Clases mutaciones
	Pulmonar	Digestiva				
1	?	?	?	Parcial	L206W / c.2079delT	clase II / clase I
2	√	√	89 - 91	Parcial	pF508del/ pF508del	clase II / clase II
3	√	√	?	Parcial	pF508del/ pF508del	clase II / clase II
4	√	√	> 60	Completa	pF508del / c.1A>G	clase II / clase I
5	√	no	> 60	Parcial	R334W / +	clase IV / ----
6	√	√	> 60	Parcial	pF508del / R1162X	clase II / clase I
7	√	√	34 - 97	Parcial	G542X / R1162X	clase I / clase I
8	√	no	> 60	Parcial	R334W / +	clase IV / ----
9	√	no	62 - 40 - 88	Completa	+ / +	----/----
10	√	no	40-67-75	Completa	+ / +	----/----
11	√	√	99	Parcial	pF508del / N1303K	clase II / clase II
12	√	√	> 60	Parcial	pF508del / R334W	clase II / clase IV
13	√	√	?	Parcial	A455E / 2789+5 G>A	clase V / clase V
14	?	?	?	Parcial	pF508del/ pF508del	clase II / clase II
15	√	√	115 - 132	Parcial	pF508del / R334W	clase II / clase IV
16	√	√	100 - 98	Parcial	pF508del/ pF508del	clase II / clase II
17	√	√	61 - 61	Parcial	pF508del / +	clase II / ----
18	√	√	> 60	Parcial	pF508del / G542X	clase II / clase I
19	√	no	66 - 59	Parcial	G542X / +	clase I / ----
20	√	no	62 - 68	Completa	+ / +	----/----
21	√	no	64 - 64	Parcial	+ / +	----/----
22	√	no	123	Parcial	R334W / +	clase IV / ----
23	√	no	> 60	Parcial	+ / +	----/----
24	√	no	60	Completa	+ / +	----/----
25	√	√	101 - 115 - 124	Parcial	R334W / +	clase IV / +
26	√	√	> 60	Parcial	pF508del / 2789+5 G>A	clase II / clase V
27	√	√	100 - 107 - 110	Parcial	pF508del / N1303K	clase II / clase II
28	√	√	?	Parcial	G542X / G542X	clase I / clase I
29	no	no	> 60	Completa	pF508del/ pF508del	clase II / clase II
30	√	no	50 - 89 - 72	Completa	+ / +	----/----
31	?	?	> 60	Parcial	G576A / +	clase V / ----

*En algunas situaciones no se pudo acceder a la información y se indica “?”, en otras, la historia clínica afirmaba “Tests del sudor positivos”, y no se pudo acceder a la concentración de cloruro, por lo que se indica “>60”. En el genotipo, se indica “+” cuando no se encontraron mutaciones con el estudio molecular realizado.

A excepción de la mutación c.2079delT, todas las mutaciones encontradas en individuos con FQ fueron previamente descriptas. En las mutaciones R1162X y G542X, el cambio nucleotídico generado produce un codón de terminación, lo que las clasifica como mutaciones de clase I. La mutación c.1A>G, si bien no genera un codón de terminación, elimina el codón de inicio, por lo que la tasa de producción de proteína debe ser muy baja también, y podría ser catalogada en esta clase. pF508del, N1303K y L206W al causar una maduración defectiva de la proteína y degradación prematura, son clasificadas en la clase II; mientras que R334W produciría un defecto estructural en el canal, con una conductancia de cloruro defectiva (clase IV). A455E,

2789+5G>A y G576A generan un defecto en el corte y empalme, presentando un número reducido de transcritos de CFTR (clase V).

El análisis de la presentación clínica de pacientes con FQ y su distinción en las formas con insuficiencia y suficiencia pancreática evidenció correlaciones entre el fenotipo clínico, es decir, la presencia de problemas pulmonares e insuficiencia pancreática, con la severidad de mutaciones en el *CFTR* y la concentración de cloruro en el sudor. Éstas se detallan a continuación.

Correlación manifestaciones clínicas – concentraciones de cloruro en el sudor

La gran mayoría de los individuos con manifestaciones FQ-IP (con concentraciones de cloruro conocidas) presentaron valores del test del sudor cercanos a 100. De forma análoga, pacientes con FQ-SP, presentaron concentraciones de cloruro en el sudor levemente mayores a 60 mmol/L (Tabla 7).

La Figura 10 muestra la distribución de la concentración de cloruro en el sudor para pacientes con fenotipos FQ-IP y FQ-SP. Se puede ver que el promedio de concentraciones de cloruro en el sudor para individuos con FQ-IP se encuentra por encima de 96 mmol/L, mientras que para individuos con FQ-SP, se encuentra levemente por encima de 60 mmol/L. De esta manera, claramente pueden evidenciarse dos poblaciones de concentraciones de cloruro en el sudor en función de la presentación clínica. En este diagrama se identifican los valores considerados como “*outliers*” dentro de cada población: éstos se corresponden con los dos valores de concentración de cloruro discordantes de cada población (paciente 7 de la población FQ-IP y paciente 22 de la población FQ-SP, ver más adelante).

La correlación hallada entre manifestaciones clínicas y la concentración de cloruro en el sudor ha sido reportada en la bibliografía [68, 69]. Esta correlación es esperable si consideramos que si bien las glándulas sudoríparas no son afectadas en FQ, su función es un reflejo de la conductancia de cloruro. Por consiguiente, propiedades funcionales distintas del CFTR deberían presentar consecuencias diferentes en la regulación de cloruro en los órganos donde CFTR es expresado.

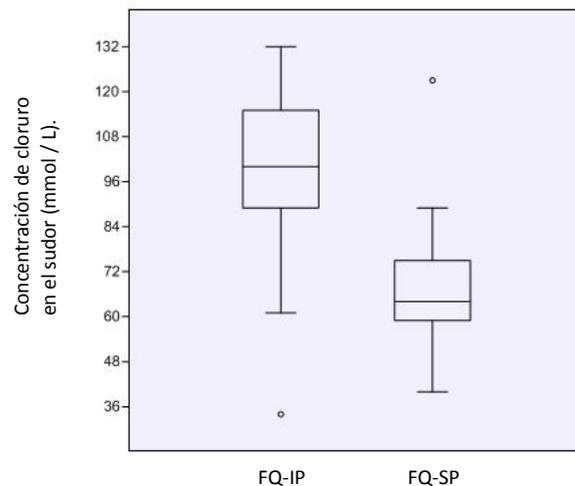


Figura 10. Diagrama de Box-plot para la distribución de las concentraciones de cloruro en el sudor para pacientes con FQ-IP y FQ-SP. En cada población, se muestra el primer cuartil, la mediana y el tercer cuartil (barras horizontales, de abajo a arriba). Se identifican los máximos y mínimos de cada población, y los puntos asignados como *outliers* (círculos).

Algunos individuos presentaron resultados en conflicto con las tendencias generales. En primer lugar, el paciente 7, con clínica FQ-IP pero con dos resultados de concentración de cloruro en el sudor muy desiguales: 34 mmol/L y de 97 mmol/L. Frente a estos resultados, dos factores deben ser considerados: el correcto procedimiento en el estudio del test del sudor y un cambio de la concentración a lo largo del tiempo. De cualquier manera, el hallazgo de las mutaciones severas G542X y R1162X hace pensar que el valor más elevado esté representando la concentración real de cloruro en el sudor en este paciente.

Por otra parte, el individuo 17, con fenotipo FQ-IP presentó concentraciones de cloruro en el sudor levemente por encima de 60 mmol/L. En este sentido, la clasificación asignada para el individuo 17 puede ser controversial. Este paciente presentó valores normales de grasa en materia fecal de acuerdo a un estudio de *Van de Kamer* realizado años atrás, lo que sugeriría una funcionalidad pancreática normal. Sin embargo, al momento de la consulta, el paciente se encontraba en tratamiento con enzimas pancreáticas, hecho que motivó su clasificación en el fenotipo FQ-IP. Por consiguiente, puede haber sido clasificado erróneamente, y pertenecer al grupo FQ-SP. Esto sería concordante con el leve aumento de cloruro en el sudor (61 mmol/L), y con el hallazgo de una sola mutación.

Consideramos la posibilidad que el individuo 17 sea heterocigota para una mutación causante de FQ y que presente síntomas de la enfermedad. Individuos heterocigotas para pF508del presentarían concentraciones de cloruro en el sudor, si bien significativamente diferentes a la

población general (14.9 +/- 8.4 mmol/L frente a 10,6 +/- 5.2 mmol/L), en el rango normal [67]. Esto nos permite descartar que su fenotipo sea explicado por la mutación pF508del en estado de heterocigosis.

El individuo 22 presentó concentraciones de cloruro en el sudor de 123 mmol/L, aunque no presentaría manifestaciones pancreáticas. Dado que presenta un único resultado del test del sudor, el primer paso a seguir sería la repetición del estudio, de acuerdo al algoritmo aplicado para poder confirmar su situación diagnóstica.

Correlación manifestaciones clínicas – mutaciones en el CFTR

Al comparar las dos presentaciones de la enfermedad, puede evidenciarse claramente la definición diferencial del genotipo: en todos los individuos con fenotipo FQ-IP, excepto los pacientes 17 y 25, se identificaron dos mutaciones en el gen, mientras que en ninguno de los individuos con fenotipo FQ-SP se lograron identificar dos mutaciones en la secuenciación parcial, o en algunos casos incluso luego de la secuenciación completa del *CFTR* (Tabla 7).

A su vez, también se encontró una distribución de mutaciones según la presentación clínica: las mutaciones pF508del, N1303K, G542X, R1162X definidas como “severas” (clases I-III) se encuentran distribuidas casi exclusivamente en individuos con fenotipo FQ-IP (Tabla 7). Sólo el paciente 19 del subgrupo con fenotipo FQ-SP, que no presentaría al momento de la consulta síntomas digestivos, es portador de la mutación severa G542X, si bien no se encontró otro alelo causante de enfermedad en la secuenciación parcial del gen. La mutación 2789+5G>A (clase V) también se encontró en individuos con fenotipo FQ-IP.

En general, pacientes homocigotas para mutaciones severas presentan un fenotipo asociado a insuficiencia pancreática, aumento de la frecuencia de íleo meconial (obstrucción al nacimiento del intestino delgado/o grueso con la primera excreción de materia), mortalidad prematura, mayor incidencia de malnutrición y enfermedad hepática severa. Las mutaciones leves (clases IV-VI) se encuentran generalmente asociadas con una edad de muerte más avanzada y suficiencia pancreática. También se evidenció que estos cambios de consecuencias más leves se manifiestan por lo general de forma dominante frente a mutaciones severas (clases I-III), por lo que individuos heterocigotas para ambos tipos de mutaciones presentarían fenotipo SP [70].

Sin embargo, en el subgrupo FQ-IP se encontraron mutaciones de clase IV-V. Los individuos 12, 13, 15, 25 y 26, presentaron las mutaciones R334W, 2789+5G>A y A455E (Tabla 7).

El individuo 26 presenta el genotipo pF508del / 2789+5G>A. Vale aclarar que si bien la mutación 2789+5G>A está clasificada como clase V, el defecto en el corte y empalme da lugar a sólo un 4% de transcritos funcionales, lo que generaría deficiencias severas de la conductancia de cloruro [12]. Se ha reportado que un 5-10% de actividad de CFTR funcional es necesaria para evitar una enfermedad severa [71,72]. Por consiguiente, dado el bajo número de transcritos funcionales, queda clara la severidad de esta mutación, coherente con la presentación FQ-IP del paciente.

El individuo 13 presentó manifestaciones clínicas de FQ-IP, si bien su genotipo (A455E / 2789+5G>A) presentaba la mutación de consecuencias leves A455E. Esta presentación clínica hace pensar que la haploinsuficiencia consecuencia de la mutación severa 2789+5 G>A y del alelo A455E determinó que la funcionalidad residual no sea suficiente para evitar la enfermedad pancreática. En apoyo a esta idea, se ha reportado el seguimiento de pacientes con FQ con el alelo A455E y otra mutación causante de enfermedad quienes, si bien inicialmente presentaron fenotipo SP, desarrollaron insuficiencia pancreática en estados más tardíos de la enfermedad [73]. Desconocemos la edad en la que el individuo 13 comenzó con manifestaciones pancreáticas, pero al momento de la consulta presentaba 11 años de edad.

En cuanto al individuo 25 con genotipo R334W / +, su clínica de FQ clásica y los valores elevados de cloruro en el sudor (101 – 124) mmol/L, confirman el diagnóstico, por lo que debería encontrarse otra mutación causante de enfermedad luego de la aplicación de otras herramientas de búsqueda de mutaciones en el *CFTR*. R334W, si bien está generalmente asociada a fenotipo SP, puede presentarse también en individuos con IP [12]. Esta asociación explica claramente también el fenotipo de los individuos 12 y 15, ambos portadores del genotipo pF508del / R334W.

Individuos con FQ sin mutaciones en el CFTR

En cuatro de los individuos con fenotipo FQ-SP y en dos de los individuos con fenotipo FQ-IP se encontró una única mutación luego de la secuenciación parcial de *CFTR*. Si bien la elevada concentración de cloruro en el sudor es herramienta suficiente para establecer el diagnóstico, sería interesante en estos individuos poder secuenciar de forma completa la secuencia codificante de *CFTR*. Dado el fenotipo y los valores de cloruro en el sudor, el diagnóstico de FQ queda establecido, por lo que esperaríamos encontrar otra mutación causante de enfermedad.

Luego de la secuenciación completa de la región codificante y límites exón-intrón del *CFTR*, en cinco individuos con fenotipo FQ-SP no se encontraron mutaciones causantes de enfermedad. Según el algoritmo diagnóstico de De Boeck *et al.*, lo primero que debería considerarse en esta

situación es la posibilidad de un falso positivo en el estudio del test del sudor [5]. Cuatro de los cinco individuos presentan más de un resultado de este estudio, lo que hace pensar como poco probable esta situación.

La ausencia de mutaciones en el *CFTR* luego de la secuenciación completa del gen en pacientes con FQ es posible. Según el Consenso Europeo de FQ, el 1-5% de alelos del *CFTR* no son detectados en la secuenciación total de la secuencia codificante y límites exón/intrón del gen [12]. Este estudio no permite identificar mutaciones en *CFTR* en regiones regulatorias encontradas distantes del gen, o en las secuencias no codificantes del mismo.

Si bien el fenotipo encontrado puede ser causado por una disfunción del CFTR y que los alelos no hayan sido identificados aún, llama la atención que esta escasa definición del genotipo fue de forma casi exclusiva para individuos con manifestaciones sin compromiso pancreático y concentraciones de cloruro en el sudor levemente por encima de 60 mmol/L (Tabla 7).

Es posible que su fenotipo sea explicado por genes distintos al *CFTR* que causen una enfermedad clínicamente indistinguible de FQ. En una familia alemana, ninguna mutación pudo ser identificada en ambos genes de *CFTR* de un paciente con FQ, mientras que su hermana, quién había heredado los mismos alelos, no era afectada [74]. En dos familias estadounidenses, cada una con dos hijos afectados, ninguna mutación pudo ser encontrada en ninguno de los niños y en ambos casos, los hermanos habían heredado los mismos alelos del *CFTR* [75].

La FQ está caracterizada no sólo por una deficiencia de secreción de cloruro, sino por un aumento en la absorción de sodio en la vía aérea. El transporte de sodio está mediado por el canal de sodio epitelial (ENaC), el cual está compuesto de tres subunidades *SCNN1A*, *SCNN1B* y *SCNN1C*. En ratón, la sobreexpresión de *SCNN1B* resulta en un aumento de absorción de sodio y una enfermedad pulmonar similar a FQ [76]. Hay evidencias que mutaciones en *SCNN1B* pueden generar una enfermedad pulmonar en una pequeña fracción (cerca del 10%) de pacientes con FQ en los que una mutación en el *CFTR* no pudo ser encontrada en ambos genes [76]. Los factores genéticos que causan FQ en otros pacientes permanecen sin conocerse aún [12].

4.1.2 Estimación de las mutaciones más frecuentes en FQ en Uruguay.

De los 31 individuos diagnosticados con FQ, se muestra a continuación la distribución de las mutaciones halladas:

Tabla 8. Distribución de mutaciones en pacientes diagnosticados con FQ.

Cambio nucleotídico	Efecto en proteína	Exón / Intrón	Número de alelos	Frecuencia de alelos (%)
c.1521_1523delCTT	p.F508del	Exón 11	19	30,6
c.1000C>T	R334W	Exón 8	6	9,7
c.1624G>T	G542X	Exón 12	5	8,1
c.3848C>T	R1162X	Exón 22	2	3,2
c.3909C>G	N1303K	Exón 24	2	3,2
c.2657+5G>A	2789+5 G>A	Intrón 16	2	3,2
c.617T>G	L206W	Exón 6	1	1,6
c.2079delT	p.Phe693LeufsX29	Exón 14	1	1,6
c.1A>G	-----	Exón 1	1	1,6
c.1364C>A	A455E	Exón 10	1	1,6
c.1727G>C	G576A	Exón 13	1	1,6
desconocida	-----	-----	21	33,9
Total	-----	-----	62	100,0

Otras mutaciones reportadas en la base de datos *CFMDB* o asignadas por el Consenso Europeo de FQ como “sin consecuencias clínicas” fueron encontradas también en pacientes con FQ: M470V, P1290P, c.869+11C>T, c.1393-61A>G, c.2989-93A[12_13] y c.3367+37G>A [12,51].

El análisis de las mutaciones causantes de enfermedad más frecuentes entre pacientes con FQ evidenció a la mutación pF508del con mayor frecuencia, representando el 30,6% de los cromosomas analizados, mientras que las mutaciones restantes alcanzaron un porcentaje cumulativo de 35,5%. De esta manera, las técnicas aplicadas permitieron determinar el genotipo del CFTR en el 66% de los cromosomas de los individuos afectados.

Esta tasa de detección se encuentra por debajo de las encontradas en otras poblaciones heterogéneas, como es la de Uruguay. En Europa del Sur, en España e Italia se han detectado el 90% de los alelos [77,78]. En países latinoamericanos como México y Brasil, se alcanzaron porcentajes de detección de 74% y 72%, respectivamente [79,80]. Finalmente, en un estudio Argentino que se analizaron 440 cromosomas de individuos con diagnóstico de FQ, se alcanzó una tasa de detección de mutaciones de 83,45%.

La tasa de detección más baja obtenida puede ser explicada por un espectro más estrecho de técnicas de biología molecular que no permiten conocer todos los alelos causantes de enfermedad. Sin embargo, de los 21 alelos sin mutaciones encontradas en este trabajo, 10 (que se corresponden con el 16% de los alelos analizados) fueron sometidos a la secuenciación

completa de la secuencia codificante y límites exón/intrón del gen. En el caso de sostener la disfunción del CFTR como causa del fenotipo, los alelos desconocidos pueden tratarse de mutaciones en la región promotora del *CFTR*, o en secuencias intrónicas. También debemos considerar grandes deleciones que, en caso de encontrarse en estado heterocigota, no pueden ser detectadas por técnicas de PCR. De hecho, los re-arreglos intra-génicos en el *CFTR*, es decir grandes inserciones o deleciones del gen, se corresponden con el 1-3% de mutaciones [12].

Análisis de resultados en relación a antecedentes de FQ en Uruguay.

El estudio más extenso de búsqueda de mutaciones en pacientes con FQ en Uruguay es el de Luzardo *et al.*, quienes analizaron un conjunto de 52 individuos con sospecha diagnóstica de FQ. Tal como se muestra en la Tabla 9, este estudio logró identificar mutaciones en un número comparable de alelos al alcanzado en nuestro trabajo. La mutación pF508del se encontró, al igual que en este trabajo, como el alelo de mayor frecuencia, aunque con un valor distinto. Otros alelos causantes de enfermedad presentaron frecuencias relativas diferentes. La Tabla 9 muestra las frecuencias de mutaciones halladas en este estudio, comparándolas con la frecuencia obtenida en el estudio de Luzardo *et al.* [52].

Tabla 9. Mutaciones más frecuentes en FQ de Uruguay

Mutación	Frecuencia de alelos (%)	Frecuencia (%) según Luzardo y col, 2002
p.F508del	30,6	40,2
R334W	9,7	1,9
G542X	8,1	5,7
R1162X	3,2	2,9
N1303K	3,2	2,9
2789+5 G>A	3,2	2,0
L206W	1,6	-----
c.2079delT	1,6	-----
c.1A>G	1,6	-----
A455E	1,6	-----
G576A	1,6	-----
desconocida	33,9	28,9

*Datos obtenidos de [52].

La mutación R334W alcanzó una frecuencia de 9,7 % en los pacientes con FQ analizados en este trabajo, mientras que en el estudio de Luzardo *et al.* alcanzó una frecuencia de 1,9%. El alelo G542X si bien presentó diferencias en las frecuencias individuales, se corresponde en ambos estudios con uno de los más frecuentes luego de pF508del. Los alelos R1162X, N1303K y 2789+5 G>A, alcanzaron en ambos estudios frecuencias comparables.

Las diferencias observadas pueden atribuirse a distintos factores. En primer lugar, las condiciones de diagnóstico de FQ fueron distintas: en el estudio de Luzardo, los pacientes

fueron incluidos al presentar manifestaciones pulmonares y/o digestivas, con resultados de test del sudor por encima de 60mmol/L, en el rango 40-60mmol/L o incluso por debajo del mismo [52]. A su vez, en el estudio de Luzardo *et al.*, el 27% de los pacientes analizados presentaban FQ-SP, mientras que en este trabajo el 35% de los individuos diagnosticados (y clasificados de acuerdo a la manifestación pancreática) presentaron suficiencia pancreática. De esta manera, los grupos analizados en ambos estudios parecen diferir en las contribuciones relativas de las distintas presentaciones de FQ.

Las diferencias encontradas también pueden ser parcialmente explicadas por las distintas metodologías aplicadas: en el estudio de Luzardo se identificaron los alelos G85E y R75Q (con frecuencias de casi 3% y 2%, respectivamente), los cuales no son evidenciados en el primer paso del estudio molecular aplicado en este trabajo, ya que se encuentran en el exón 1 (ver materiales y métodos 3.1.1). La mutación R74W, se encuentra en la misma situación. De igual manera, es posible que mutaciones encontradas en este estudio no hayan sido evidenciadas con la metodología utilizada por Luzardo *et al.*

Es interesante evaluar las asociaciones establecidas para algunas de las mutaciones encontradas en el estudio uruguayo previo. R74W y D1270N halladas por Luzardo *et al.*, son consideradas, según el Consenso Europeo de FQ, como causantes de Desórdenes Asociados al CFTR. Esta consideración es interesante, dados los criterios clínicos y paraclínicos utilizados en dicho estudio para definir la población problema, más inclusivos de los considerados en este trabajo. Otro aspecto interesante es que, según el Consenso Europeo de FQ, la mutación R75Q encontrada con una frecuencia de 2% en los pacientes analizados en el estudio previo, no tendría consecuencias clínicas [12]. Esto evidencia el avance en el conocimiento de los efectos de mutaciones en el tiempo entre ambas publicaciones (estudio de Luzardo *et al.* del año 2002, mientras que el Consenso fue publicado en el año 2008).

Análisis de resultados en relación con antecedentes de FQ en la región y el mundo.

Las mutaciones causantes de FQ y las frecuencias relativas obtenidas en este trabajo, difieren de las descritas en otros países latinoamericanos. Si bien pF508del es significativamente más frecuente que otras mutaciones causantes de enfermedad, su prevalencia es relativamente menor que en otras poblaciones.

La frecuencia de pF508del varía en individuos afectados de distintos países de Latinoamérica. En Brasil, se presentaría en un 48,4%, en Chile, en el 29,2%, y en México en el 39% [79,81,82]. Finalmente en Argentina, en el 58,6% de los alelos de pacientes con FQ se identificó pF508del [83]. También observamos diferencias en la distribución y la frecuencia de mutaciones distintas de pF508del entre individuos uruguayos y pacientes argentinos: mientras que en el estudio de Visich *et al.*, 19 mutaciones explican el 20,44% de alelos en el *CFTR*, en nuestro estudio 5 mutaciones (R334W, G542X, R1162X, N1303K, 2789+5G>A), explican el 27,4% de los alelos causantes de enfermedad [83].

Dada la gran contribución Caucásica en nuestra población, es interesante conocer también las frecuencias de mutaciones en países de donde nuestra población es originaria [55]. En España pF508del se encontraría en el 51.74% de los alelos, G542X en 7.69%, N1303K en 2.92%, mientras que otras de las mutaciones encontradas en este estudio se presentarían con frecuencias entre 1-2% [84]. En Italia, pF508del representa el 51,07% de los alelos mientras que otras mutaciones serían menos frecuentes (N1303K en 4,84%, G542X en 4,83% y R1162X en 2,42% de los alelos) [77]. Si bien las mutaciones más frecuentes encontradas en nuestro trabajo (pF508del, R334W, G542X, R1162X, N1303K) se encuentran como frecuentes en ambas poblaciones, las frecuencias individuales difieren.

Una posible explicación a las diferencias en la composición de las mutaciones encontradas en relación a países de la región y europeos, es la heterogeneidad de la población uruguaya, la cual es distinta a otros países de Latinoamérica. De esta manera, una composición étnica particular de nuestra población podría determinar frecuencias de alelos causantes de FQ específicos para la población uruguaya.

Estimación de frecuencia de mutaciones a partir del análisis exclusivo de población FQ-IP

Con el fin de evaluar si estas diferencias en los resultados podrían ser también producto de una interferencia causada por el fenotipo FQ-SP (el cual en muchos casos no fue confirmado por mutaciones en el gen), decidimos analizar la distribución de mutaciones exclusivamente en individuos con presentación de FQ-IP. Incorporamos en este análisis el genotipo de los individuos 14 y 29, quienes, al ser homocigotas para pF508del, presentarán clínica de FQ-IP.

Tabla 10. Distribución de mutaciones en pacientes con FQ-IP.

Cambio nucleotídico	Efecto en proteína	Exón / Intrón	Número de alelos	Frecuencia de alelos (%)
c.1521_1523delCTT	p.F508del	Exón 11	19	52,8
c.1624G>T	G542X	Exón 12	4	11,1
c.1000C>T	R334W	Exón 8	3	8,3
c.3848C>T	R1162X	Exón 22	2	5,6
c.3909C>G	N1303K	Exón 24	2	5,6
c.2657+5G>A	2789+5 G>A	Intrón 16	2	5,6
c.1A>G	-----	Exón 1	1	2,8
c.1364C>A	A455E	Exón 10	1	2,8
desconocida	-----	-----	2	5,6
Total	-----	-----	36	100,0

Como puede verse en la Tabla 10 la distribución de mutaciones vinculadas a FQ cambia considerablemente cuando restringimos nuestro análisis a individuos con presentación clásica de la enfermedad. Ahora, la tasa de detección de mutaciones es del 94,4%, número que incluso puede incrementarse, ya que en estos individuos se realizó secuenciación parcial del gen. Este cambio importante en la distribución era esperable, ya que la contribución de alelos no identificados era significativa por parte de la población FQ-SP.

Luego de esta restricción en el análisis, la frecuencia de pF508del se acerca aún más a las encontradas en países de la región y en Italia y España. Sin embargo, otras mutaciones alcanzan valores bastante elevados en comparación con otras poblaciones. Es posible que al extender este estudio a una población mayor de individuos afectados, las frecuencias individuales de estas mutaciones disminuyan y aparezcan otras con frecuencias similares.

Consideramos relevante presentar los resultados obtenidos a partir del análisis exclusivo de este grupo. Si bien en este estudio se consideraron criterios estrictos de diagnóstico de FQ, y no se incluyeron individuos con resultados de concentraciones de cloruro en el sudor por debajo de 60 mmol/L, dado que no se hallaron mutaciones en el *CFTR* en varios casos, es posible que algunos individuos diagnosticados como FQ-SP, se traten de individuos afectados con FQ no clásica o incluso con otra entidad clínica.

Los resultados alcanzados se encuentran influenciados por las particularidades del proceso diagnóstico de FQ en Uruguay, donde muchos de los individuos derivados para estudio molecular, no presentaron valores de test del sudor positivos e individuos con concentraciones de cloruro en el sudor por encima de 60 mmol/L, en algunas situaciones, no son estudiados a nivel molecular. A su vez, se evidencia el impacto en el diagnóstico de no disponer del estudio de funcionalidad de Diferencia de Potencial Nasal, lo que dificulta poder vincular al fenotipo clínico a una disfunción del CFTR. Estas dificultades en el proceso diagnóstico sumado a los criterios estrictos de clasificación utilizados en este trabajo determinaron que el número de individuos alcanzado no se acerque a la totalidad de individuos reportados con FQ en Uruguay.

Sin embargo, el análisis de la presentación clínica, paraclínica y molecular reproduce correlaciones previamente reportadas. Además, la distribución y la tasa de detección de mutaciones en individuos con manifestaciones FQ-IP se acerca a las descritas a nivel regional y mundial, lo que nos permite concluir que los resultados obtenidos representarían la distribución de mutaciones causantes de FQ en Uruguay.

Tal como lo sugiere el Consenso Europeo de FQ, es fundamental determinar las frecuencias de las mutaciones de FQ en cada población, y poder ofrecer herramientas de diagnóstico molecular en función de las mismas [12]. Este análisis reveló a las mutaciones pF508del, G542X, R334W, R1162X, N1303K y 2789+5 G>A, como las más frecuentes entre los individuos afectados con FQ de Uruguay. Estas mutaciones deben ser incluidas en el diseño de cualquier sistema de detección para el diagnóstico de FQ en nuestro país, para obtener al menos el 58% de sensibilidad.

Consideramos que conocer más acerca de la epidemiología de FQ en nuestro país, contribuirá al desarrollo de un algoritmo de diagnóstico molecular apropiado a nuestra población. Esta información permitirá optimizar la búsqueda de mutaciones, lo que contribuirá a ofrecer un tratamiento adecuado, mejorando el pronóstico y brindando asesoramiento genético en familias afectadas, con una relevancia particular para la Pesquisa Neonatal de FQ en Uruguay.

4.1.3 Pacientes sin confirmación diagnóstica (“Inconcluso”)

Los pacientes en los que no se puede afirmar o excluir el diagnóstico de FQ, fueron asignados en la categoría de diagnóstico “Inconcluso”. Estos se corresponden con individuos con un test del sudor en el rango umbral (40-60), con una única mutación identificada y una diferencia de potencial nasal inconcluyente (Figura 5).

En el IGM, en general los estudios genéticos se solicitan para confirmar el diagnóstico y realizar asesoramiento genético y eventual diagnóstico prenatal. La mayoría de los pacientes fueron vistos por el equipo médico del IGM, y se registró toda la información clínica y paraclínica. Sin embargo, dado que los estudios paraclínicos son solicitados por el médico tratante, en varias situaciones, la información paraclínica disponible para los distintos pacientes no fue similar. De igual manera, cuando en un paciente con sospecha clínica de FQ no se encontraron dos mutaciones causantes de enfermedad en la secuenciación parcial del gen, el equipo médico del IGM sugiere extender el análisis a la secuenciación completa. No siempre la extensión de este estudio fue realizada. De esta manera, cuando el algoritmo del diagnóstico fue interrumpido porque el paciente no fue estudiado en forma completa, y por consiguiente la información disponible no es suficiente para definir su diagnóstico, el caso fue también asignado en la categoría “Inconcluso”.

Tabla 11. Pacientes clasificados como “Inconcluso”. Se indica el fenotipo clínico, test del sudor y genotipos del *CFTR*

Paciente	Clínica		Test del sudor (mmol/L)	Estudio molecular (secuenciación)	Genotipo
	Pulmonar	Digestiva			
1	√	no	30 - 46 - 49	Parcial	+/+
2	√	no	61 - 40	Parcial	+/+
3	√	no	68 - 40- 49	Parcial	L967S/+
4	√	√	52	Parcial	+/+
5	no	√	51 - 52	Parcial	+/+
6	√	no	17 - 49 - 56	Parcial	N1303K/+
7	no	√	43 - 48	Parcial	+/+
8	√	√	68 - 48	Parcial	+/+
9	√	no	"concentración umbral"	Parcial	+/+
10	√	no	51 - 54	Parcial	+/+

En el genotipo, se indica “+” cuando no se encontraron mutaciones con el estudio molecular realizado. Para el individuo 9 no se conoce el valor exacto de la concentración de cloruro en el sudor, aunque fue especificado por el médico tratante que presentaba “concentración umbral” de cloruro en el sudor (valores en el rango 40< T <60 mmol/L).

Como se puede ver en la Tabla 11, seis de los diez individuos en esta categoría presentaron exclusivamente manifestaciones pulmonares, dos presentaron sólo manifestaciones digestivas y dos manifestaciones en ambos sistemas. Vale aclarar que, de acuerdo al algoritmo aplicado, si bien algunos pacientes presentaron concentraciones de cloruro en el sudor por encima de 60 mmol/L, este elevado valor se presentó en una única medición, siendo las sucesivas menores al punto de corte. Por consiguiente estos individuos no fueron clasificados como

afectados con FQ, debiéndose continuar con el algoritmo para poder precisar su diagnóstico (Figura 5).

En ocho de los diez individuos no se encontraron mutaciones causantes de enfermedad en ninguno de los alelos del *CFTR*. En el paciente 6 se encontró la mutación causante de enfermedad N1303K (clase II). Este niño, con 6 años al momento de la consulta, presentaba múltiples internaciones por infecciones respiratorias, aunque los tres resultados del Test del Sudor fueron 17, 49 y 56 mmol/L. Sus tres primos tendrían FQ, dos de los cuales han fallecido. El paciente 3 en esta categoría presentó una mutación con consecuencias clínicas inconclusas, L967S (ver más adelante). También presentó varios cuadros bronco-obstructivos, y test del sudor de 40-49 y uno de 68 mmol/L. En ambos pacientes es fundamental completar la secuenciación del gen *CFTR*.

Los individuos analizados presentan un fenotipo clínico muy similar a FQ no clásica: una manifestación en al menos un sistema, y valores de test del sudor por encima de 40 mmol/L. Estudios previos han reportado casos de individuos con un fenotipo similar a FQ sin mutaciones en el gen. En el estudio de Groman *et al.* se evidenció que pacientes con una o más mutaciones en *CFTR* no podían ser distinguidos clínicamente de aquellos sin mutaciones: el grado de afección en la glándula sudorípara, en el tracto gastrointestinal y del sistema respiratorio fue similar entre los distintos casos [75].

En el caso de individuos con una sola mutación identificada, es posible que presenten otro alelo causante de enfermedad que no fue encontrado con la metodología utilizada, lo que confirmaría su diagnóstico de FQ no clásica (Figura 5). Alternativamente, una única mutación en *CFTR* en combinación con alelos específicos de otros genes y un ambiente desfavorable podría producir este fenotipo. A su vez, (de igual manera que para los individuos con FQ sin mutaciones en *CFTR*) es posible que factores distintos a la disfunción del *CFTR* puedan determinar el fenotipo clínico no clásico de FQ en los pacientes categorizados hasta el momento como *Inconcluso*.

La experiencia de centros de diagnóstico neonatal de FQ en Estados Unidos, indica que un niño con concentraciones de cloruro en el sudor de 40 mmol/L o mayores, tiene mayores probabilidades de desarrollar síntomas vinculados con FQ, por lo que se ha sugerido que sean evaluados clínicamente a intervalos de 6-12 meses, junto con la repetición el estudio del test del sudor hasta que el diagnóstico sea claro [6,85]. A su vez, deberá completarse la secuenciación de la región codificante en todos los casos para poder considerar otras

etiologías posibles. Si bien su diagnóstico no pudo establecerse aún, el asesoramiento genético es fundamental en ellos y en su familia.

4.1.4 Pacientes diagnosticados con AVD

De los pacientes referidos para realizar el estudio molecular del *CFTR*, tres individuos fueron diagnosticados con el Desorden Asociado al *CFTR*, AVD al presentar azoospermia y ausencia de los vasos deferentes, de acuerdo a lo referido por el médico tratante [17]. En dos de los tres individuos se encontraron dos mutaciones causantes de enfermedad, portadores de los genotipos: pF508del/c.1210-12 5T y 2789+5 G>A/c.1210-12 5T [12].

El hecho que se haya encontrado una mutación causante de enfermedad de consecuencias severas, junto con una mutación de consecuencias más leves en la proteína, es concordante con resultados previamente reportados. El 88% de pacientes franceses con AVD y dos mutaciones en *CFTR*, presentaron esta combinación en su genotipo [86].

Las mutaciones leves, serían de tipo IV o V, tal como lo es la mutación IVS8-T5 (c.1210-12 5T). Este alelo genera una reducción en la cantidad de proteína ya que el número de residuos de timina en el intrón 9 determina el salteado del exón 10, y transcritos que carecen del mismo fallan en madurar [87]. Se ha observado una variabilidad en el número de transcritos maduros entre individuos y entre tejidos, lo que explicaría la penetrancia parcial del alelo 5T en pacientes con FQ [88]. El epitelio nasal presentaría un número de transcritos madurados correctamente del 6-37%, mientras que las células epiteliales del epidídimo, el nivel de maduración sería más bajo (6-24%).

En cuanto al tercer individuo, éste presentó el genotipo pF508del/R170C, donde la mutación R170C tiene consecuencias clínicas inciertas (ver más adelante), por lo que desconocemos si este cambio está vinculado o no a su fenotipo. De no ser causante de enfermedad, se mantiene el diagnóstico ya que el 16% de los pacientes con AVD podrían presentar un único alelo del *CFTR* causante de enfermedad y de acuerdo a la base de datos OMIM, la presencia de una mutación en el *CFTR* causante de FQ es suficiente para establecer el diagnóstico [17, 86]. La Tabla 12 indica las mutaciones encontradas en individuos con AVD.

Tabla 12. Mutaciones encontradas en pacientes con AVD.

Mutación	Exón/intrón	Número de alelos	% alelos
pF508del	Exón 10	2	33
2789+5 G>A	Intrón 16	1	17
R170C	Exón 5	1	17
c1210-12 5T	Intrón 9	2	33

Vale aclarar que ninguno de estos pacientes presentó síntomas de formas no clásicas de FQ, refiriéndose su fenotipo únicamente al compromiso reproductivo, y siendo el motivo de la consulta clínica la infertilidad. La presentación clínica y el hallazgo de una mutación causante de enfermedad en estos individuos permite confirmar el diagnóstico de AVD por disfunción del CFTR [17].

4.1.5 Pacientes con diagnóstico poco probable de FQ

Veinticinco individuos fueron clasificados como “FQ poco probable”. Como puede verse en la Tabla 13, la mayoría de los individuos presentaron valores de test del sudor por debajo del valor considerado crítico para el diagnóstico de FQ. Sólo tres individuos presentaron valores de test del sudor en el rango umbral (40-60mmol/L). En estos individuos, la ausencia de mutaciones causantes de enfermedad luego de la secuenciación completa de las regiones codificantes y límites exón/intrón del *CFTR* permiten descartar la FQ como posible diagnóstico (Figura 5).

Tabla 13. Características clínicas y de funcionalidad del CFTR de pacientes clasificados como “FQ Poco Probable”.

Número de Pacientes	Clínica		Test del sudor (mmol/L)	Estudio molecular (secuenciación)	Genotipo
	Pulmonar	Digestiva			
3	√	no	40 < T < 60	Completa	+/+
14	√	no	< 40	-----	-----
4	no	√	< 40	-----	-----
3	√	√	< 40	-----	-----
1	no	no	< 40	-----	-----

La mayor parte de estos pacientes (referidos con posible diagnóstico de FQ), presentaron únicamente manifestaciones pulmonares, mientras que un número menor fue derivado por manifestaciones digestivas o por afección en ambos sistemas (Tabla 13). Un paciente fue derivado por parte del Programa de Pesquisa Neonatal al presentar dos reacciones de tripsina inmunoreactiva elevadas, si bien el test del sudor realizado fue negativo y no presentaba aún síntomas sugestivos de FQ. En ningún caso se encontraron mutaciones causantes de enfermedad que permitan confirmar FQ. En la Tabla 13 no se aclara el estudio molecular ni el genotipo, por simplificación, ya que en cada grupo clínico hay individuos estudiados con una u otra metodología. A diferencia de los individuos con concentraciones de cloruro umbrales, no es necesario estudiar el gen en los individuos con valores en el rango normal, ya que las bajas concentraciones de cloruro en el sudor permiten considerar el diagnóstico de FQ como poco probable (Figura 5).

Deberán proponerse diagnósticos diferenciales para poder definir la condición de estos individuos.

4.1.6 Mutaciones de consecuencias clínicas desconocidas

En el IGM, la búsqueda de mutaciones causantes de FQ se realiza por secuenciación de la secuencia codificante, por lo que es posible que se detecten mutaciones con efectos desconocidos. De esta manera, se seleccionaron los cambios no claros aún a nivel funcional que podrían generar una alteración en la proteína CFTR, y por consiguiente, tener relevancia clínica [12,30]. Estas se trataron de las mutaciones L997F, L967S y Q1463H, halladas en individuos con fenotipo clínico similar a FQ no clásica, la mutación c.2079delT, la cual se encontró en un paciente con FQ y la mutación R170C, hallada en un paciente con AVD asociada al *CFTR* (Tabla 14).

Tabla 14. Mutaciones de funcionalidad desconocida en pacientes con sospecha clínica de FQ

Cambio de secuencia (ref cDNA)	Fenotipo clínico	Test del sudor	Otras mutaciones registradas
c.508C>T = R170C	Adulto AVD. Asesoramiento preconcepcional por esterilidad conyugal	No realizado	pF508del (heterocigosis)
c.2991G>C = L997F	Deposiciones diarreicas y detención del crecimiento. Desnutrición crónica.	No realizado	sin otras mutaciones
c.2900T>C = L967S	Nina de 9 años. Broncoespasmos reiterados. Pautas madurativas levemente retrasadas. Reflujo gastroesofágico.	Test sudor 68. Tres tests de 40-49	sin otras mutaciones
c.2079delT = p.Phe693LeufsX29	FQ	FALTA DATO	L206W
c.4389G>T = Q1463H	11a. 28 internaciones por cuadros obstructivos bronquiales.	Test del sudor 49	sin otras mutaciones

Con el fin de comprender más los posibles efectos de estas mutaciones, se analizó la información clínica reportada de pacientes portadores de estos cambios en las bases de datos *CFMDB* y en su segunda versión, *CFTR2*, el Consenso Europeo de FQ, y bibliografía reportada acerca de individuos portadores de estas mutaciones (Tabla 15) [40; 12,30]. Además, se accedió a la herramienta *online PolyPhen*, la cual predice el posible impacto de una sustitución aminoacídica en la estructura y/o función de proteínas humanas utilizando comparaciones físicas [89].

La predicción generada por *Polyphen* se basa en características dependientes de la secuencia, información filogenética y estructural. Para una sustitución aminoacídica determinada en una proteína, *PolyPhen* extrae distintas características basadas en la secuencia y estructura y les asigna una probabilidad. Para establecer estas probabilidades, utiliza información reportada en bases de datos proteicas como *UniProtKB/Swiss-Prot*, para evaluar la presencia de dominios proteicos en la región de interés y *Protein Data Bank*, para conocer la estructura tridimensional de la proteína o proteínas con identidad de secuencia mayor a 50%, que puedan ser informativas para evaluar el efecto del cambio.

De esta manera, *PolyPhen* asigna tres categorías en función del efecto posible del cambio: *Probablemente deletérea*, *Posiblemente deletérea* o *Benigna* y asigna un puntaje (*score*) de cero para una predicción de *Benigna* y 1 para *Probablemente deletérea*. Si la ausencia de información impide reportar un resultado, la herramienta devuelve “*Desconocido*”.

PolyPhen fue entrenado con dos conjuntos de datos, por lo que es posible obtener dos tipos de predicciones, cada una utilizando uno de estos entrenamientos. Para el análisis de cambios en desórdenes monogénicos, como FQ, que implica distinguir el efecto de un alelo con consecuencias deletéreas entre variantes polimórficas del genoma y otras con efectos leves, se utiliza el predictor *HumVar*.

La Tabla 15 muestra los resultados para cada una de las mutaciones analizadas. La mutación R170C se identificó en pacientes brasileños con pancreatitis, portadores además de la mutación pF508del, pero que, sin embargo, no presentan otras características clínicas sugerentes de FQ [79]. La base de datos *CFMDB* reporta un caso de una paciente con síntomas similares a FQ, pero con concentraciones de cloruro normales y sin otros alelos causantes de enfermedad. La predicción de la herramienta *PolyPhen* la asigna como probablemente deletérea con una puntuación de 0,973.

Tabla 15. Información reportada de mutaciones sin consecuencias clínicas conocidas identificadas en pacientes con FQ.

Cambio de secuencia (ref cDNA)	CFMDB	Consenso Europeo FQ	Bibliografía clínica	Bibliografía funcional	Predicción Polyphen (Hum/Var)
c.508C>T = R170C	Mujer con sospecha de FQ desde los 8 años. Test del sudor de 23 mmol/L sin otra mutación identificada.	Sin referencia	Se encuentra mutación pF508del/R170C en individuo con pancreatitis vinculada con alcoholismo, sin azoospermia, sin problemas pulmonares.	Sin referencia	PROBABLEMENTE DELETEREA: score 0.973 (sensibilidad 0.60; especificidad: 0.93)
c.2991G>C = L997F	Inicialmente reportada como polimorfismo, luego en paciente con FQ y heterocigota para pF508del	Relacionada a Desórdenes Asociados al CFTR	Bibliografía contradictoria acerca de efectos clínicos.	CFTR2 menciona que se mantiene la capacidad de conducir cloruro.	PROBABLEMENTE DELETEREA: score de 0.991 (sensibilidad 0.50; especificidad: 0.95)
c.2900T>C = L967S	Encontrada en individuo con azoospermia	Sin referencia	Bibliografía contradictoria acerca de efectos clínicos.	Sin referencia	POSIBLEMENTE DELETEREA: score de 0.906 (sensibilidad: 0.69; especificidad: 0.90)
c.2079delT = p.Phe693LeufsX29	No descripta	Sin referencia	Sin referencia	Sin referencia	No es posible analizarlo
c.4389G>T = Q1463H	Se evidenció una vez en 2100 cromosomales controles. La mutación fue identificada en un paciente con clínica de FQ, test del sudor borderline y pancreatitis recurrente y portador de dos alelos causantes de enfermedad.	Sin referencia	Sin referencia	Sin referencia	BENIGNA:score de 0.176 (sensibilidad: 0.89; especificidad: 0.73)

En cuanto al cambio L997F, el Consenso Europeo de FQ la reporta como relacionada a Desórdenes Asociados al *CFTR*, mientras que la base de datos *CFTR2* indica que los estudios realizados hasta el momento muestran que mantendría la capacidad de conducir cloruro [40, 12]. La bibliografía clínica es inconclusa acerca del efecto de esta mutación; se han encontrado individuos portadores de otra mutación causante de enfermedad y L997F, con fenotipo de FQ y test del sudor elevado y se la ha asociado también a varios Desórdenes Asociados al *CFTR* [90,91,92,93]. Sin embargo, los pacientes homocigotas para L997F no tienen síntomas de FQ, ni alteraciones en el transporte de cloruro en el epitelio nasal, glándula sudorípara o intestino [94].

Otro trabajo evidencia que la mutación L997F puede encontrarse formando un alelo complejo con la mutación R117L. Pacientes portadores de este alelo complejo presentaron valores de test del sudor más elevados que individuos portadores del alelo L997F sólo. A su vez, estos pacientes presentaron una gran variabilidad en la expresión fenotípica, desde FQ no clásica, o Desórdenes Asociados al *CFTR*. Se propone entonces que L997F participaría en alelos complejos que podrían explicar la diferencia en los síntomas registrados [95].

Finalmente, también se ha mostrado la asociación de L997F con una delección del gen *SPKN1* (*Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor*). Esto podría explicar la alta prevalencia de esta mutación en individuos con pancreatitis recurrente [96]. Esta vinculación es interesante cuando consideramos las manifestaciones clínicas de la paciente: “Deposiciones diarreicas y detención del crecimiento. Desnutrición crónica”. Sería interesante evaluar si su fenotipo no puede ser explicado por episodios de pancreatitis aislados (Tabla 14).

Dada la variabilidad de la información reportada para esta mutación, se justifica evaluarla funcionalmente ya que la predicción de *PolyPhen* le asigna un puntaje de 0,991.

También se encontró la mutación L967S, la cual fue reportada en *CFMDB* en un individuo con azoospermia y *PolyPhen* la predice como “posiblemente causante de enfermedad”, con un score de 0,906 (Tabla 15). Nuevamente, la bibliografía reportada para esta mutación parece ser no concluyente acerca del efecto de esta mutación. Se la identificó en pacientes con síntomas de pancreatitis o sinusitis crónica, ambos posibles en FQ, y se la asigna como no causante de enfermedad, citando a la base de datos *CFMDB*, donde inicialmente fue considerada un polimorfismo [97]. Sin embargo no existe información funcional reportada de esta mutación.

La mutación c.2079delT se encontró en un paciente con FQ. Al analizar el efecto de esta delección en el corrimiento del marco de lectura, se puede ver que el aminoácido del codón

afectado, fenilalanina, cambia a leucina, y finalmente se genera un codón de terminación de la traducción 29 aminoácidos más adelante. El efecto de esta mutación no puede ser predicho en la base de datos *PolyPhen*, ya que la misma analiza cambios de sentido erróneo. La aparición del codón de terminación genera que se produzca casi la mitad del producto proteico (hasta aminoácido 721), por lo que es altamente probable que los efectos de esta mutación sean severos.

La variante Q1463H fue reportada en un paciente con FQ, portador de dos mutaciones causantes de enfermedad identificadas [30]. No existe información clínica o funcional reportada de esta variante y la herramienta *PolyPhen* predijo a Q1463H como *Benigna*, con un score de 0,176.

Todo lo mencionado anteriormente evidencia la información escasa, y en algunos casos contradictoria, de los efectos de mutaciones en el *CFTR*. Insiste a su vez, en la dificultad de la evaluación de estas mutaciones cuando son encontradas en un paciente con síntomas de FQ. Esto las convierte en cambios candidatos para ser estudiados experimentalmente.

4.2 Análisis del uso de codones en el gen *CFTR*.

4.2.1 Uso de codones en el *CFTR* humano

Las mutaciones sinónimas han sido históricamente consideradas neutras en relación a su efecto en la estructura y función de proteínas. Con esta visión, existe un consenso que mutaciones exónicas sinónimas deberían sólo ser consideradas como causantes de FQ si el cambio produce modificaciones de corte y empalme [12]. Sin embargo, existe evidencia que puso en duda esta visión, sugiriendo que mutaciones sinónimas podrían tener un efecto en la estructura de proteínas y/o en su función [45,98, 99, 49, 41,100].

Uno de los estudios con mayor impacto involucró a la glicoproteína P (P-gp), una bomba dirigida por ATP que contribuye a la farmacocinética de drogas que son sustratos de P-gp y a la resistencia multidroga de células cancerígenas [101,102]. Kimchi-Sarfaty *et al.* mostraron en P-gp, por primera vez un cambio funcional luego de un cambio sinónimo (no asociado a cambios en el nivel del ARNm o proteína), el cual había sido previamente reportado en pacientes afectados. Esta mutación se encontró en una región rodeada por codones raros e involucró un cambio de un codón frecuente a otro menos frecuente. Los autores propusieron como explicación a este hallazgo que cuando codones frecuentes son cambiados por codones raros en un *cluster* de codones raros, se afectaría la cinética de plegamiento co-traducciona, resultando en una función alterada.

De forma interesante, P-gp, topológicamente es muy similar al *CFTR* [103]. Considerando esta similitud tan importante y las dificultades actuales en el diagnóstico molecular en pacientes con FQ, nos preguntamos si algunas sustituciones sinónimas podrían afectar también la función del *CFTR*, causando la enfermedad. Como aproximación a explorar esta posibilidad, analizamos el uso de codones del *CFTR* humano.

Para este propósito, determinamos el sesgo de uso de codones humano mediante la determinación de la frecuencia de aparición de codones en las secuencias codificantes humanas disponibles en la versión 58 de la base de datos *Ensembl*. Éstas fueron verificadas manualmente, y secuencias incompletas, repetidas o aquellas conteniendo codones de terminación internos fueron descartadas. Un número final de 14872 secuencias fue obtenido, a partir del cual se calculó el sesgo en el uso de codones humano.

Con el fin de determinar la distribución de codones sinónimos en el *CFTR* humano, se aplicó a la secuencia codificante del *CFTR* el sesgo de uso de codones calculado, mediante el uso del algoritmo previamente reportado, %MinMax [60]. Este algoritmo define la relación entre la frecuencia de uso de codones de un ARNm dado y secuencias hipotéticas codificando la misma

proteína utilizando los codones más raros (mínimo) y más frecuentes (máximo) en función de la media aritmética de todas las posibles frecuencias de uso de codones (Figura 6) [60]. La aplicación del algoritmo %MinMax permite distinguir entonces en una secuencia determinada regiones enriquecidas en codones raros o frecuentes, a las cuales llamaremos *clusters*.

El cálculo de %MinMax para el *CFTR* humano dio un promedio de cinco y un desvío estándar de veinticuatro. Es importante mencionar que un promedio de la secuencia codificante cercano a cero en %MinMax implica que los codones raros y los frecuentes se encuentran representados en igual número en el *CFTR*, resultando en un valor global neutro. Al mismo tiempo, el valor elevado del desvío estándar sugiere la presencia de regiones fuertemente desviadas de esta tendencia neutral. A estas regiones las definimos como *clusters*: frecuentes, los que estarían enriquecidos en codones frecuentes y presentan valores de %MinMax mayores que el promedio más un desvío estándar (%MinMax de 29) y raros, a aquellos enriquecidos en codones raros, donde el resultado del algoritmo es menor que el promedio de *CFTR* menos un desvío estándar (%MinMax de -19).

Con el fin de predecir cuáles mutaciones sinónimas podrían afectar su función, analizamos el uso de codones sinónimos en *CFTR* y lo correlacionamos con dominios proteicos (Figura 11). Los dominios proteicos fueron definidos de acuerdo al modelo tridimensional reportado para el canal [104, 27; 24,26,22]. Los límites de los segmentos transmembrana fueron definidos de acuerdo a los datos experimentales disponibles [103].

La Figura 11 muestra el resultado de %MinMax para el *CFTR* humano y la distribución de *clusters* raros y frecuentes a lo largo de los dominios de *CFTR*. Como se muestra en la figura, tanto *clusters* raros como frecuentes se encontraron distribuidos a lo largo de la secuencia del *CFTR*. Los agrupamientos más evidentes, en particular 8-9 raros y 7-8 frecuentes se alternan a lo largo de la secuencia de *CFTR*.

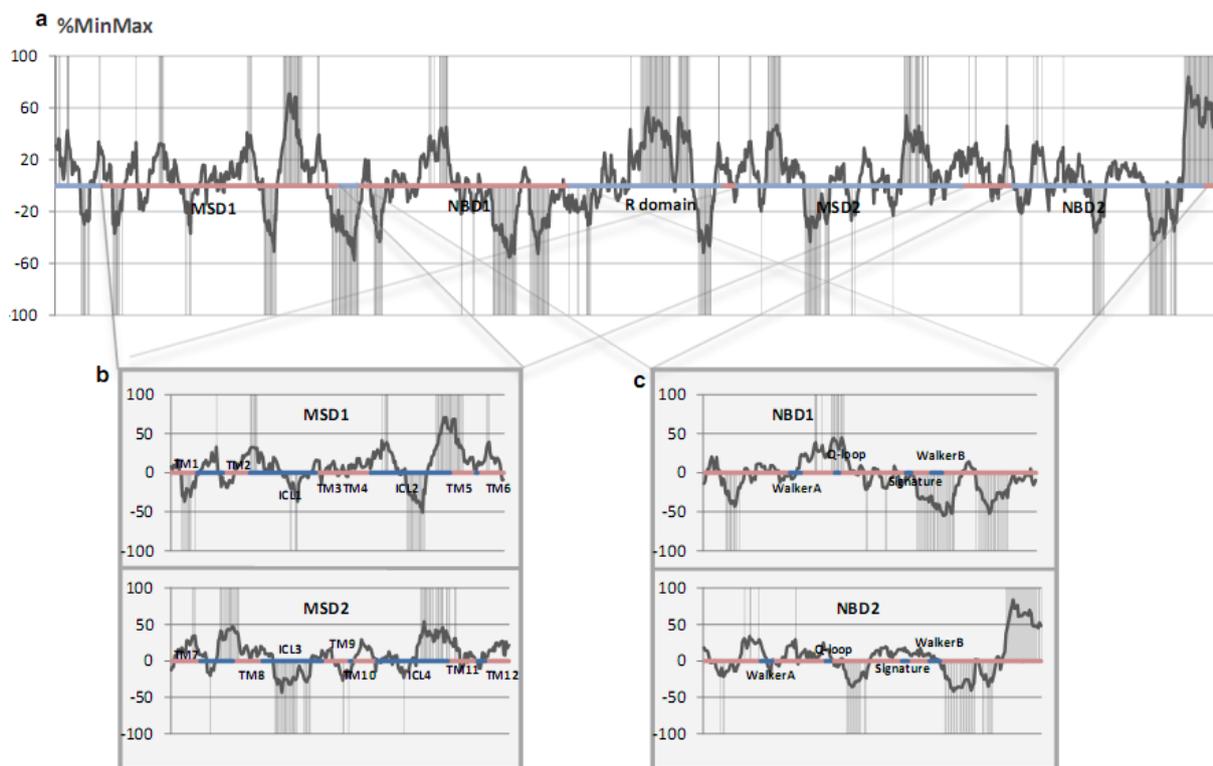


Figura 11. Representación de la secuencia de CFTR humano y la distribución de *clusters* de codones frecuentes y raros a lo largo de la secuencia. (a) El resultado del algoritmo es ilustrado a lo largo de los dominios de CFTR y representado para el noveno codón de la ventana. Las barras grises verticales representan *clusters* raros o frecuentes. (b) y (c) Resultado de %MinMax y la distribución de *clusters* raros y frecuentes para los dominios MSDs y NBDs, respectivamente. Se indican los segmentos transmembrana (TM) y las secuencias involucradas en la unión a ATP: Walker A, Walker B, Q-loop, y Signature.

Ya que la estructura del CFTR sería simétrica (posee dos NBDs y dos MSDs), se analizó la distribución de *clusters* en los dominios de membrana y de unión a nucleótido en paralelo (Figura 11b y 11c). Al comparar los dominios MSD, se puede visualizar que la región central de tres de los cuatro bucles intracelulares del CFTR está codificada por codones raros. Además, se puede observar un *cluster* frecuente en el extremo carboxilo terminal del segundo bucle intracelular de ambos MSDs, el cual se extiende al quinto segmento transmembrana. En cuanto a los NBDs, los resultados también presentaron cierta simetría: la región codificante entre los motivos de unión a ATP, *Q-loop* y la secuencia *Signature*, como también la secuencia inmediata al Walker B se encuentran, en ambos dominios, enriquecidas en codones raros (Figura 11c). A su vez, ambos dominios presentan un *cluster* raro codificando el inicio de la secuencia aminoacídica.

4.2.2 Conservación en Primates y otros mamíferos de agrupamientos de codones raros/frecuentes del CFTR.

Con el objetivo de comprender si las tendencias de uso de codones encontradas para CFTR humano pueden tener una relevancia funcional, estudiamos el uso de codones del CFTR en Primates.

Se construyeron tablas de uso de codones para los ocho primates cuyas secuencias codificantes se encontraban disponibles en la versión 58 de base de datos *Ensembl* y se realizaron comparaciones de a pares de sus tablas de uso de codones. Éstas mostraron correlaciones lineales importantes ($r^2 > 0,9607$; $p < 0.001$), lo que demuestra que el sesgo de uso de codones se encuentra conservado entre los primates estudiados y por consiguiente, existe un conjunto común de codones frecuentes y raros. Cuando se analizó este sesgo más en detalle encontramos que, para todos los aminoácidos, los codones sinónimos más y menos frecuentemente utilizados se encontraban conservados (Tabla 1 Anexo).

Con el objetivo de determinar la distribución de codones sinónimos en la secuencia codificante del CFTR de Primates, se aplicó el algoritmo %MinMax para estos organismos. Como era de esperar, organismos evolutivamente cercanos mostraron resultados de %MinMax más similares (Tabla 2 Anexo). Con la excepción de *O. Garnettii*, todos los primates presentaron un promedio de %MinMax cercano a cero, sugiriendo que existiría una presencia comparable de codones raros y frecuentes. El valor del desvío estándar obtenido fue consistentemente alto en todos los primates, indicando la presencia de regiones fuertemente desviadas de esta tendencia basal. El criterio aplicado para definir clusters raros y frecuentes fue el mismo que para CFTR humano.

Luego de aplicar el algoritmo %MinMax a todos los primates, determinamos la presencia de *clusters* conservados de codones raros y frecuentes. Un *cluster* conservado se definió cuando, para esa posición del alineamiento, el resultado de %MinMax era consistentemente frecuente o raro para todos los primates. La Figura 12 muestra el resultado de %MinMax para todos los primates estudiados y la localización de *clusters* conservados raros y frecuentes a lo largo de dominios de CFTR. En conjunto, se encontraron doce regiones enriquecidas en codones raros y ocho regiones enriquecidas en codones frecuentes conservadas a lo largo de los primates estudiados (Figura 12).

Estas regiones pueden llegar a comprender hasta 47 tripletes. Sin embargo en general, el valor más extremo se encontró limitado a una región más específica, de cerca de 18-20 codones. Creemos que ésta se corresponde con la región específica donde tripletes con las frecuencias

más extremas aparecen agrupados y por consiguiente, constituye el *cluster* raro/frecuente real. Los valores más extremos para los *clusters* frecuentes alcanzaron valores de %MinMax tan elevados como 80 (Figura 12). De forma similar, *clusters* raros resultaron con valores de -60. Estos valores extremos del algoritmo %MinMax sugiere que la mayoría de los codones utilizados en estas regiones son los más extremos para cada aminoácido.

Encontramos que los *clusters* raros en *CFTR* parecen estar concentrados en los dominios amino-terminales de la proteína (Figura 12). El *cluster* con menor valor de %MinMax se encontró en la región inter-dominio entre MSD1 y NBD1. Otros agrupamientos con valores bajos se encontraron en el extremo carboxilo terminal de MSD1 y NBD1 (Figura 12).

Los *clusters* de codones raros han sido identificados en regiones inter-dominio de proteínas, y la frecuencia de aparición de estos agrupamientos se observó que aumenta al aumentar el número de dominios de una proteína [105]. Cambios sinónimos en estas regiones de codones raros por codones utilizados con mayor frecuencia, produjeron un cambio en el patrón de digestión de la proteína con bajas concentraciones de Proteinasa K, sugiriendo que se presentarían cambios en su conformación [106]. A su vez, cuando los ARNt que reconocen a estos codones raros, fueron agregados en un sistema de traducción *in vitro* de tal manera que su concentración sea similar a la de especies de ARNt abundantes, se observó que la proteína producida era muy lábil a la digestión limitada con proteasas, sugiriendo que era incapaz de poder ser plegada eficientemente [106].

Los *clusters* frecuentes se encontraron distribuidos homogéneamente a lo largo de los dominios del *CFTR*. El *cluster* frecuente con mayor valor de %MinMax se encontró en la cola carboxilo-terminal de la proteína. Otros *clusters* con valores elevados de %MinMax se encontraron en MSD1 y el dominio R. Si bien los codones frecuentes, al encontrarse reconocidos por ARNt de mayor abundancia, se creen que serían importantes en la incorporación rápida y eficiente de aminoácidos, los agrupamientos de codones frecuentes no han sido descritos en la hasta el momento con efectos funcionales [107].

El hecho que exista una conservación en el sesgo en el uso de codones sinónimos en Primates, permite concluir que la conservación de codones sinónimos en una región, puede ser traducida en una conservación de frecuencia de codones. Por lo tanto, nuestros hallazgos de conservación de *clusters* pueden entonces corresponderse con regiones con secuencias conservadas (tanto a nivel del gen como de la proteína) las cuales, por azar, son codificadas por codones raros o frecuentes.

Por consiguiente, con el objetivo de caracterizar más en profundidad las tendencias encontradas, se calculó la tasa de sustitución sinónima, dS. Este valor representa el número de sustituciones sinónimas por sitio sinónimo y por lo tanto puede ser interpretada como una medida de conservación de secuencia nucleotídica. El cálculo simultáneo de %MinMax y dS permite determinar si un *cluster* conservado presenta conservación de codones sinónimos o, si esta conservación de frecuencia es en realidad independiente de la conservación de secuencia.

Se calculó el dS global para cada grupo monofilético que identifica a los primates estudiados: *Catarrhini*, *Platyrrhini* y *Lemuriformes*. Los codones sinónimos fueron considerados conservados cuando dS se encontró consistentemente por debajo del promedio de dS en cada uno de los grupos monofiléticos. Los resultados muestran que algunos *clusters* presentaron conservación de codones sinónimos en toda su extensión, otros mostraron sólo en una proporción, y un tercer grupo de *clusters* no presentaría una conservación de codones sinónimos (Figura 12).

Cuando analizamos los hallazgos de *clusters* conservados más en detalle, notamos que cinco de los ocho *clusters* frecuentes no presentaron conservación de codones sinónimos, y que, de forma interesante, los de valor de %MinMax más elevado no presentaron conservación de codones sinónimos (Figura 12). Estos resultados implican que, para la mayoría de los *clusters* frecuentes, la conservación de la secuencia no sería la fuerza principal en determinar los patrones de conservación de frecuencia registrados. En cuanto a los doce *clusters* raros conservados, cinco presentaron una conservación parcial de codones sinónimos, cuatro no presentaron conservación de codones sinónimos y tres sí (Figura 12).

Evaluamos luego si el criterio aplicado para definir conservación de secuencia es preciso, para lo que determinamos si en regiones previamente descritas como conservadas en el *CFTR*, detectábamos zonas con bajo dS. Encontramos un dS bajo en secuencias descritas como portadoras elementos regulatorios de *splicing*; una de ellas, localizada en el exón 13 (que se extiende del codón 561 a 589) y otra, localizada en el exón 10 (que se extiende desde el codón 404 a 464) [108, 109, 110]. En ninguno de los casos el valor de dS bajo se extendió en la totalidad del exón, lo que puede ser explicado por la distribución alternada de estos elementos regulatorios.

La concordancia de estos hallazgos con lo previamente reportado apoya y valida los criterios utilizados para definir conservación de secuencia. En aquellos *clusters* conservados caracterizados por cambios sinónimos, al conservarse la tendencia general de la frecuencia, probablemente los cambios presentes involucren tripletes igualmente frecuentes.

El hallazgo de regiones con frecuencias de uso de codones conservadas en *CFTR* a lo largo de Primates, sugiere una implicancia funcional. La ausencia de una conservación de secuencia extensa en algunas de estas regiones permite descartar la presencia de factores regulatorios dependientes de secuencia nucleotídica como una explicación de estos resultados. No podemos descartar tampoco la posibilidad que *clusters* con bajo dS (con secuencia conservada) presenten al mismo tiempo conservación basada en la frecuencia.

Consideramos luego que si las regiones conservadas encontradas en este estudio son de relevancia funcional, deben ser conservadas también en otros organismos portadores del *CFTR* más distantes evolutivamente. Por consiguiente, aplicamos el algoritmo %MinMax a distintos mamíferos, como ratón, cerdo, perro, caballo, conejo, cabra y oveja (resultados no mostrados).

Este análisis reveló que tres de los *clusters* frecuentes y cinco de los *clusters* raros encontrados en Primates también se presentan en estos organismos (Figura 12, *clusters* identificados con asteriscos). De hecho, la mayoría de las regiones más extensas que presentaron un uso de codones extremo en Primates, también fueron halladas en mamíferos relativamente distantes (ver Figura 12, *clusters* raros en NBD1 y *cluster* frecuente en cola carboxilo terminal). La conservación de estas regiones en un grupo evolutivo más amplio enfatiza la posibilidad de una implicancia funcional.

%MinMax

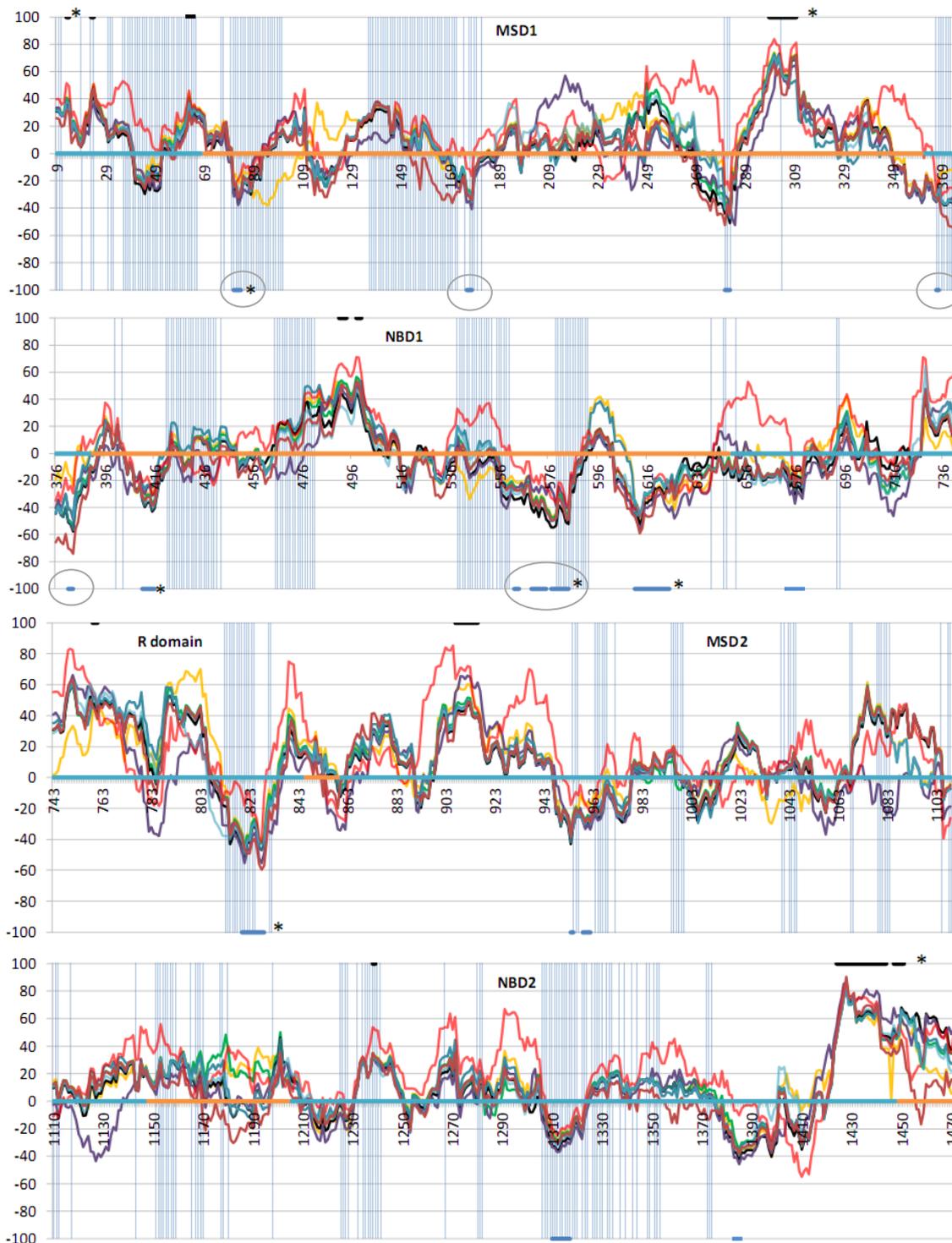


Figura 12. Representación de %MinMax de Primates y las tendencias dS (CFTR humano es la referencia). Los resultados de %MinMax se muestran para los ocho organismos estudiados; amarillo, *Callithrix jacchus*; verde, *Gorilla gorilla*; negro, *Homo sapiens*; violeta, *Microcebus murinus*; turquesa, *Macaca Mulatta*; rojo, *Otolemur garnettii*; celeste, *Pongo pygmaeus abelli*; marrón, *Pan troglodytes*. Regiones con restricción en sustituciones sinónimas se muestran como columnas azules. Clusters raros y frecuentes conservados se representan como líneas azules y negras, respectivamente. Los asteriscos indican los clusters conservados en mamíferos. Los círculos grises indican los sitios donde se realizaron mutaciones y evaluados en el sistema experimental. En orden amino terminal a carboxilo terminal fueron llamados cluster1, cluster2, cluster4 (fragmentado, cada fragmento se indica con un círculo) y cluster6.

4.2.3 Mutaciones sinónimas reportadas en el CFTR.

Más de 1900 mutaciones se han identificado en el gen *CFTR* y un número importante todavía permanece con efectos funcionales desconocidos. Sin embargo, cuando una mutación sinónima se encuentra en un paciente con síntomas clínicos de la enfermedad, es considerada sin dudas como un polimorfismo [12].

Con el objetivo de correlacionar los hallazgos de *clusters* de codones conservados con las mutaciones sinónimas descritas en el *CFTR*, se descargaron todos los cambios sinónimos reportados en las bases de datos *CFMDB*, *Ensembl*, *dbSNP* (*Entrez*), y el estudio más amplio de mutaciones sinónimas en *CFTR* en 1500 individuos de la población general [58, 111, 112, 30]. Encontramos que 87 cambios sinónimos han sido reportados en la secuencia codificante del gen (Tabla 14). De los cambios sinónimos reportados en la base de datos *CFMDB*, todos son referidos como “variantes de secuencia”, asignación que la base de datos aplica cuando no se conoce si se trata o no de una variante causante de enfermedad. Aunque algunas de estas mutaciones se encontraron en pacientes con síntomas clínicos de FQ, para la gran mayoría no se encuentra disponible información clínica [30] (Ver Tabla 16).

Once de los cambios sinónimos reportados están localizados en un *cluster* raro/frecuente conservado (Tabla 16). De las cinco mutaciones identificadas en agrupamientos frecuentes conservados, tres presentan cambios a codones menos frecuentes, mientras que las restantes involucrarían un cambio entre codones con igual frecuencia de uso (Tabla 16 filas verdes). En cuanto a los seis cambios registrados en los agrupamientos de codones raros, cuatro presentarían un cambio de frecuencia a un codón más frecuente, mientras que las dos restantes involucran cambios hacia codones menos frecuentes (Tabla 16 filas rojas). Si bien, lamentablemente, no se dispone de información fenotípica de los individuos portadores de estos cambios sinónimos, todos involucran variantes de la proteína candidatas a ser analizadas funcionalmente.

La evidencia de agrupamientos de codones raros y frecuentes en *CFTR* conservados en Primates y otros mamíferos, sumado al hallazgo de mutaciones en estas regiones en individuos con presentación clínica similar a FQ, sugiere una vinculación funcional. Consideramos que las mutaciones sinónimas en estas regiones deben ser evaluadas con atención.

Tabla 16. Mutaciones sinónimas en el *CFTR* reportadas en las bases de datos [40, 12,58, 111,112,30]

Residuo	Codón cambiado	Cambio de frecuencia	CFMDB	Ensembl	Entrez	Modiano et al, 2005	Entrez Variation ID	Información fenotipo disponible CFMDB
8	AAG > AAA		-	√	√	-	rs1800071	S/I
24	TTG > TTA	12,8 > 7,6	-	√	√	-	rs55773134	S/I
25	AGG > AGA	12,1 > 12,1	-	-	√	-	rs78131838	S/I
49	CTA > CTG		√	-	√	-	-	S/I
71	AAT > AAC		√	-	√	-	rs1800075	S/I
111	CCG > CCA		√	-	-	-	-	S/I
119	ATC > ATT		√	-	-	-	-	S/I
120	GCG > GCA		√	√	√	-	rs1800077	S/I
139	CAC > CAT		√	-	-	-	-	S/I
160	ATT > ATA		√	-	-	-	-	S/I
203	ATC > ATT		√	√	√	-	rs1800081	S/I
209	GCA > GCG		√	-	-	-	-	Pacientes con fenotipo de FQ o CAVD heterocigotas para pF508del.
246	AAG > AAA		-	√	√	-	rs35033453	S/I
247	TAC > TAT		√	-	√	-	rs1800082	S/I
305	TTT > TTT	19,8 > 17	√	√	√	-	rs1800083	S/I
309	GCC > GCG	28,0 > 7,9	-	√	√	-	rs1800084	S/I
318	GTG > GTA		√	-	-	-	-	S/I
320	TTA > TTG		√	-	-	-	-	Paciente con presentación clínica de FQ sin mutaciones causantes de enfermedad identificadas.
322	GTG > GTA		√	-	-	-	-	S/I
324	CCC > CCG		-	√	√	-	rs1799834	S/I
344	ATT > ATA		√	-	-	-	-	S/I
367	GCA > GCT	16,0 > 18,5	√	-	-	-	-	S/I
383	TTG > TTA		-	-	-	√	-	S/I
388	ACG > ACT		-	√	√	-	rs1800088	S/I
403	GAG > GAA		-	√	√	√	-	S/I
418	AAT > AAC		-	√	√	-	rs62469440	S/I
426	GAC > GAT		-	√	√	-	rs2896225	S/I
443	GAT > GAC		√	-	-	-	-	S/I
455	GCG > GCT		-	-	√	-	rs79074685	S/I
480	GGT > GGC		√	√	√	-	rs1800090	S/I
507	ATC > ATT		√	-	-	-	-	En pacientes homocigotas y heterocigotas para pF508del
527	GAA > GAG		√	√	√	-	rs1800094	S/I
528	GAG > GAA		√	√	√	√	rs1800095	S/I
544	GGT > GGG		-	-	-	√	-	S/I
547	ACA > ACT		√	√	√	-	rs1800096	S/I
577	TAC > TAT	14,8 > 12,0	√	√	√	-	rs55928397	S/I
599	ACT > ACA		√	-	-	-	-	Paciente con presentación clínica de FQ
644	CTC > CTG		√	-	-	-	-	S/I
650	TTT > TTT		-	-	-	√	-	S/I
684	AAA > AAG		-	-	√	-	rs79471689	S/I
702	CTC > CTG		√	√	√	-	rs1800102	S/I
748	C>T		-	-	-	√	-	S/I
749	CTG > TTG		√	-	-	-	-	S/I
753	AGC > AGT		√	-	-	-	-	S/I
760	ACG > ACA		√	-	-	-	-	S/I
829	TTA > TTG	7,6 > 12,9	√	-	-	-	-	S/I
853	ATT > ATC		√	√	√	-	rs1800104	S/I
854	ACT > ACG		√	√	√	√	rs1042077	S/I
854	-		√	-	-	-	-	S/I
857	AAG > AAA		-	-	-	-	-	S/I
868	GUA > GUG		-	√	√	-	rs1800105	S/I
893	GGG > GGT		√	-	-	-	-	Paciente con FQ atípica, portadora de mutación G542X en el otro alelo del CFTR.
904	GCA > GCT		√	-	-	-	-	S/I
908	ACC > ACT		√	-	-	-	-	Paciente con clínica sugerente de FQ
912	TCG > TCA		√	-	-	-	-	S/I
923	GCC > GCT		√	√	√	-	rs1800108	S/I
936	CCA > CCG		√	-	-	-	-	Mutación en paciente con FQ con la mutación 5T en el otro alelo
940	ACT > ACG		-	√	√	-	rs60887846	S/I
945	TCG > TCA		√	-	-	-	-	S/I
966	ACG > ACA	5,9 > 15,0	-	√	√	√	rs1800109	S/I
1059	TTA > TTG		√	√	√	-	rs1800113	S/I
1067	GCC > GCT		√	-	√	-	rs1800115	S/I
1068	TTT > TTT		√	√	√	-	rs1800116	S/I
1084	TTA > TTG		√	√	√	-	rs1800117	S/I
1095	ACA > ACT		√	√	√	√	rs1800118	S/I
1102	AGA/AGG		√	-	-	-	-	Paciente con FQ y pF508del en el otro alelo
1113	GCT > GCC		√	-	√	-	rs1800119	S/I
1115	ACC > ACA		-	-	-	√	-	S/I
1168	GAC > GAT		√	-	-	-	-	S/I
1186	CAA > CAG		√	√	√	√	rs1800121	S/I
1198	GTG > GTT		√	√	√	-	rs1800122	S/I
1216	ACA > ACC		√	-	-	-	-	S/I
1227	TTA > TTG		-	-	-	√	-	S/I
1245	AGA > AGG	12,1 > 12,1	√	√	√	-	rs1800128	S/I
1253	TTG > TTA		√	-	-	-	-	S/I
1269	ATC > ATT		√	√	√	-	rs1800129	S/I
1290	CCA > CCG		√	√	√	√	rs1800130	S/I
1299	ACA > ACG		√	√	√	√	rs1800131	S/I
1306	CCC > CCT	20,2 > 18,0	√	√	√	-	rs1800132	S/I
1318	GTT > GTC	10,9 > 14,2	√	√	√	-	rs1800133	S/I
1399	CTC > CTT		-	-	√	-	rs79688066	S/I
1408	CTG > CTA		√	√	√	-	rs1800134	S/I
1424	TAC > TAT		√	√	√	√	rs1800135	S/I
1444	TCC > TCT		√	-	-	-	-	S/I
1463	CAG > CAA		√	√	√	√	rs1800136	S/I
1475	GTG > GTA		√	-	-	-	-	S/I
1477	GAT > GAC		-	-	-	√	-	S/I

S/I: sin información reportada en CFMDB [30]. En rojo se indican las mutaciones en *clusters* de codones raros y en verde de codones frecuentes. Se indica la frecuencia por mil de los codones iniciales y finales.

4.3 Diseño de un sistema cuantitativo para evaluar la localización sub-celular del CFTR.

Mutaciones en el *CFTR* pueden generar una disminución en la cantidad de proteína sintetizada, alteraciones en la conductancia del canal de cloruro, o defectos en su maduración con consecuente disminución de proteína en la membrana celular. Además de pF508del, varias otras mutaciones generan alteraciones en el transporte intracelular del CFTR. De hecho, numerosas mutaciones de cambio de aminoácido causantes de enfermedad afectan el plegamiento de CFTR y llevarían la forma glicosilada inmediatamente a su degradación. Algunos de los cambios descritos que alteran la maduración de la proteína son: pI507del, K464M, F508R, S549I, I601F, L610S, A613T, D614G, I618T, L619S, H620P, G628R, L633P, G85E, G91R, R1070P, R1070Q [113, 32, 114, 115, 116].

Dado el elevado número de mutaciones en el *CFTR* con consecuencias desconocidas, y los posibles efectos de mutaciones en su localización sub-celular, nos propusimos diseñar un sistema que permita evaluar el efecto de mutaciones en la distribución de la proteína en células de mamífero. Para esto, se construyó una proteína de fusión de GFP con CFTR la cual fue transfectada en líneas celulares de epitelio, donde el CFTR normalmente es expresado.

4.3.1 Clonado del CFTR en el vector de expresión pEGFP-C1

Al clonar el ADNc de *CFTR* en el vector de expresión pEGFP-C1, la proteína fluorescente GFP se fusionó al extremo amino-terminal de CFTR, y ambas proteínas se encontraron unidas por un péptido de siete aminoácidos (SGLRSRA) (Figura 7). Esta construcción de GFP-CFTR fue reportada previamente y se mostró que no afecta la localización ni funcionalidad del canal [117]. En este vector, la expresión de GFP está regulada por el promotor fuerte de citomegalovirus, por lo que en la construcción la activación de este promotor dará lugar a la expresión de la proteína de fusión GFP-CFTR.

Como se describe en la sección de materiales y métodos, el clonado en pEGFP-C1 se realizó por PCR del *CFTR* para incorporar los sitios de restricción de enzimas *XhoI* y *PstI* el que luego fue clonado en el vector pGEM-T. El corte con las enzimas de restricción *XhoI* y *PstI* liberó al *CFTR* del plásmido pGEM-T Easy recombinante y permitió insertarlo en pEGFP-C1. Se confirmó la presencia de la construcción GFP-CFTR mediante PCR de *CFTR*, digestión del plásmido con *XhoI* y *PstI* y por secuenciación de la cola carboxilo terminal de GFP, el péptido que une a GFP con CFTR y al ADNc del *CFTR* humano. La Figura 13a muestra el producto de PCR de aproximadamente 4500 pb, concordante con la longitud del ADNc del *CFTR*. La Figura 13b muestra el tamaño del vector pEGFP-C1 luego de la ligación con *CFTR*, de aproximadamente 10000 pb.

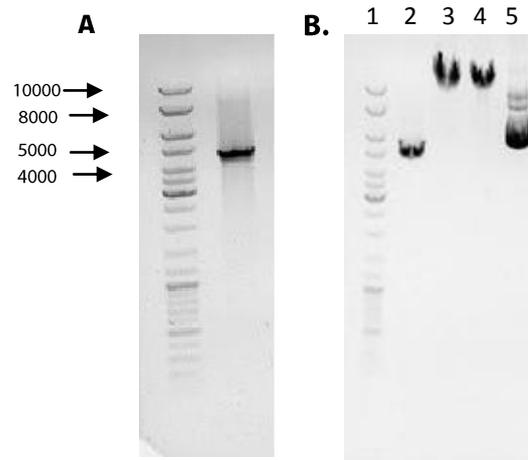


Figura 13. Clonado de *CFTR* en pEGFP-C1. (A) Se confirmó la presencia del inserto por PCR de *CFTR*. Carril izquierda MPM Fermentas GeneRuler 1kb Mix (Fermentas Life Technologies). Se muestra el peso molecular de los fragmentos de interés. (B) Digestión de pEGFP-C1 con las enzimas *XhoI* y *PstI*. Carril 1: MPM Fermentas GeneRuler 1kb Mix, carril 2: doble digestión con *XhoI* y *PstI*, carril 3: digestión con *XhoI*, carril 4: digestión con *PstI*, carril 5: plásmido sin digerir.

4.3.2 Expresión de GFP-wtCFTR y GFP-pF508delCFTR en células MDCK polarizadas.

Como criterio para la elección de la línea celular para expresar la proteína de fusión GFP-CFTR, se consideró su capacidad de crecimiento en monocapa, de polarización y la eficiencia de transfección. Dos líneas celulares fueron evaluadas: la de epitelio de riñón canino, MDCK, y la línea celular de epitelio pulmonar humano, 16HBE14o⁻.

El epitelio formado por 16HBE14o⁻ presenta crecimiento celular en capas. Muy difícilmente las células se encuentran formando una monocapa y no todas las células se encuentran polarizadas. La eficiencia de transfección en estas células para el plásmido pEGFP-C1 conteniendo GFP-wtCFTR, fue de 0,25%. El bajo nivel de polarización de las células 16HBE14o⁻ sumado con la baja eficiencia de transfección resultó que por lo general, las células transfectadas eran las no polarizadas.

MDCK, por otra parte, presentó grados de polarización adecuados y crece de forma homogénea formando una monocapa. Su eficiencia de transfección para pEGFPC1-wtCFTR fue 0,19%. En base a sus muy buenas propiedades como modelo de línea celular de epitelio, y al tratarse de una línea celular extensamente utilizada en estudios de polarización, la localización sub-celular del CFTR fue analizada en MDCK.

Las células MDCK fueron transfectadas con las construcciones correspondientes a la proteína salvaje fusionada a GFP (GFP-wtCFTR) y al CFTR portador de la delección de F508 también fusionado a GFP (GFP-pF508delCFTR).

Para el análisis de la localización subcelular, se registraron conjuntos de planos (*stacks*) xy a lo largo del eje z por microscopía confocal de fluorescencia de las células transfectadas seleccionadas al azar. Como se muestra en la Figura 14, tanto el marcado basolateral p58, como el marcado apical gp135, se distribuyeron apropiadamente, evidenciando el estado de polarización de estas células (Figura 14a y 14b, panel superior). GFP-wtCFTR se distribuyó mayoritariamente en la membrana apical (Figura 14b panel inferior) mientras que GFP-pF508delCFTR mostró una localización citoplasmática (Figura 14c panel inferior).

Con el fin de evaluar más precisamente la localización del mutante, GFP-pF508delCFTR fue expresado en células MDCK crecidas en cubreobjetos. Esto permite visualizar mejor su distribución, ya que el citoplasma se encuentra más extendido. De esta manera, puede visualizarse en este mutante un patrón reticular similar al del marcador del retículo endoplásmico, calnexina (Figura 14d). Estos resultados muestran que GFP-wtCFTR y GFP-pF508del se distribuyen de acuerdo a información previamente reportada, sugiriendo que el sistema empleado en este estudio sería apropiado para la búsqueda del efecto de mutaciones en la localización del CFTR.

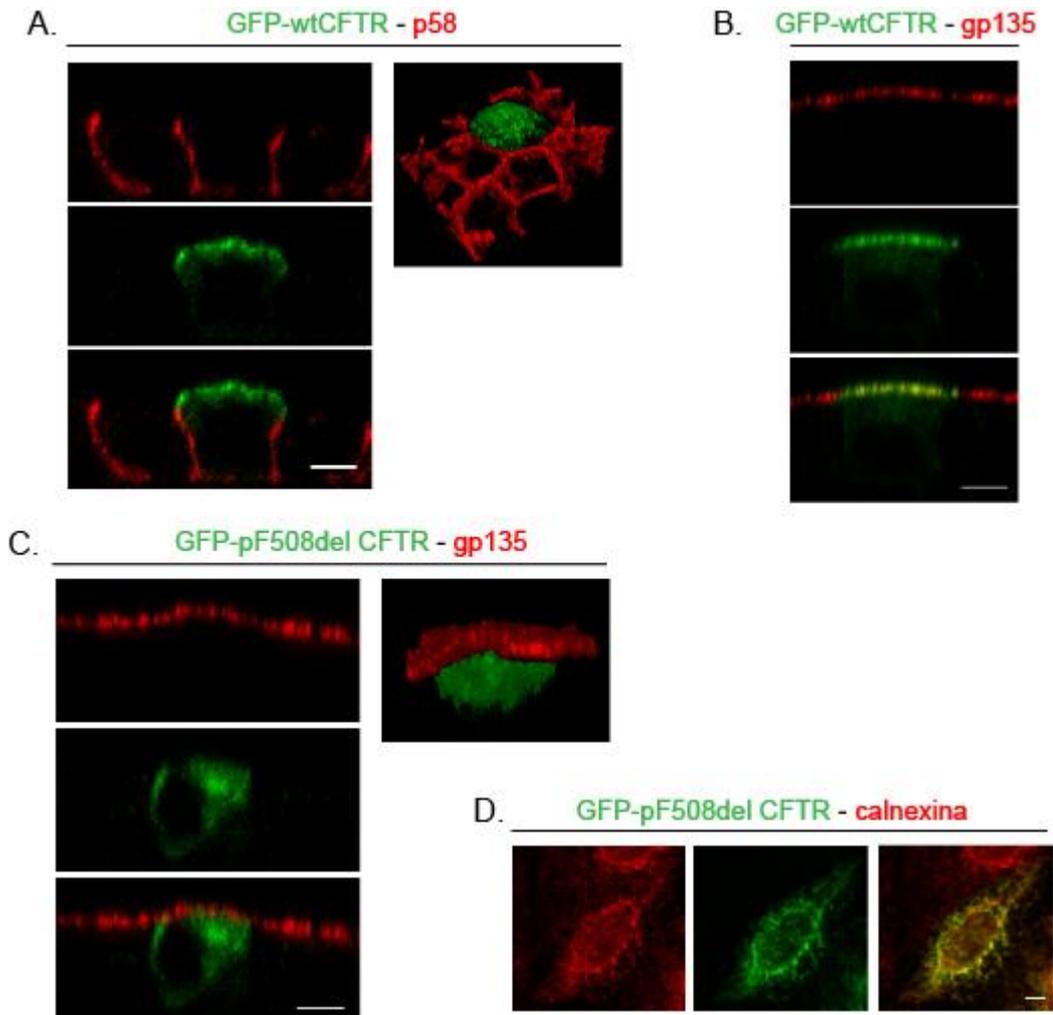


Figura 14. Expresión de GFP-wtCFTR y GFP-pF508delCFTR en células MDCK. Micrografías de microscopía confocal de fluorescencia (planos xz) de células MDCK polarizadas expresando transitoriamente GFP-CFTR y marcadas con el marcador basolateral p58 (A) o el marcador apical (B,C). Plano xy de células MDCK crecidas en cubreobjeto expresando transitoriamente GFP-pF508del y marcadas con el marcador del retículo endoplásmico calnexina (D). A,B. GFP-wtCFTR se localiza principalmente en la membrana apical. C y D. GFP-pF508del presenta localización similar al retículo endoplásmico. Reconstrucciones tridimensionales de células transfectadas (A,C derecha) evidencian la localización. Barras de escala representan 5 μ m.

4.3.3 Cuantificación de CFTR apical a través de análisis de imágenes.

Con el fin de cuantificar la presencia del CFTR ubicado en la membrana apical, consideramos la intensidad de fluorescencia de GFP-CFTR en una región definida por el marcador apical. Este valor fue normalizado respecto a la intensidad de GFP-CFTR en toda la célula, obteniéndose un valor de cociente de CFTR apical.

Para este propósito, se registraron *stacks* en *xy* a lo largo del eje *z* de células seleccionadas al azar, imágenes adquiridas con parámetros ajustados para coincidir el rango de intensidad de fluorescencia de la muestra con el rango disponible de valores de *voxel* (es decir, evitar valores de *voxel* de cero y saturación). Las imágenes fueron capturadas con los parámetros que se indican en la sección de materiales y métodos (ver 3.3.19). Los límites del *stack* fueron definidos consistentemente de tal manera que el límite basolateral se encontrara dos micras por debajo de la posición del núcleo (marcado con TO-PRO 3) y el límite apical se encontrara dos micras por encima de la marca apical de gp135.

Para calcular el cociente de CFTR apical, se trabajó con cortes en planos *xz* de los canales correspondientes al marcador apical y a CFTR. La región que se definirá como “apical”, está determinada por la marca de gp135, a partir de la cual se definió una máscara. Esta “máscara apical” fue definida con un método automático de determinación de valor de umbral para imágenes, elegido así para que la región resultante sea restringida. Esto se logró con el método *Otsu*, el cual fue aplicado de forma independiente a cada plano *xz* de la imagen [118] (Fig. 15a). De esta manera, todos los *voxels* que se encontraron por encima del valor umbral, definieron la máscara apical, mientras que los que se encontraron por debajo, adquirieron un valor de cero. Con el fin de eliminar *voxels* correspondientes a ruido en el canal del CFTR, también se aplicó una máscara para CFTR (también aplicando el método *Otsu*), y al conjunto de *voxels* resultante de esta operación se les denominó “CFTR en toda la célula”.

La máscara apical fue luego intersectada con “CFTR en toda la célula” con la operación “AND” de *ImageJ*, devolviendo como resultado los valores de intensidad de “CFTR apical” (Figura 15a). Se proyectaron los planos *xz* para ambos canales en un único plano, de tal manera que las intensidades correspondientes a los puntos con las mismas coordenadas en *xz* de todos los planos, se encontraran representadas en un único punto del plano *xz*. Posteriormente, se midió el valor de densidad integrada de los planos proyectados, para “CFTR apical” y “CFTR en toda la célula”. La relación entre estos valores determina el valor de “cociente de CFTR apical” (Figura 14b).

Este procedimiento de análisis de imágenes se organizó en un *macro* para su aplicación automática en las imágenes a analizar utilizando el programa *ImageJ*. La Tabla 3 del Anexo detalla la descripción del *macro* utilizado.

El “cociente de CFTR apical” se calculó para alrededor de diez células en cada uno de los cuatro experimentos independientes realizados, resultando en un valor promedio de (0.55 +/- 0.07) para GFP-wtCFTR y (0.18 +/- 0.03) para GFP-pF508delCFTR (Figura 14c). Estos valores mostraron una diferencia significativa ($p < 0,0001$). Concluimos entonces que este método sería capaz de evaluar cuantitativamente la diferencia entre CFTR localizado en la membrana apical para wtCFTR y para pF508delCFTR.

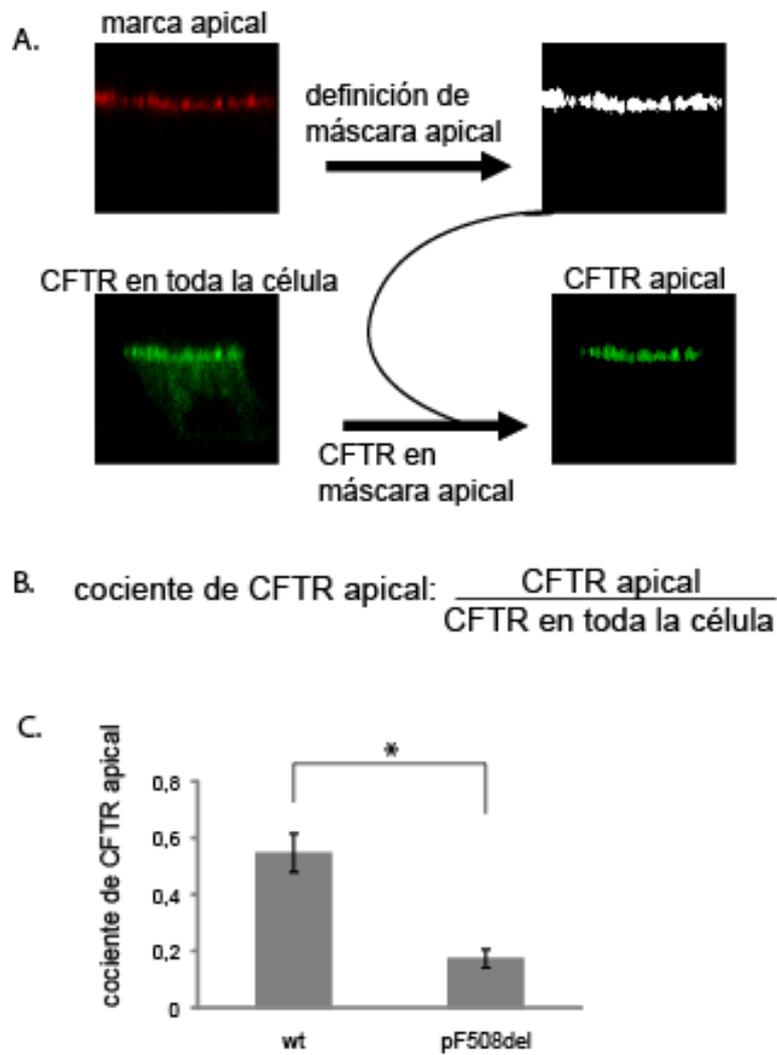


Figura 15. Cuantificación de CFTR apical a través de análisis de imágenes. (A) Esquema del procedimiento de análisis cuantitativo de imágenes. Un corte en xz de la marca de gp135 es utilizado para definir la máscara apical con el método de determinación de valor umbral *Otsu*. El corte en xz de GFP-CFTR es superpuesto con la máscara apical, resultando en CFTR apical. (B) Definición de “cociente de CFTR apical”. (C) Valores del “cociente de CFTR apical” para GFP-wtCFTR y GFP-pF508del CFTR. El asterisco indica un valor $p < 0.0001$. Aproximadamente diez células fueron analizadas en cada uno de los cuatro experimentos independientes realizados.

4.3.4 Deconvolución de imágenes confocales aumenta el rango dinámico del sistema.

La resolución de la imagen es un aspecto esencial en esta aproximación metodológica, por lo tanto, se consideró mejorarla mediante la aplicación de deconvolución, una técnica de restauración de imagen que ha tenido un impacto profundo en estudios de colocalización [119].

La deconvolución es una operación matemática aplicada con el fin de recuperar una imagen que se encuentra degradada por procesos físicos (convolución), como por ejemplo la formación de imágenes por sistemas ópticos. La convolución por consiguiente, explica matemáticamente la degradación de una imagen por ruido y borrosidad. El grado de borrosidad obtenido en un objeto correspondiente a un único punto es una medida de la calidad de un sistema óptico y la imagen resultado de este punto se le conoce como *point spread function (psf)*. De esta manera, la función *psf* es una medida de la calidad de un sistema óptico.

La deconvolución puede aplicarse utilizando una *psf* calculada teóricamente de acuerdo a los parámetros de la imagen, o con una función calculada experimentalmente, la cual reflejaría otras deformaciones posibles de la imagen resultantes de las condiciones experimentales. De esta manera, se calculó la *psf* experimental de nuestro sistema en condiciones similares a las que se realizaron los experimentos, utilizando esferas de 175 nm de diámetro, inferiores a la resolución del microscopio (200 nm). La Figura 16 muestra la forma de esta función.

Como se puede observar en la Figura 16, el corte en el plano yz para la función en el canal verde y xz para la función *psf* roja presentan una leve inclinación. Esta asimetría en el eje z puede ser explicada por la existencia de una discordancia del índice de refracción entre el medio de montaje (1,518) y el medio de inmersión (1,42) de nuestras muestras [120]. Este factor causa aberración esférica, fenómeno por el cual el punto de foco de rayos centrales que inciden en la muestra es distinto del de rayos que ingresan de forma oblicua a la misma. El efecto de la discordancia de índices de refracción es más importante en puntos más profundos en la muestra [120]. Esto genera entonces que la función *psf* cambie con la profundidad de la muestra.

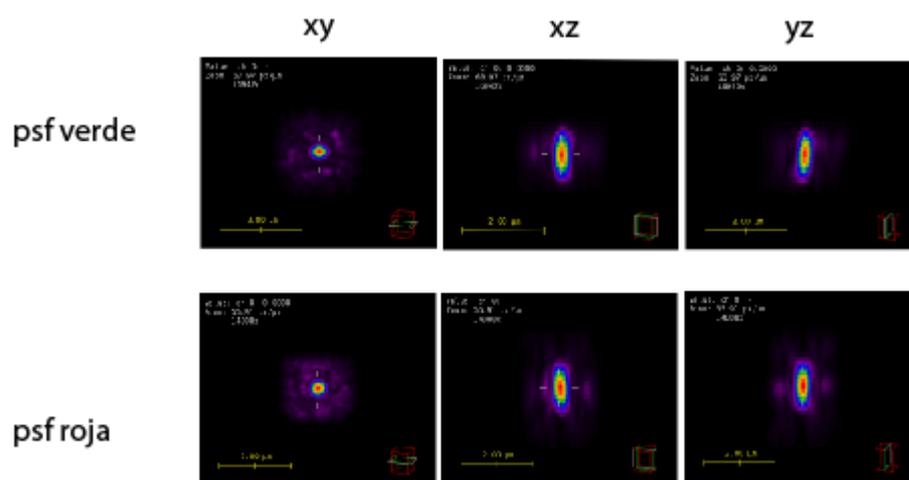


Figura 16. Función *psf* para los canales verde (488nm) y rojo (543nm). Se muestran los cortes en los planos xy, xz e yz para cada una de las funciones.

Los programas disponibles de deconvolución permiten ajustar el efecto de la discordancia del índice de refracción con la profundidad de la muestra, al utilizar una *psf* calculada teóricamente (llamada *psf* teórica o adaptativa) con los parámetros ingresados de la imagen de interés (deconvolución “ciega”). Dado que en este momento no es posible hacer este ajuste para la función adquirida experimentalmente, y la relevancia de esta discordancia del índice de refracción en la resolución de la imagen confocal, se utilizó la *psf* teórica en el proceso de deconvolución.

De esta manera, aplicamos deconvolución “ciega” en los canales de GFP-CFTR y gp135 y determinamos el cociente de CFTR apical para la forma salvaje de la proteína y para pF508del. Previamente, se evaluaron distintos parámetros de deconvolución (número máximo de iteraciones, “umbral de calidad” y relación señal/ruido), obteniendo una mayor restauración de la señal en la imagen para un número máximo de 500 iteraciones, 0,001 de “umbral de calidad” y 20 de relación señal/ruido (Ver Figura 1 Anexo).

Como se muestra en la Figura 17, los patrones de distribución del marcador apical y de CFTR ya eran evidentes en las imágenes sin procesar, y fueron aún potenciados luego de la deconvolución (Figura 17a). A su vez, al analizar los patrones de intensidad de las imágenes deconvolucionadas trazando un vector en planos xy, puede evidenciarse que los mismos se corresponden con aquellos obtenidos para imágenes sin procesar (Figura 17b). Por lo tanto, el procesamiento de deconvolución aplicado no eliminaría ni crearía características artefactuales con respecto a las imágenes originales.

Las imágenes procesadas presentaron, en comparación con las sin procesar, un cociente de CFTR apical aumentado en un 15% para GFP-wtCFTR y disminuido en 44% para GFP-pF508del CFTR, apartando los límites de nuestro sistema (Figura 17c). Por consiguiente, la deconvolución aumentó aproximadamente en dos veces el rango dinámico de nuestro sistema, ofreciendo una mayor posibilidad de discernir poblaciones con un fenotipo intermedio.

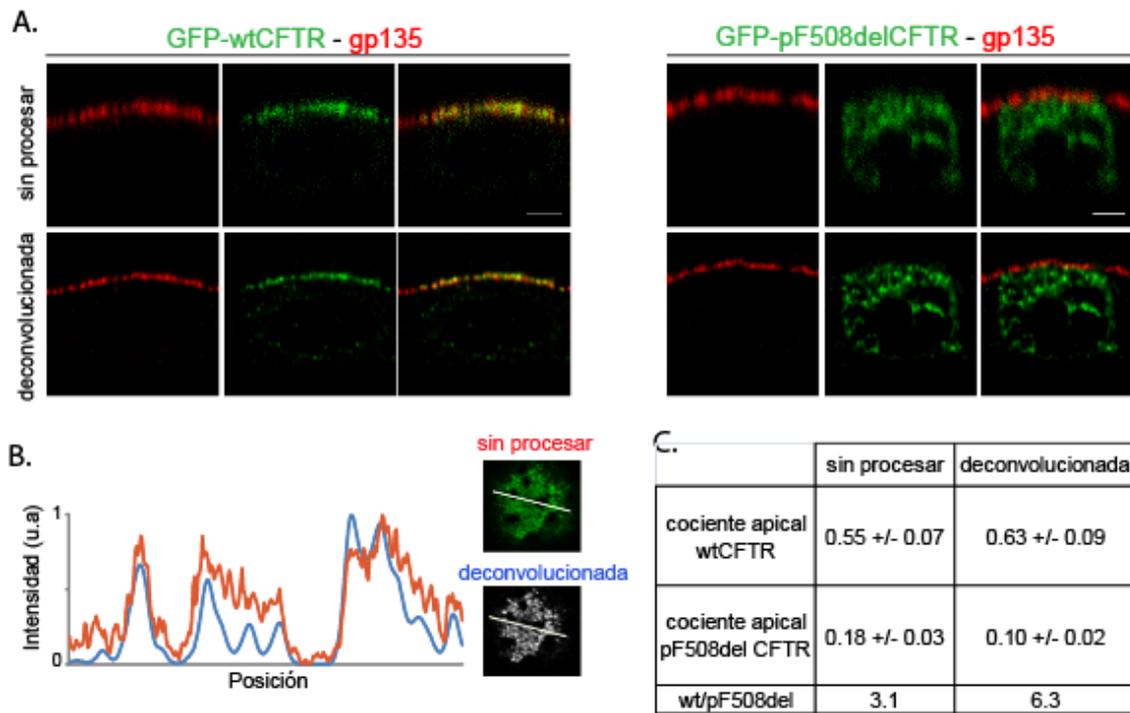


Figura 17. Deconvolución de imágenes confocales aumenta el rango dinámico del sistema. (A) Patrones de distribución del marcador apical y GFP-CFTR (wt y pF508del) se visualizan en imágenes sin procesar (paneles superiores) y son potenciados luego de la deconvolución (paneles inferiores). Barras de escala representan $3\mu\text{m}$. (B) Patrones de intensidad de GFP-CFTR de un vector en un plano confocal xy para imágenes sin procesar (rojo) o deconvolucionadas (azul). La superposición indica la similitud de los patrones. (C) “Cociente de CFTR apical” para wt y pF508del se presentan como el promedio +/- desvío estándar para cuatro experimentos independientes. Los valores de la relación wt/pF508del ilustran que la deconvolución mejora en dos veces el rango dinámico del sistema.

4.3.5 Detección del rescate de pF508 por temperatura.

Con el fin de validar nuestro sistema, se midió el “cociente CFTR apical” para el mutante pF508del incubado a 27°C durante 24hs. Esta condición ha sido reportada que restaura parcialmente la localización del pF508del-CFTR, ya que evita el control de calidad del retículo endoplásmico, y permite a la proteína continuar hacia la membrana [33].

De esta manera, las células MDCK fueron transfectadas con GFP-pF508del e incubadas por 24 hs a 27°C (pF508del-27C). En concordancia con la información reportada previamente, nuestro sistema fue capaz de detectar una restauración parcial de pF508del-27C, con un “cociente CFTR apical” promedio de 0.30 +/- 0.02, el que fue adicionalmente aumentado por deconvolución a 0.34 +/- 0.02 (Figura 18). Estos resultados permiten concluir que este método de análisis de imágenes es capaz de discriminar fenotipos intermedios y, por consiguiente sería apropiado para detectar mutaciones que afectan parcialmente la llegada del CFTR a la membrana apical.

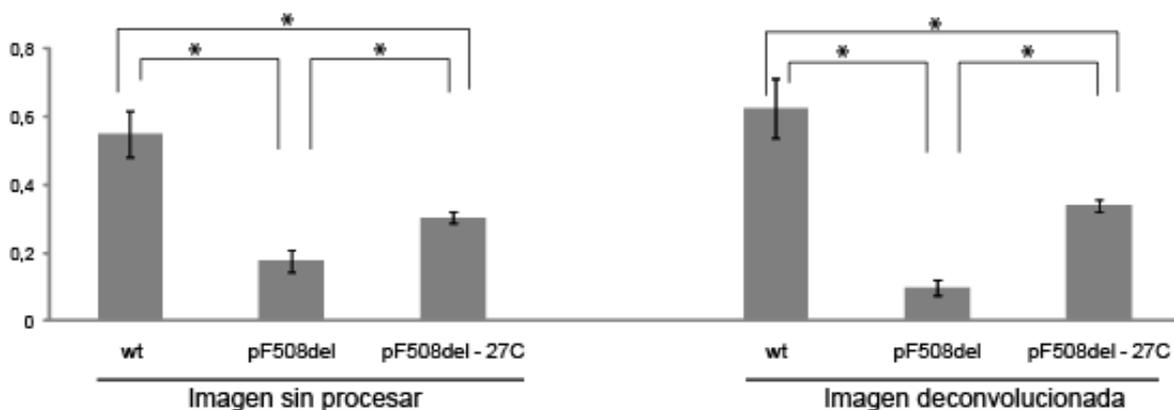


Figura 18. Detección del rescate por temperatura de pF508del. Se representa el “cociente de CFTR apical” para wt, pF508del y pF508del-27C para imágenes sin procesar y deconvolucionadas. Todas las comparaciones par-par fueron significativas (asteriscos indican $p < 0.0001$).

4.3.6 Presentación de un sistema cuantitativo para evaluar la localización sub-celular del CFTR por análisis de imágenes

Para poder establecer el efecto de mutaciones desconocidas en la localización de la proteína, es necesario cuantificar la distribución de la proteína en la célula. Distintos métodos para medir la densidad del CFTR en la superficie celular están disponibles. Por ejemplo, el aislamiento por medio de streptavidina-agarosa de proteínas de superficie biotiniladas seguido del estudio por *immunoblot* con anticuerpos anti-CFTR. Este ensayo utiliza el hecho que CFTR es sometido a glicosilación, y que la adición de un oligosacárido basal de manosa involucra un aumento en 2-3kDa en el peso molecular aparente de la proteína, evidenciado por SDS-PAGE. De esta manera, CFTR se puede encontrar en su forma no glicosilada (referido usualmente como “Banda A”), glicosilada basal (referida como “Banda B”), y glicosilada compleja (“Banda C”). Ya que estas tres formas presentan distintas movilidades electroforéticas, la biotinilación seguida del análisis por *Western blot* permite revelar el estado de procesamiento del CFTR. Sin embargo, esta aproximación experimental es laboriosa y tiene relativamente baja sensibilidad. A su vez, como la Banda C representa la forma madura de la proteína, la cual se encontraría en la membrana celular, en muchos trabajos se realiza *Western blot* de CFTR sin previa biotinilación y se asigna la cantidad de CFTR en banda C como la proteína que se encuentra en membrana [113]. Sin embargo, conclusiones obtenidas de esta manera pueden ser incorrectas, ya que no toda la forma glicosilada compleja puede encontrarse en membrana, así como también pueden presentarse formas glicosiladas basales en este compartimento [114].

Otro método actualmente empleado es la generación de líneas celulares que expresan de forma estable variantes del CFTR con pequeñas modificaciones en su cuarto loop extracelular, dada la ausencia de anticuerpos específicos para los bucles extracelulares de la proteína. Estas líneas celulares son luego usadas en ensayos de ELISA que detectan a CFTR en la superficie por anticuerpos que reconocen estas modificaciones y se amplifica la señal por quimioluminiscencia o reacciones de fluorescencia [121,122]. Aunque este método es más sensible, involucra la generación de líneas celulares y resulta más apropiado para evaluar potenciales “correctores” de la localización del defecto impuesto por pF508del.

En cuanto a estudios de localización del CFTR evaluados por microscopía, hasta la fecha, han sido limitados a inspección visual. Un antecedente importante relacionado a estudios de localización del CFTR en membrana apical es el de Moyer *et al.*, del año 1999. Este grupo diseñó un sistema de cuantificación de CFTR en membrana apical, el cual relativiza esta cantidad a lo expresado en la membrana basolateral [123]. Para esto, se trabaja con cortes en xz de células transfectadas con CFTR, se delimitan áreas rodeando la membranas (apical y

basolateral), se cuantifica la fluorescencia del CFTR en estas regiones, y se calcula la relación apical/basolateral. Consideramos que la medición llevada a cabo en este estudio es un tanto imprecisa, ya que los límites de la región son determinados manualmente. El ancho de estos compartimientos ($2\mu\text{m}$) se encuentra por encima de la resolución en el eje z de nuestro sistema (ver más adelante) [123].

Recientemente Almaca *et al.* publicaron un método elegante, basado en microscopía de fluorescencia que usa una construcción de CFTR con la proteína fluorescente *mCherry* y una etiqueta FLAG en su cuarto bucle extracelular [124]. En células sin permeabilizar, la marca de FLAG permite cuantificar al CFTR localizado exclusivamente en la superficie celular, mientras que la fluorescencia de *mCherry* indica su expresión en toda la célula. De esta manera, se determina la relación de CFTR en la membrana plasmática, a partir del cociente de la marca del FLAG (evidenciada con un anticuerpo secundario unido a un fluoróforo que es excitado a 488 nm) y la fluorescencia de *mCherry*. Llama la atención al respecto que estas intensidades de fluorescencia son comparadas directamente, sin una previa normalización. Es decir, se relativizan dos intensidades correspondientes a fluoróforos distintos, como si las moléculas individuales de los fluoróforos presentaran una misma intensidad.

En este trabajo, se evaluó la llegada a la membrana del CFTR mediante la cantidad en la membrana apical en relación a su expresión en toda la célula. Dado que este sistema involucra una expresión transitoria de CFTR, es probable que los niveles de expresión sean distintos para las distintas células, por lo que el número de moléculas en la membrana apical pueda cambiar: dos células pueden presentar niveles distintos de intensidades en membrana apical causados por niveles de expresión del CFTR diferentes. El hecho de relativizar la cantidad en membrana apical con respecto a la expresión en toda la célula, permite normalizar la cantidad de proteína que llega a la membrana en función del nivel de expresión.

Este método cuantitativo permitió detectar un 63% de GFP-wtCFTR y un 10% del GFP-pF508CFTR del en la membrana apical. Estudios previos de cuantificación de CFTR en membrana, que analizan los datos de forma comparable al de este estudio, muestran resultados similares. El trabajo de Denning, analiza wtCFTR y pF508del-CFTR expresados transitoriamente en fibroblastos de la línea 3T3. Se identifica por *Western blot* la cantidad de proteína inmunoprecipitada, se cuantifica por radioactividad las bandas A, B y C y se determina la relación banda C / bandas A + B + C, como medida relativa de cantidad de proteína capaz de llegar a membrana [33]. Esta metodología obtuvo una relación de 80% para wtCFTR, mientras que para pF508del-CFTR el valor fue menor a 5%.

El trabajo de Denning *et al.* encontró valores para ambas formas del CFTR más distantes en comparación con los obtenidos en este estudio. Distintos factores pueden determinar estas diferencias. En primer lugar, dado que CFTR en membrana no es aislado por biotilación en el trabajo de Denning *et al.*, es posible que una fracción de la banda C en realidad no se encuentre aún en la membrana, y por consiguiente se esté sobreestimando la cantidad de CFTR en este compartimiento. A su vez, CFTR fue expresado de forma estable, por lo que pueden haberse presentado menores niveles relativos de expresión. Una mayor expresión del CFTR en nuestro sistema podría explicar los menores niveles relativos de wtCFTR y mayores niveles de pF508del-CFTR en membrana apical: la sobreexpresión podría saturar el sistema de transporte intracelular, reteniendo wtCFTR en el citoplasma y forzando pF508del hacia la membrana.

Sin embargo, probablemente la limitante principal del sistema desarrollado en este trabajo es su resolución axial (a lo largo del eje z). El microscopio confocal presenta una resolución axial cercana a 500 nm y, si bien en este trabajo ésta fue mejorada luego de la deconvolución (la que restaura de dos a cuatro veces la resolución axial), no se logra alcanzar un valor del orden del ancho de membrana plasmática (de unos pocos nanómetros). Por consiguiente, existe una región en el área de la membrana que se superpone con la zona sub-apical de la célula, lo que puede generar que moléculas de proteína ubicadas en esta región sean consideradas como si se encontraran en membrana (y viceversa).

El sistema diseñado y puesto a punto en este trabajo permite, mediante el registro, procesamiento y análisis de imágenes de microscopía confocal, conocer la capacidad de llegada a membrana de mutantes del CFTR. Este método es capaz de detectar variantes del CFTR que llegan parcialmente a la membrana, por lo que permite evaluar, no sólo mutantes que no afecten la llegada a membrana (fenotipo tipo proteína salvaje) o que afecten severamente la llegada a membrana (fenotipo tipo pF508del), sino que además sería capaz de detectar fenotipos intermedios. Sería interesante poder evaluar el límite de resolución de este sistema, para lo que deberían considerarse fenotipos aún más cercanos entre sí de los evaluados en este estudio.

Esta aproximación metodológica presenta ventajas frente a las disponibles, como por ejemplo que se obtienen resultados producto del análisis célula a célula. Estudiar a una población a partir de sus miembros individuales permite caracterizarla más en profundidad, hecho que no es posible al trabajar con metodologías que reportan el resultado de la población, donde las variaciones de la población se encuentran ocultas en el promedio. Para el estudio del CFTR en particular, esta situación se presenta con metodologías como *Western Blot*, una técnica

aplicada de forma rutinaria para evaluar efectos de mutaciones en la maduración de la proteína. A su vez, este método permite obtener diferencias significativas entre las distintas condiciones a partir del análisis de 10 células por condición por experimento. Esto lo convierte en un método práctico desde el punto de vista del poco tiempo necesario para obtener resultados concluyentes.

Luego del análisis de la información fenotípica y molecular de pacientes con FQ de Uruguay, encontramos variantes del CFTR de consecuencias clínicas desconocidas (R170C, L997F y L967S) las cuales son candidatas a ser evaluadas por este sistema. Además, otras mutaciones con consecuencias funcionales desconocidas halladas en pacientes afectados con FQ y reportados en bases de datos también deben ser analizadas funcionalmente, y por consiguiente son candidatas a ser analizadas por esta metodología. Finalmente, las regiones con conservación en la frecuencia de uso de codones halladas en este estudio, podrían ser evaluadas por este sistema.

En todos estos casos, no debemos olvidar que para descartar una vinculación de la mutación encontrada con la enfermedad, otras características del CFTR también deben ser evaluadas, en particular, si afectan su conductividad y regulación.

4.3.7 Evaluación de mutantes sinónimos de CFTR en el sistema experimental.

Con el fin de explorar si alguno de los *clusters* de codones hallados en el estudio teórico del CFTR afectaba la llegada de la proteína a la membrana apical, se construyeron mutantes sinónimos. Nos preguntamos si la localización del CFTR se vería afectada si regiones conservadas de codones raros eran sustituidas por tripletes de mayor frecuencia. Modificamos los agrupamientos de codones raros ubicados más hacia el extremo amino-terminal de la proteína, los que, de tener un rol en el plegamiento del CFTR, podrían afectar más severamente su conformación.

Se modificaron cuatro agrupamientos de codones raros, se identificó el punto en el que el algoritmo %MinMax (para CFTR humano) alcanza el valor más bajo, región que se correspondería con una mayor concentración de codones raros. Se identificaron los tripletes en esta región con frecuencia de aparición en el genoma inferior a 8/por mil codones, los que fueron sustituidos por el codón sinónimo más frecuente para el mismo aminoácido. Los *clusters* cambiados se muestran en la Figura 12. Los aminoácidos involucrados y los cambios nucleotídicos generados para cada *cluster* se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. *Clusters* de mutaciones sinónimas indicando el aminoácido cuyo triplete fue mutado, y los nucleótidos cambiados.

	Aminoácido con cambio sinónimo	Nucleótidos cambiados (CDS CFTRh)
Cluster 1	R75	223C>A
	L88	262T>C
		264A>G
	L90	268T>C
		270A>G
Cluster 2	R170	508C>A
	L172	510T>A
	I175	516A>G
		525A>C
Cluster 4	L375	1123T>C
		1125A>G
	L387	1159T>C
		1161A>G
	T388	1164G>C
		1176A>C
Cluster 6	L570	1708T>C
		1710A>G
		1711T>C
	L571	1713A>G
	L578	1734A>G
	L581	1741T>C
	1743A>G	
		1758A>C

Es importante mencionar que, dado que el fin de estos cambios es evaluar la relevancia de los agrupamientos de codones raros en la localización de la proteína, debemos evaluar si existe un sesgo en el uso de codones conservado entre humanos y el organismo del cual la línea celular utilizada es originaria. De esta manera, se compararon las tablas de uso de codones humano (calculado en este estudio) y canino (Tabla de uso de codones reportada en la base de datos KazUSA) [125]. Se obtuvo un valor de coeficiente de correlación lineal $r^2=0,9593$ lo que sugiere una semejanza importante entre ambos sesgos (ver Tabla 4, Anexo). Particularmente, para los aminoácidos modificados, se presentan pequeñas diferencias en los valores de frecuencias de aparición de los codones, que originan, en algunos casos, una discrepancia sutil en el uso relativo de los codones sinónimos. Consideramos que al mantenerse globalmente el sesgo en el uso de codones, esta línea celular es un modelo experimental apropiado para el estudio de los cambios sinónimos generados.

Se transfectaron células MDCK con cada una de las construcciones cluster1, cluster2, cluster4 y cluster6. Estas construcciones presentaron niveles de eficiencia de transfección equivalentes para la proteína salvaje GFP-wtCFTR y para el mutante GFP-pF508del-CFTR.

Con el fin de conocer si existe una alteración en la llegada a la membrana para los mutantes, determinamos el “cociente de CFTR apical” para cada una de las construcciones de GFP-CFTR (Tabla 18).

Tabla 18. Resultados del “Cociente de CFTR apical” para los agrupamientos de codones raros normalizados con respecto a los valores obtenidos para GFP-wtCFTR.

Cociente CFTR apical mutante / wt	
cluster1	1,0
cluster2	1,1
cluster4	0,9
cluster6	1,1

Tal como se muestra en la tabla 18, la relación del “Cociente de CFTR apical” entre el mutante y la forma GFP-wtCFTR fue igual o cercana a 1, lo que evidencia que los mutantes habrían llegado a la membrana apical en niveles equivalentes a la proteína salvaje. Los valores obtenidos luego de deconvolucionar se mantuvieron el mismo orden. Por consiguiente, el análisis de los mutantes en el sistema celular diseñado mostró que estos cambios no afectarían la llegada de la proteína a la membrana celular, al menos al nivel de sensibilidad que permite detectar este sistema.

Uno de los efectos que podría evaluarse es si estos *clusters* afectan de alguna manera los niveles de ARNm o incluso de la proteína. Consideramos la posibilidad de evaluar el nivel de expresión de la proteína a partir de la medida de la intensidad absoluta de “CFTR en toda la célula”. Sin embargo, dado que los parámetros de adquisición de las imágenes fueron ajustados de tal manera que el rango de valores de píxel se ajustara con el rango de intensidades del CFTR para cada célula, estos valores absolutos de intensidades no pueden ser comparados en forma directa.

También se consideró evaluar el nivel de expresión por *Western Blot*. Lamentablemente, dado el bajo nivel de la eficiencia de transfección, no es posible emplear esta metodología, al menos utilizando esta línea celular. Podrían evaluarse otras líneas, con mayores niveles de eficiencias de transfección para wtCFTR, con el fin de presentar suficiente número de células transfectadas que permita evaluar por esta aproximación el nivel de expresión.

La conservación de estas regiones a lo largo de Primates (y en muchos casos su conservación en los mamíferos analizados), y los hallazgos previos de cambios funcionales luego de mutaciones sinónimas, justifica extender el análisis funcional de estas variantes del *CFTR* empleando otras metodologías.

6. Conclusiones y perspectivas

En este trabajo se presenta el estudio de las mutaciones más frecuentes causantes de FQ en Uruguay, discerniendo entre las distintas formas de presentación de la enfermedad. Tal como lo establece el Consenso Europeo de FQ, mutaciones con una frecuencia superior al 0,5%, deben ser incorporadas en la primer búsqueda de mutaciones en pacientes con sospecha de diagnóstica de FQ [12]. Según nuestro estudio, este es el caso para las mutaciones pF508del, G542X, R334W, R1162X, N1303K y 2789+5 G>A en Uruguay.

Consideramos que los resultados obtenidos contribuirán al desarrollo de un algoritmo de diagnóstico molecular apropiado a nuestra población y podrá reportarse un valor más preciso de la sensibilidad clínica de cualquier sistema de detección de mutaciones. Así podrán disminuir los resultados moleculares de difícil interpretación y los costos del estudio molecular. Creemos que la disponibilidad de esta información contribuirá a optimizar la búsqueda de mutaciones en individuos con sospecha clínica de FQ, pudiendo ofrecer un tratamiento adecuado, mejorando el pronóstico del paciente y brindando asesoramiento genético en familias afectadas. Disponer de esta información será particularmente relevante en la aplicación de la Pesquisa Neonatal de FQ en Uruguay.

En este trabajo se diseñó, puso a punto y validó un sistema cuantitativo que permite, a partir del análisis de diez células por condición por experimento, obtener resultados concluyentes acerca de la consecuencia de una mutación en la localización del CFTR. Este sistema no es sólo capaz de determinar si una variante compromete o no la llegada de la proteína a la membrana celular, sino que además es capaz de detectar mutaciones que afectarían la llegada a la membrana celular en forma parcial. Empleando este sistema se pueden analizar las mutaciones de consecuencias desconocidas encontradas en individuos con FQ y en Desórdenes Asociados al CFTR.

A su vez, el hallazgo de regiones con frecuencia de codones conservadas en el *CFTR*, sugiere una implicancia funcional, y por lo tanto mutaciones sinónimas en el *CFTR* deben ser consideradas con atención.

La FQ es una enfermedad multi-orgánica heterogénea en la que el fenotipo es explicado por un continuo de síntomas. Existe una gran dificultad para establecer el diagnóstico clínico y molecular de la enfermedad. En este estudio se evidencian las dificultades del diagnóstico adicionales en nuestro país producto de no disponer la técnica de la Diferencia de Potencial Nasal, lo que dificulta vincular una disfunción del CFTR al fenotipo clínico.

Las correlaciones clínicas, paraclínicas y moleculares evidenciadas en este estudio deben ser consideradas durante el proceso diagnóstico de FQ. Consideramos que las herramientas presentadas en este trabajo contribuirán a simplificar el diagnóstico molecular de FQ en

nuestro país, y a entender más acerca del efecto de las variantes del CFTR aún no caracterizadas funcionalmente.

La perspectiva inmediata es difundir los resultados de este trabajo. Los hallazgos de las mutaciones más frecuentes encontradas en pacientes de FQ en Uruguay serán publicados para que se encuentren a disposición de la comunidad médica y de pacientes y familias afectadas de nuestro país.

Los datos epidemiológicos recolectados en este estudio, si bien no fueron suficientes para poder estimar la prevalencia de FQ en Uruguay, se pondrán a disposición para cualquier estudio que tenga como objetivo conocer más acerca de la epidemiología de esta enfermedad en nuestro país.

8. Anexo

Tabla 1. Tabla de uso de codones de Primates analizados.

	Frecuencia de aparición*																													
	F						L						I				M				V				S					
	UUU	UUC	UUA*	UUG	CUU	CUC	CUA*	CUG#	AUU	AUC#	AUA*	AUG	GUU	GUC	GUA*	GUG#	UCU	UCC	UCA	UCG	AGU	AGC								
<i>Callithrix jacchus</i>	18,10	19,08	8,56	13,34	14,04	18,41	7,53	37,66	17,00	19,54	8,12	21,34	11,83	13,80	7,78	26,90	16,05	17,01	13,07	4,21	13,24	19,35								
<i>Gorilla gorilla</i>	17,96	19,04	8,54	13,37	13,80	18,47	7,38	37,67	16,76	19,74	8,07	21,29	11,69	13,82	7,61	27,06	16,00	17,27	13,03	4,30	13,09	19,49								
<i>Homo sapiens</i>	17,04	19,79	7,63	12,89	13,29	19,44	7,21	39,48	15,73	20,02	7,46	21,62	10,89	14,17	7,10	27,69	15,46	17,86	12,47	4,61	12,36	19,83								
<i>Microcebus murinus</i>	16,71	19,89	7,80	12,84	12,82	19,06	6,94	39,55	15,39	20,91	7,64	20,87	10,80	14,82	6,99	28,26	15,08	17,91	11,82	5,12	12,15	20,31								
<i>Macaca mulatta</i>	18,05	19,31	8,41	13,33	13,71	18,65	7,43	38,23	16,66	19,72	7,99	21,41	11,43	13,84	7,58	27,32	15,66	17,19	12,74	4,48	12,92	19,39								
<i>Otlemur garnetti</i>	18,55	18,75	8,90	14,02	14,41	17,87	8,17	36,16	17,40	20,09	8,42	21,58	11,94	14,24	8,09	26,70	16,96	16,66	13,44	3,67	13,92	18,74								
<i>Pongo abelii</i>	17,27	19,30	8,07	13,09	13,45	18,80	7,25	38,82	16,17	20,04	7,82	21,23	11,27	13,98	7,34	27,49	15,62	17,50	12,73	4,52	12,84	20,05								
<i>Pan troglodytes</i>	17,90	19,32	8,37	13,32	13,76	18,72	7,39	38,15	16,69	19,88	7,95	21,57	11,50	13,84	7,48	27,27	15,54	17,23	12,75	4,44	12,86	19,36								
	P						T				A				Y		STOP				H		Q		W					
	CCU	CCC	CCA	CCG	ACU	ACC#	ACA	ACG#	GCU	GCC	GCA	GCG	UAU	UAC	UAA	UAG	UGA	CAU	CAC	CAA	CAG	UGG								
	<i>Callithrix jacchus</i>	18,27	18,74	17,82	6,51	13,75	17,69	15,87	5,59	18,96	26,09	16,75	6,64	12,76	14,57	0,48	0,37	0,78	11,44	14,71	13,03	34,03	12,31							
<i>Gorilla gorilla</i>	18,33	19,13	17,84	6,62	13,63	17,90	15,62	5,71	18,75	26,68	16,55	6,75	12,52	14,46	0,45	0,35	0,76	11,30	14,61	13,08	34,05	12,14								
<i>Homo sapiens</i>	18,04	20,21	17,29	7,49	13,16	18,49	14,97	5,95	18,49	28,04	16,03	7,88	12,05	14,77	0,59	0,46	1,06	10,97	15,03	12,57	34,40	12,52								
<i>Microcebus murinus</i>	17,34	20,54	16,49	7,84	12,67	18,53	14,39	6,96	17,90	28,48	15,56	8,06	11,38	15,67	0,41	0,34	0,76	10,04	15,63	12,39	34,96	12,00								
<i>Macaca mulatta</i>	17,97	19,18	17,40	6,99	13,43	17,79	15,26	5,85	18,69	27,05	16,45	7,28	12,57	14,79	0,51	0,40	0,85	11,25	14,82	12,91	34,08	12,31								
<i>Otlemur garnetti</i>	18,74	17,36	18,02	5,35	14,36	17,56	16,42	5,29	19,74	24,37	16,84	5,31	12,91	14,70	0,45	0,33	0,71	11,48	14,50	13,55	34,11	11,96								
<i>Pongo abelii</i>	18,11	19,74	17,64	7,10	13,39	18,22	15,38	5,97	18,43	27,42	16,21	7,23	12,23	14,70	0,42	0,34	0,74	10,97	15,00	12,96	34,60	12,12								
<i>Pan troglodytes</i>	17,85	19,08	17,36	6,83	13,39	17,78	15,41	5,80	18,75	26,96	16,53	7,12	12,60	14,72	0,53	0,42	0,89	11,33	14,77	13,01	34,07	12,31								
	K		D		E		C		R						G				N											
	AAA	AAG	GAU	GAC	GAA	GAG	UGU	UGC	CGU*	CGC	CGA*	CGG	AGA#	AGG	GGU	GGC	GGA	GGG	AAU	AAC										
	<i>Callithrix jacchus</i>	26,46	31,65	23,31	24,70	32,06	38,59	10,56	11,93	4,56	9,43	6,42	10,69	12,85	11,91	11,07	21,00	17,20	15,59	18,27	18,62									
<i>Gorilla gorilla</i>	26,50	31,93	23,16	24,75	31,77	38,97	10,54	11,95	4,48	9,59	6,21	10,87	12,58	11,94	11,00	21,35	17,03	15,83	18,14	18,72										
<i>Homo sapiens</i>	24,53	31,69	22,02	24,89	29,85	39,90	10,51	12,69	4,54	10,51	6,23	11,49	12,16	12,10	10,67	22,56	16,70	16,83	16,99	18,63										
<i>Microcebus murinus</i>	25,27	32,60	21,63	27,21	30,62	40,58	9,63	12,48	4,25	10,24	6,14	11,69	11,85	11,93	10,11	22,87	16,02	16,47	16,55	19,83										
<i>Macaca mulatta</i>	25,92	31,69	22,93	24,92	31,10	39,13	10,67	12,06	4,52	9,95	6,39	11,20	12,40	11,84	10,89	21,58	16,87	15,88	17,93	18,83										
<i>Otlemur garnetti</i>	27,45	32,27	24,41	24,98	33,37	38,00	10,84	11,30	4,80	8,27	6,53	10,02	13,01	11,68	11,10	19,34	17,12	15,12	18,69	18,98										
<i>Pongo abelii</i>	25,49	31,76	22,65	25,16	31,00	39,62	10,37	12,30	4,43	10,11	6,14	11,30	12,17	11,80	10,69	22,13	16,67	16,07	17,71	18,86										
<i>Pan troglodytes</i>	26,01	31,79	23,12	24,82	31,44	38,95	10,70	12,19	4,44	9,80	6,31	11,08	12,52	11,81	10,80	21,67	17,05	15,86	18,07	18,76										

Se indica en los aminoácidos modificados el codón salvaje con "*" y el codón variante con "#".

Tabla 2. Correlación de %MinMax entre Primates estudiados.

	<i>G. gorilla</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>P. troglodytes</i>	<i>P. abelii</i>	<i>M. mulatta</i>	<i>C. jacchus</i>	<i>O. garnetti</i>
<i>Gorilla gorilla</i>							
<i>Homo sapiens</i>	0,95						
<i>Pan troglodytes</i>	0,86	0,87					
<i>Pongo abelii</i>	0,92	0,91	0,84				
<i>Macaca mulatta</i>	0,89	0,89	0,82	0,90			
<i>Callithrix jacchus</i>	0,77	0,73	0,66	0,73	0,74		
<i>Otlemur garnetti</i>	0,52	0,50	0,47	0,52	0,50	0,43	
<i>Microcebus murinus</i>	0,67	0,89	0,62	0,69	0,64	0,54	0,52

Tabla 3. Macro generado en *ImageJ* para cuantificar CFTR en membrana apical y CFTR en toda la célula

```

selectWindow("cftr.tiff");
run("Reslice [/]...", "slice=0.126 start=Top");
run("Duplicate...", "title=[Reslice of cftr-1] duplicate range=");
selectWindow("Reslice of cftr");
selectWindow("Reslice of cftr-1");
run("Auto Threshold", "method=Otsu white stack");
imageCalculator("AND create stack", "Reslice of cftr","Reslice of cftr-1");
selectWindow("Result of Reslice of cftr");
selectWindow("apical.tiff");
run("Reslice [/]...", "slice=0.126 start=Top");
run("Auto Threshold", "method=Otsu white stack");
selectWindow("Result of Reslice of cftr");
imageCalculator("AND create stack", "Result of Reslice of cftr","Reslice of apical");
selectWindow("Result of Result of Reslice of cftr");
run("Z Project...", " projection=[Sum Slices]");
selectWindow("Result of Reslice of cftr");
run("Z Project...", " projection=[Sum Slices]");
selectWindow("SUM_Result of Result of Reslice of cftr");
run("Set Measurements...", " integrated redirect=None decimal=2");
run("Measure");
selectWindow("SUM_Result of Reslice of cftr");
run("Measure");

```

Las imágenes correspondientes al canal de CFTR fueron denominadas "cftr", y las correspondientes a la marca de gp135, "apical".

Tabla 4. Uso de codones canino [125].

F		L						I			M	
UUU	UUC	UUA*	UUG	CUU	CUC	CUA*	CUG*	AUU	AUC [#]	AUA*	AUG	
17.1	24.4	5.8	11.8	11.7	21.8	6.5	42.8	15.5	25.7	7.2	22.7	
V				S								P
GUU	GUC	GUA*	GUG [#]	UCU	UCC	UCA	UCG	AGU	AGC	CCU	CCC	
9.3	17.2	6.5	31.0	13.8	18.4	9.8	4.6	10.8	18.9	15.6	20.4	
P		T				A				Y		
CCA	CCG	ACU	ACC [#]	ACA	ACG*	GCU	GCC	GCA	GCG	UAU	UAC	
14.6	7.0	12.3	21.4	14.2	7.2	17.2	30.3	13.7	7.9	11.5	17.5	
STOP			H		Q		W	K		D		
UAA	UAG	UGA	CAU	CAC	CAA	CAG	UGG	AAA	AAG	GAU	GAC	
0.6	0.5	1.1	9.0	14.1	11.0	32.6	13.8	22.2	33.9	19.7	26.2	
E		C		R								G
GAA	GAG	UGU	UGC	CGU*	CGC	CGA*	CGG	AGA [#]	AGG	GGU	GGC	
26.4	40.3	10.1	13.8	3.9	10.6	5.6	11.0	10.5	11.1	11.3	24.2	
G		N										
GGA	GGG	AAU	AAC									
16.9	17.4	16.5	21.6									

Se indica en rosa los aminoácidos cuyos codones fueron modificados. Se indica con “*” el codón salvaje, y con “#” el codón variante. A excepción de arginina, todos los aminoácidos cambiados presentan conservado el uso de codones con respecto a humanos.

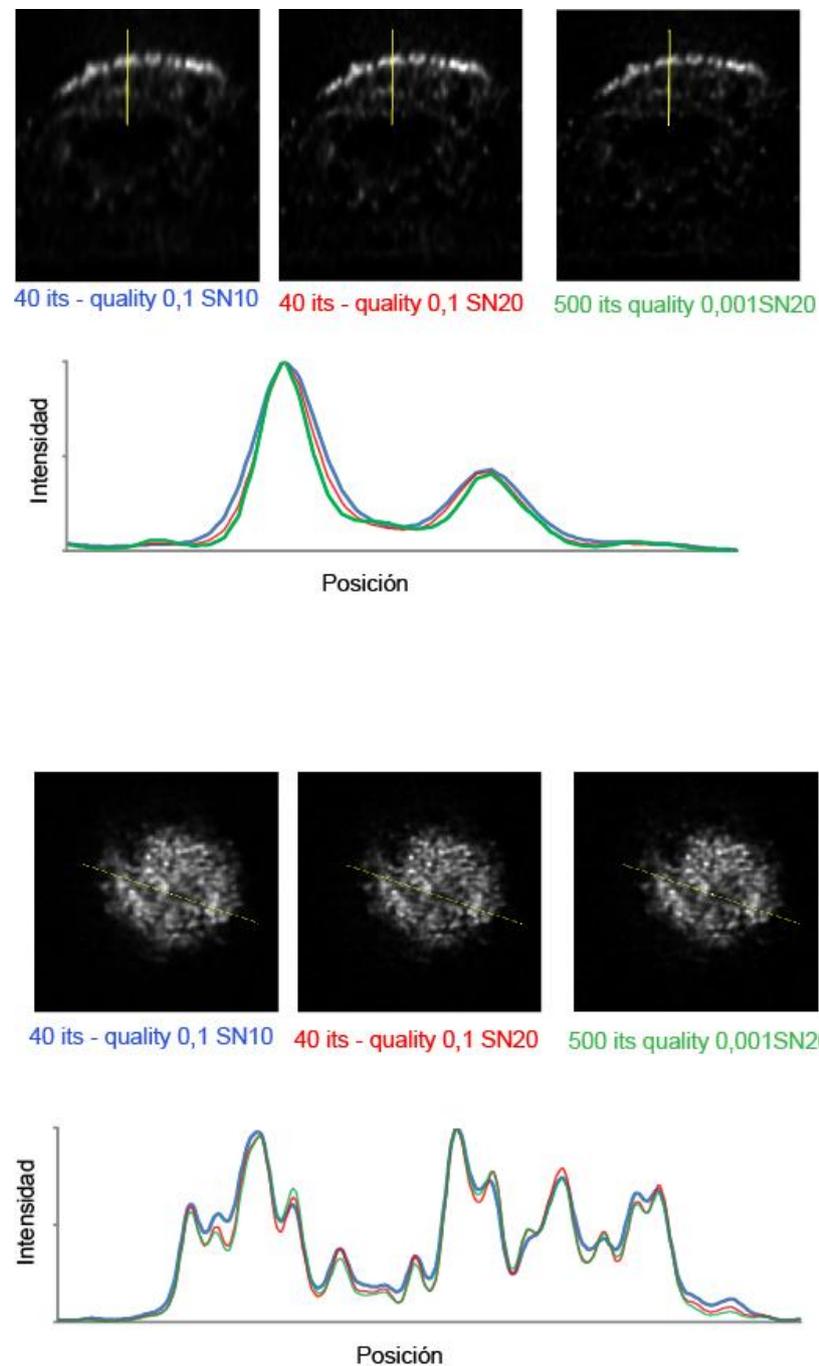


Figura 1. Puesta a punto de parámetros de deconvolución. Se observan planos xz (arriba) y xy (abajo) para una célula expresando GFP-wtCFTR, y los perfiles de intensidades normalizados para un vector trazado en uno de los planos. Para ambos casos, se puede visualizar que la deconvolución con 500 iteraciones, *quality threshold* (“umbral de calidad”) de 0,001 y relación señal ruido (SN) de 20, produce una mejor restauración de la intensidad, con valores más elevados y picos más finos, indicando que la señal se estaría concentrando en una región más restringida.

9. Agradecimientos

Agradecemos al equipo médico del IGM: Dr. Roberto Quadrelli, Dra. Aída Lemes, Dra. Mariela Larrandaburu, Dra. Nélica Montano y Dra. Rosario Gueçaimburú, quienes evaluaron clínicamente a los pacientes estudiados. Además, por las discusiones enriquecedoras con todos ellos que permitieron e impulsaron el desarrollo de este proyecto.

Al equipo de Biología Molecular del IGM, Dra. Sinthia Pagano, Lic. Natalia Sandberg, Marianella Pagano y Nadia Pisano quienes realizaron el estudio molecular del *CFTR* y dispusieron de toda la información encontrada para este trabajo.

Agradecemos a todas las Instituciones que colaboraron con la información clínica y paraclínica de los pacientes afectados con FQ. En particular, a la Policlínica de Gastroenterología del Hospital Pereira Rossell y al Hospital Militar, quienes contribuyeron con la información para poder completar la información clínica de pacientes.

A Andrés Iriarte del Laboratorio de Evolución y Laboratorio de Organización y Evolución del Genoma de la Facultad de Ciencias, con quien hicimos en conjunto el análisis del uso de codones en el *CFTR*.

A Pablo Aguilar y Paola Lepanto, del Laboratorio de Biología Celular de Membranas, del Institut Pasteur de Montevideo quienes participaron en el diseño del sistema celular para determinar cuantitativamente la llegada del *CFTR* a la membrana apical.

A Maine Fariello y Hugo Naya, de la Unidad de Bioinformática del Institut Pasteur de Montevideo, quienes colaboraron para realizar el análisis estadístico del sistema experimental diseñado.

Al Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas. A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), quien financió este proyecto (FMV_2009_1_2668) y beca de maestría. A la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) quien también financió mis estudios de maestría.

Finalmente, a todos los pacientes cuya historia fue analizada en este trabajo.

10. Bibliografía

1. Grody WW, Cutting GR, Klinger KW, Richards CS, Watson MS, Desnick RJ: **Laboratory standards and guidelines for population-based cystic fibrosis carrier screening.** *Genet Med* 2001, **3**(2):149-154.
2. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC: **Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis.** *Science* 1989, **245**(4922):1073-1080.
3. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL *et al*: **Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA.** *Science* 1989, **245**(4922):1066-1073.
4. Ratjen FA: **Cystic fibrosis: pathogenesis and future treatment strategies.** *Respir Care* 2009, **54**(5):595-605.
5. De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J, Sinaasappel M: **Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms.** *Thorax* 2006, **61**(7):627-635.
6. Moskowitz SM, Chmiel JF, Stern DL, Cheng E, Gibson RL, Marshall SG, Cutting GR: **Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders.** *Genet Med* 2008, **10**(12):851-868.
7. Ooi MJCaCY: **Pancreatitis in Cystic Fibrosis and CFTR-Related Disorder.** In: *Acute Pancreatitis*. Edited by Rodrigo PL: InTech; 2012.
8. Chan HC, Ruan YC, He Q, Chen MH, Chen H, Xu WM, Chen WY, Xie C, Zhang XH, Zhou Z: **The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in reproductive health and disease.** *J Physiol* 2009, **587**(Pt 10):2187-2195.
9. Boyle MP: **Nonclassic cystic fibrosis and CFTR-related diseases.** *Curr Opin Pulm Med* 2003, **9**(6):498-503.
10. <http://www.nhlbi.nih.gov>
11. Amaral MD, Kunzelmann K: **Molecular targeting of CFTR as a therapeutic approach to cystic fibrosis.** *Trends Pharmacol Sci* 2007, **28**(7):334-341.
12. Castellani C, Cuppens H, Macek M, Jr., Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael BM, Bombieri C, Brown A *et al*: **Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice.** *J Cyst Fibros* 2008, **7**(3):179-196.
13. Antunovic SS, Lukac M, Vujovic D: **Longitudinal cystic fibrosis care.** *Clin Pharmacol Ther* 2012, **93**(1):86-97.
14. Rosenstein BJ, Cutting GR: **The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel.** *J Pediatr* 1998, **132**(4):589-595.
15. Gibson LE, Cooke RE: **A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis.** *Pediatrics* 1959, **23**(3):545-549.
16. Zielenski J: **Genotype and phenotype in cystic fibrosis.** *Respiration* 2000, **67**(2):117-133.
17. **Online Mendelian Inheritance in Man** [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>]
18. Dequeker E, Stuhrmann M, Morris MA, Casals T, Castellani C, Claustres M, Cuppens H, des Georges M, Ferec C, Macek M *et al*: **Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders--updated European recommendations.** *Eur J Hum Genet* 2009, **17**(1):51-65.
19. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N *et al*: **Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping.** *Science* 1989, **245**(4922):1059-1065.
20. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW: **GenBank.** *Nucleic Acids Res* 2013, **41**(Database issue):D36-42.
21. Hwang TC, Sheppard DN: **Gating of the CFTR Cl⁻ channel by ATP-driven nucleotide-binding domain dimerisation.** *J Physiol* 2009, **587**(Pt 10):2151-2161.
22. Mornon JP, Lehn P, Callebaut I: **Molecular models of the open and closed states of the whole human CFTR protein.** *Cell Mol Life Sci* 2009, **66**(21):3469-3486.
23. Serohijos AW, Hegedus T, Aleksandrov AA, He L, Cui L, Dokholyan NV, Riordan JR: **Phenylalanine-508 mediates a cytoplasmic-membrane domain contact in the CFTR**

- 3D structure crucial to assembly and channel function.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(9):3256-3261.
24. Lewis HA, Buchanan SG, Burley SK, Conners K, Dickey M, Dorwart M, Fowler R, Gao X, Guggino WB, Hendrickson WA *et al*: **Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.** *EMBO J* 2004, **23**(2):282-293.
 25. Lewis HA, Zhao X, Wang C, Sauder JM, Rooney I, Noland BW, Lorimer D, Kearins MC, Conners K, Condon B *et al*: **Impact of the deltaF508 mutation in first nucleotide-binding domain of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator on domain folding and structure.** *J Biol Chem* 2005, **280**(2):1346-1353.
 26. Mornon JP, Lehn P, Callebaut I: **Atomic model of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: membrane-spanning domains and coupling interfaces.** *Cell Mol Life Sci* 2008, **65**(16):2594-2612.
 27. Eudes R, Lehn P, Ferec C, Mornon JP, Callebaut I: **Nucleotide binding domains of human CFTR: a structural classification of critical residues and disease-causing mutations.** *Cell Mol Life Sci* 2005, **62**(18):2112-2123.
 28. Ostedgaard LS, Baldursson O, Welsh MJ: **Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by its R domain.** *J Biol Chem* 2001, **276**(11):7689-7692.
 29. Ameen N, Silvis M, Bradbury NA: **Endocytic trafficking of CFTR in health and disease.** *J Cyst Fibros* 2007, **6**(1):1-14.
 30. Tsui L-C Z: **Cystic Fibrosis Mutation Database.** In.; 2007.
 31. Bobadilla JL, Macek M, Jr., Fine JP, Farrell PM: **Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening.** *Hum Mutat* 2002, **19**(6):575-606.
 32. Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Souza DW, White GA, O'Riordan CR, Smith AE: **Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis.** *Cell* 1990, **63**(4):827-834.
 33. Denning GM, Anderson MP, Amara JF, Marshall J, Smith AE, Welsh MJ: **Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive.** *Nature* 1992, **358**(6389):761-764.
 34. Cholon DM, O'Neal WK, Randell SH, Riordan JR, Gentsch M: **Modulation of endocytic trafficking and apical stability of CFTR in primary human airway epithelial cultures.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009, **298**(3):L304-314.
 35. Ledford H: **Drug bests cystic-fibrosis mutation.** *Nature* 2012, **482**(7384):145.
 36. Opar A: **Excitement mounts for first disease-modifying cystic fibrosis drugs.** *Nat Rev Drug Discov* 2011, **10**(7):479-480.
 37. Mak V, Jarvi KA, Zielenski J, Durie P, Tsui LC: **Higher proportion of intact exon 9 CFTR mRNA in nasal epithelium compared with vas deferens.** *Hum Mol Genet* 1997, **6**(12):2099-2107.
 38. Nissim-Rafinia M, Kerem B: **Splicing regulation as a potential genetic modifier.** *Trends Genet* 2002, **18**(3):123-127.
 39. Cuppens H, Lin W, Jaspers M, Costes B, Teng H, Vankeerberghen A, Jorissen M, Droogmans G, Reynaert I, Goossens M *et al*: **Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. The polymorphic (Tg)m locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation.** *J Clin Invest* 1998, **101**(2):487-496.
 40. **CFTR2** [<http://www.cftr2.org>]
 41. Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C: **Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease.** *Nat Rev Genet* 2011, **12**(10):683-691.
 42. Bulmer M: **Coevolution of codon usage and transfer RNA abundance.** *Nature* 1987, **325**(6106):728-730.

43. Duret L: **tRNA gene number and codon usage in the *C. elegans* genome are co-adapted for optimal translation of highly expressed genes.** *Trends Genet* 2000, **16**(7):287-289.
44. Ikemura T: **Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: a proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the *E. coli* translational system.** *J Mol Biol* 1981, **151**(3):389-409.
45. Cortazzo P, Cervenansky C, Marin M, Reiss C, Ehrlich R, Deana A: **Silent mutations affect in vivo protein folding in *Escherichia coli*.** *Biochem Biophys Res Commun* 2002, **293**(1):537-541.
46. Evans MS, Sander IM, Clark PL: **Cotranslational folding promotes beta-helix formation and avoids aggregation in vivo.** *J Mol Biol* 2008, **383**(3):683-692.
47. Junker M, Besingi RN, Clark PL: **Vectorial transport and folding of an autotransporter virulence protein during outer membrane secretion.** *Mol Microbiol* 2009, **71**(5):1323-1332.
48. Parmley JL, Huynen MA: **Clustering of codons with rare cognate tRNAs in human genes suggests an extra level of expression regulation.** *PLoS Genet* 2009, **5**(7):e1000548.
49. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM: **A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity.** *Science* 2007, **315**(5811):525-528.
50. Bartoszewski RA, Jablonsky M, Bartoszewska S, Stevenson L, Dai Q, Kappes J, Collawn JF, Bebok Z: **A synonymous single nucleotide polymorphism in Δ F508 CFTR alters the secondary structure of the mRNA and the expression of the mutant protein.** *J Biol Chem* 2010, **285**(37):28741-28748.
51. **Asociación Honoraria Fibrosis Quística Mucoviscidosis del Uruguay** [<http://www.fqdeluruguay.org/>]
52. Luzardo G, Aznarez I, Crispino B, Mimbacas A, Martinez L, Poggio R, Zielenski J, Tsui LC, Cardoso H: **Cystic fibrosis in Uruguay.** *Genet Mol Res* 2002, **1**(1):32-38.
53. Cardoso H, Crispino B, Mimbacas A, Cardoso ME: **A low prevalence of cystic fibrosis in Uruguayans of mainly European descent.** *Genet Mol Res* 2004, **3**(2):258-263.
54. Vaglio A, Pizzo L, Quadrelli A, Guecaimburú R, Pagano S, Quadrelli R: **Limitaciones de los estudios de genética molecular en el proceso diagnóstico de fibrosis quística.** *Revista Médica del Uruguay* 2011, **3**(27):9.
55. Sans M, Salzano FM, Chakraborty R: **Historical genetics in Uruguay: estimates of biological origins and their problems.** *Hum Biol* 1997, **69**(2):161-170.
56. Grimberg J, Nawoschik S, Belluscio L, McKee R, Turck A, Eisenberg A: **A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood.** *Nucleic Acids Res* 1989, **17**(20):8390.
57. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ: **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.** *Nucleic Acids Res* 1994, **22**(22):4673-4680.
58. Flicek P, Aken BL, Ballester B, Beal K, Bragin E, Brent S, Chen Y, Clapham P, Coates G, Fairley S et al: **Ensembl's 10th year.** *Nucleic Acids Res* 2010, **38**(Database issue):D557-562.
59. Durinck S, Moreau Y, Kasprzyk A, Davis S, De Moor B, Brazma A, Huber W: **BioMart and Bioconductor: a powerful link between biological databases and microarray data analysis.** *Bioinformatics* 2005, **21**(16):3439-3440.
60. Clarke Tft, Clark PL: **Rare codons cluster.** *PLoS One* 2008, **3**(10):e3412.
61. Yang Z: **PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood.** *Mol Biol Evol* 2007, **24**(8):1586-1591.

62. Letunic I, Bork P: **Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation.** *Bioinformatics* 2007, **23**(1):127-128.
63. Sambrook J: **Molecular Cloning A Laboratory Manual.**; 1989.
64. Team RC: **R: A Language and Environment for Statistical Computing.** 2012.
65. Crispino B MA, Cardoso H, Cabezas E: **Fibrosis quística: ¿Se presenta de la misma manera en Uruguay que en el Viejo Mundo? .** *Revista Médica del Uruguay* 1994, **10**:29-33.
66. LeGrys VA, Yankaskas JR, Quittell LM, Marshall BC, Mogayzel PJ, Jr.: **Diagnostic sweat testing: the Cystic Fibrosis Foundation guidelines.** *J Pediatr* 2007, **151**(1):85-89.
67. Mishra A, Greaves R, Massie J: **The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era.** *Clin Biochem Rev* 2005, **26**(4):135-153.
68. **Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium.** *N Engl J Med* 1993, **329**(18):1308-1313.
69. De Braekeleer M, Allard C, Leblanc JP, Aubin G, Simard F: **Correlation of sweat chloride concentration with genotypes in cystic fibrosis patients in Saguenay Lac-Saint-Jean, Quebec, Canada.** *Clin Biochem* 1998, **31**(1):33-36.
70. Kristidis P, Bozon D, Corey M, Markiewicz D, Rommens J, Tsui LC, Durie P: **Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis.** *Am J Hum Genet* 1992, **50**(6):1178-1184.
71. Chu CS, Trapnell BC, Curristin S, Cutting GR, Crystal RG: **Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA.** *Nat Genet* 1993, **3**(2):151-156.
72. Johnson LG, Olsen JC, Sarkadi B, Moore KL, Swanstrom R, Boucher RC: **Efficiency of gene transfer for restoration of normal airway epithelial function in cystic fibrosis.** *Nat Genet* 1992, **2**(1):21-25.
73. De Braekeleer M, Allard C, Leblanc JP, Simard F, Aubin G: **Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis patients compound heterozygous for the A455E mutation.** *Hum Genet* 1997, **101**(2):208-211.
74. Mekus F, Ballmann M, Bronsveld I, Dork T, Bijman J, Tummler B, Veeze HJ: **Cystic-fibrosis-like disease unrelated to the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.** *Hum Genet* 1998, **102**(5):582-586.
75. Groman JD, Meyer ME, Wilmott RW, Zeitlin PL, Cutting GR: **Variant cystic fibrosis phenotypes in the absence of CFTR mutations.** *N Engl J Med* 2002, **347**(6):401-407.
76. Mall M, Grubb BR, Harkema JR, O'Neal WK, Boucher RC: **Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice.** *Nat Med* 2004, **10**(5):487-493.
77. Bonizzato A, Bisceglia L, Marigo C, Nicolis E, Bombieri C, Castellani C, Borgo G, Zelante L, Mastella G, Cabrini G *et al*: **Analysis of the complete coding region of the CFTR gene in a cohort of CF patients from north-eastern Italy: identification of 90% of the mutations.** *Hum Genet* 1995, **95**(4):397-402.
78. Casals T, Ramos MD, Gimenez J, Larriba S, Nunes V, Estivill X: **High heterogeneity for cystic fibrosis in Spanish families: 75 mutations account for 90% of chromosomes.** *Hum Genet* 1997, **101**(3):365-370.
79. Bernardino AL, Ferri A, Passos-Bueno MR, Kim CE, Nakaie CM, Gomes CE, Damaceno N, Zatz M: **Molecular analysis in Brazilian cystic fibrosis patients reveals five novel mutations.** *Genet Test* 2000, **4**(1):69-74.
80. Orozco L, Velazquez R, Zielenski J, Tsui LC, Chavez M, Lezana JL, Saldana Y, Hernandez E, Carnevale A: **Spectrum of CFTR mutations in Mexican cystic fibrosis patients: identification of five novel mutations (W1098C, 846delT, P750L, 4160insGGGG and 297-1G-->A).** *Hum Genet* 2000, **106**(3):360-365.

81. Orozco L, Salcedo M, Lezana JL, Chavez M, Valdez H, Moreno M, Carnevale A: **Frequency of delta F508 in a Mexican sample of cystic fibrosis patients.** *J Med Genet* 1993, **30**(6):501-502.
82. Rios J, Orellana O, Aspillaga M, Avendano I, Largo I, Riveros N: **CFTR mutations in Chilean cystic fibrosis patients.** *Hum Genet* 1994, **94**(3):291-294.
83. Visich A, Zielenski J, Castanos C, Diez G, Grenoville M, Segal E, Barreiro C, Tsui LC, Chertkoff L: **Complete screening of the CFTR gene in Argentine cystic fibrosis patients.** *Clin Genet* 2002, **61**(3):207-213.
84. Alonso MJ, Heine-Suner D, Calvo M, Rosell J, Gimenez J, Ramos MD, Telleria JJ, Palacio A, Estivill X, Casals T: **Spectrum of mutations in the CFTR gene in cystic fibrosis patients of Spanish ancestry.** *Ann Hum Genet* 2007, **71**(Pt 2):194-201.
85. Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, Durie PR, Legrys VA, Massie J, Parad RB *et al*: **Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report.** *J Pediatr* 2008, **153**(2):S4-S14.
86. Claustres M, Guittard C, Bozon D, Chevalier F, Verlingue C, Ferec C, Girodon E, Cazeneuve C, Bienvenu T, Lalau G *et al*: **Spectrum of CFTR mutations in cystic fibrosis and in congenital absence of the vas deferens in France.** *Hum Mutat* 2000, **16**(2):143-156.
87. Delaney SJ, Rich DP, Thomson SA, Hargrave MR, Lovelock PK, Welsh MJ, Wainwright BJ: **Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator splice variants are not conserved and fail to produce chloride channels.** *Nat Genet* 1993, **4**(4):426-431.
88. Rave-Harel N, Kerem E, Nissim-Rafinia M, Madjar I, Goshen R, Augarten A, Rahat A, Hurwitz A, Darvasi A, Kerem B: **The molecular basis of partial penetrance of splicing mutations in cystic fibrosis.** *Am J Hum Genet* 1997, **60**(1):87-94.
89. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR: **A method and server for predicting damaging missense mutations.** *Nat Methods* 2010, **7**(4):248-249.
90. Casals T, Bassas L, Egozcue S, Ramos MD, Gimenez J, Segura A, Garcia F, Carrera M, Larriba S, Sarquella J *et al*: **Heterogeneity for mutations in the CFTR gene and clinical correlations in patients with congenital absence of the vas deferens.** *Hum Reprod* 2000, **15**(7):1476-1483.
91. Castellani C, Benetazzo MG, Tamanini A, Begnini A, Mastella G, Pignatti P: **Analysis of the entire coding region of the cystic fibrosis transmembrane regulator gene in neonatal hypertrypsinaemia with normal sweat test.** *J Med Genet* 2001, **38**(3):202-205.
92. Girodon E, Cazeneuve C, Lebargy F, Chinet T, Costes B, Ghanem N, Martin J, Lemay S, Scheid P, Housset B *et al*: **CFTR gene mutations in adults with disseminated bronchiectasis.** *Eur J Hum Genet* 1997, **5**(3):149-155.
93. Gomez Lira M, Benetazzo MG, Marzari MG, Bombieri C, Belpinati F, Castellani C, Cavallini GC, Mastella G, Pignatti PF: **High frequency of cystic fibrosis transmembrane regulator mutation L997F in patients with recurrent idiopathic pancreatitis and in newborns with hypertrypsinemia.** *Am J Hum Genet* 2000, **66**(6):2013-2014.
94. Stanke F, Ballmann M, Bronsveld I, Dork T, Gallati S, Laabs U, Derichs N, Ritzka M, Posselt HG, Harms HK *et al*: **Diversity of the basic defect of homozygous CFTR mutation genotypes in humans.** *J Med Genet* 2008, **45**(1):47-54.
95. Lucarelli M, Narzi L, Pierandrei S, Bruno SM, Stamato A, d'Avanzo M, Strom R, Quattrucci S: **A new complex allele of the CFTR gene partially explains the variable phenotype of the L997F mutation.** *Genet Med* 2010, **12**(9):548-555.
96. Masson E, Le Marechal C, Levy P, Chuzhanova N, Ruszniewski P, Cooper DN, Chen JM, Ferec C: **Co-inheritance of a novel deletion of the entire SPINK1 gene with a CFTR missense mutation (L997F) in a family with chronic pancreatitis.** *Mol Genet Metab* 2007, **92**(1-2):168-175.

97. Audrezet MP, Chen JM, Le Marechal C, Ruzsniowski P, Robaszekiewicz M, Raguene O, Quere I, Scotet V, Ferec C: **Determination of the relative contribution of three genes- the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene, the cationic trypsinogen gene, and the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene- to the etiology of idiopathic chronic pancreatitis.** *Eur J Hum Genet* 2002, **10**(2):100-106.
98. Komar AA: **Genetics. SNPs, silent but not invisible.** *Science* 2007, **315**(5811):466-467.
99. Komar AA: **Silent SNPs: impact on gene function and phenotype.** *Pharmacogenomics* 2007, **8**(8):1075-1080.
100. Lampson BL, Pershing NL, Prinz JA, Lacsina JR, Marzluff WF, Nicchitta CV, Macalpine DM, Counter CM: **Rare Codons Regulate KRas Oncogenesis.** *Curr Biol* 2012.
101. Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR: **Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues.** *J Histochem Cytochem* 1990, **38**(9):1277-1287.
102. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE: **Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**(1):48-58.
103. Enquist K, Fransson M, Boekel C, Bengtsson I, Geiger K, Lang L, Pettersson A, Johansson S, von Heijne G, Nilsson I: **Membrane-integration characteristics of two ABC transporters, CFTR and P-glycoprotein.** *J Mol Biol* 2009, **387**(5):1153-1164.
104. Callebaut I, Eudes R, Mornon JP, Lehn P: **Nucleotide-binding domains of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: detailed sequence analysis and three-dimensional modeling of the heterodimer.** *Cell Mol Life Sci* 2004, **61**(2):230-242.
105. Zhang G, Ignatova Z: **Generic algorithm to predict the speed of translational elongation: implications for protein biogenesis.** *PLoS One* 2009, **4**(4):e5036.
106. Zhang G, Hubalewska M, Ignatova Z: **Transient ribosomal attenuation coordinates protein synthesis and co-translational folding.** *Nat Struct Mol Biol* 2009, **16**(3):274-280.
107. Zhou T, Weems M, Wilke CO: **Translationally optimal codons associate with structurally sensitive sites in proteins.** *Mol Biol Evol* 2009, **26**(7):1571-1580.
108. Haque A, Buratti E, Baralle FE: **Functional properties and evolutionary splicing constraints on a composite exonic regulatory element of splicing in CFTR exon 12.** *Nucleic Acids Res* 2010, **38**(2):647-659.
109. Pagani F, Buratti E, Stuani C, Baralle FE: **Missense, nonsense, and neutral mutations define juxtaposed regulatory elements of splicing in cystic fibrosis transmembrane regulator exon 9.** *J Biol Chem* 2003, **278**(29):26580-26588.
110. Pagani F, Raponi M, Baralle FE: **Synonymous mutations in CFTR exon 12 affect splicing and are not neutral in evolution.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(18):6368-6372.
111. Kitts A SS: **The Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) of Nucleotide Sequence Variation.** In: *The NCBI Handbook [Internet] National Center for Biotechnology Information (US)*. Edited by McEntyre J OJ. Bethesda (MD); 2002.
112. Modiano G, Bombieri C, Ciminelli BM, Belpinati F, Giorgi S, Georges M, Scotet V, Pompei F, Ciccacci C, Guittard C *et al*: **A large-scale study of the random variability of a coding sequence: a study on the CFTR gene.** *Eur J Hum Genet* 2005, **13**(2):184-192.
113. Skach W: **Cystic fibrosis methods and protocols.** Totowa, N.J.: Humana Press; 2002.
114. Krasnov KV, Tzetis M, Cheng J, Guggino WB, Cutting GR: **Localization studies of rare missense mutations in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) facilitate interpretation of genotype-phenotype relationships.** *Hum Mutat* 2008, **29**(11):1364-1372.
115. Vankeerberghen A, Wei L, Jaspers M, Cassiman JJ, Nilius B, Cuppens H: **Characterization of 19 disease-associated missense mutations in the regulatory domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.** *Hum Mol Genet* 1998, **7**(11):1761-1769.

116. Xiong X, Bragin A, Widdicombe JH, Cohn J, Skach WR: **Structural cues involved in endoplasmic reticulum degradation of G85E and G91R mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.** *J Clin Invest* 1997, **100**(5):1079-1088.
117. Granio O, Norez C, Ashbourne Excoffon KJ, Karp PH, Lusky M, Becq F, Boulanger P, Zabner J, Hong SS: **Cellular localization and activity of Ad-delivered GFP-CFTR in airway epithelial and tracheal cells.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007, **37**(6):631-639.
118. Otsu N: **A threshold selection method from gray-level histograms.** *IEEE Trans Sys, Man, Cyber* 1979, **1**(9):5.
119. Sedarat F, Lin E, Moore ED, Tibbits GF: **Deconvolution of confocal images of dihydropyridine and ryanodine receptors in developing cardiomyocytes.** *J Appl Physiol* 2004, **97**(3):1098-1103.
120. Biggs DS: **3D deconvolution microscopy.** *Curr Protoc Cytom* 2010, **Chapter 12**:Unit 12 19 11-20.
121. Gentsch M, Chang XB, Cui L, Wu Y, Ozols VV, Choudhury A, Pagano RE, Riordan JR: **Endocytic trafficking routes of wild type and DeltaF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.** *Mol Biol Cell* 2004, **15**(6):2684-2696.
122. Sharma M, Pampinella F, Nemes C, Benharouga M, So J, Du K, Bache KG, Papsin B, Zerangue N, Stenmark H *et al*: **Misfolding diverts CFTR from recycling to degradation: quality control at early endosomes.** *J Cell Biol* 2004, **164**(6):923-933.
123. Moyer BD, Denton J, Karlson KH, Reynolds D, Wang S, Mickle JE, Milewski M, Cutting GR, Guggino WB, Li M *et al*: **A PDZ-interacting domain in CFTR is an apical membrane polarization signal.** *J Clin Invest* 1999, **104**(10):1353-1361.
124. Almaca J, Dahimene S, Appel N, Conrad C, Kunzelmann K, Pepperkok R, Amaral MD: **Functional genomics assays to study CFTR traffic and ENaC function.** *Methods Mol Biol* 2011, **742**:249-264.
125. Nakamura Y, Gojobori T, Ikemura T: **Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000.** *Nucleic Acids Res* 2000, **28**(1):292.