

Frecuencia de la mutación F508 en pacientes venezolanos afectados con fibrosis quística.

Alisandra Morales-Machin, Lisbeth Borjas-Fajardo, Lennie Pineda, Sandra González, Wilmer Delgado, Wiliam Zabala y Erika Fernández.

Unidad de Genética Médica, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

Palabras clave: Fibrosis quística, mutación F508, reacción en cadena de la polimerasa.

Resumen. La Fibrosis Quística (FQ), es la enfermedad autosómica recesiva severa más frecuente en poblaciones caucásicas, en las que tiene una incidencia de 1/2500 individuos. Se caracteriza por una alteración generalizada de las glándulas exocrinas y es producida por más de mil mutaciones de un gen localizado en la región 7q31, que codifica una proteína llamada Regulador de la Conductancia Transmembrana de FQ (RCTFQ). La mutación más frecuente es la F508, que consiste en la delección del codón que codifica a la fenilalanina en la posición 508. El objetivo de este trabajo fue determinar la frecuencia de la mutación F508 en pacientes venezolanos afectados con FQ mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP). Se estudiaron 30 pacientes pertenecientes a 28 familias, que por clínica y 2 determinaciones de cloruros en sudor > 60 meq/L fueron diagnosticados como afectados con FQ. La detección de la mutación se realizó a partir de amplificación por RCP de un segmento del gen de FQ de 98 pares de bases (pb) que contiene el codón que codifica a la fenilalanina en la posición 508 y el cual está ausente en los que tienen la mutación. La frecuencia del alelo F508 fue de 26,79%, distribuidos en 6 homocigotos F508 y 7 heterocigotos compuestos F508/X. El resto de las mutaciones, no F508, representaron el 73,21%. La frecuencia del alelo F508 en esta muestra es menor a la reportada en países europeos. En América Latina se ha observado una gran heterogeneidad en su frecuencia, esta variación podría explicarse por los diferentes patrones de mestizaje dados por migración externa y de las alteraciones moleculares de FQ que existen en la población que se analice. En este trabajo, la mutación F508 proviene de abuelos en su mayoría (79,41%) nacidos en países mediterráneos y en Colombia y en las no F508, los abuelos son nacidos preferentemente en Venezuela (79,27%) y Colombia (17,07%).

Frequency of F508 mutation in Venezuelan patients with cystic fibrosis.

Invest Clín 2004; 45(2): 121 - 130

Key words: Cystic fibrosis, F508 mutation, polymerase chain reaction.

Abstract. Cystic Fibrosis (CF) is the most common and severe autosomal recessive disease in Caucasian populations, with an incidence of 1 in 2500 live births. It is characterized by a generalized disturbance in exocrine glands and it is caused by over one thousand mutations at the cystic fibrosis conductance regulator gene (CFTR) mapped at 7q31. F508 is the most frequent mutation worldwide and it consists in a deletion of the codon that encodes phenylalanine at the 508 protein's position. The aim of this study was to determine the frequency of the F508 mutation in Venezuelan patients with CF using the Polymerase Chain Reaction (PCR). We studied thirty patients of twenty eight families who were diagnosed with CF based on their clinical features and sweat chloride level > 60 mEq/l in two determinations. Detection of the mutation was performed from the amplification of a 98 pair of bases (pb) CF gene segment which contains the codon that encodes phenylalanine in the 508 position by PCR. This PCR product is absent in those who have the mutation. The F508 allelic frequency was 26.79%, distributed in six homozygous and seven compound heterozygote F508/X. The remainder mutations (no F508) represent 73.21%. The F508 frequency in our sample is less than the reported in European countries. On the other hand, a F508 frequency highly heterogeneous has been observed in Latin-American countries. This variation results from mixed populations with a different genetic background influenced by external migration and CF molecular alterations, which exists in the analyzed populations. In this study, the F508 mutation comes mainly from grandparents (79.41%) who were born in Mediterranean countries and Colombia, while the no F508 mutations come from grandparents who were born in Venezuela (79.27%) and Colombia (17.07%).

Recibido: 06-06-2002. Aceptado: 19-01-2004.

INTRODUCCIÓN

La Fibrosis Quística (FQ), es la enfermedad autosómica recesiva severa más frecuente en la población blanca, con una incidencia de 1 en 2.500 nacidos vivos y una frecuencia de portadores de 1 en 25 (1-4).

En Venezuela se ha publicado que la frecuencia del fenotipo en la población general es de 1 en 42.733, y la frecuencia estimada de portadores es de 1 en 104 personas (5).

La FQ cursa con un incremento de la viscosidad del moco en diferentes órganos, con síntomas de carácter predominantemente gastrointestinal, pulmonar obstructivo crónico y genitourinario, manifestándose en la piel por sudor con alto contenido de sal. Es una enfermedad con variabilidad fenotípica que puede simular varios cuadros clínicos (6-8). Dada la gran variabilidad clínica de la FQ, se han establecido criterios diagnósticos, tales como: presentar una o

más características fenotípicas de FQ, o historia de FQ en hermanos o primos hermanos, o un examen de pesquizaje neonatal positivo para FQ (elevación de los niveles séricos de tripsina inmunoreactiva) junto a un incremento en la concentración de Cl⁻ en sudor mayor de 60 meq/L utilizando la técnica de Iontoforesis con Pilocarpina en dos o más ocasiones, o identificación de dos mutaciones en ambos alelos del gen de FQ, o diferencia de potencial nasal alterado (9,10).

El gen de la FQ fue identificado en la banda 31 del brazo largo del cromosoma 7 (7q31) en el año 1985 y fue clonado en el año 1989 (11-14). Mide 250 kilobases (Kb), tiene 27 exones y codifica una proteína llamada regulador de la conductancia transmembrana de FQ (RCTFQ) que funciona como un canal de cloro (15, 16). Han sido reportadas más de 1000 mutaciones causantes de la enfermedad y sus frecuencias varían en las diferentes poblaciones (9, 17). La mutación más frecuente a nivel mundial (66%) (18) es la denominada F508, que consiste en la deleción de 3 pares de bases (pb) en el gen, resultando en la deleción del aminoácido fenilalanina en la posición 508 de la proteína. La distribución geográfica en gradiente de este alelo en Europa muestra un gradiente noroeste-sureste con una frecuencia máxima, en Dinamarca (87,2%) (19) y mínima en Turquía (21,3%) (20). Para explicar este hecho se han planteado dos hipótesis complementarias apoyadas por evidencias de tipo experimental y poblacional, respectivamente. La primera sugiere que existe una ventaja selectiva de los heterocigotos, quienes estarían protegidos de la acción deshidratante de las enterotoxinas del *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhi* (21-24) y esta protección haría que la presión selectiva aumentara la frecuencia de FQ fuera de Europa, donde esas enfermedades son más prevalentes.

La segunda hipótesis, sugiere que el gradiente observado se debe a un efecto fundador. Según esta hipótesis, el alelo originado en las comunidades de agricultores procedentes del Asia Menor, se diseminó durante las migraciones y los procesos de sedentarización que comenzaron en el suroccidente del continente y avanzaron lentamente hacia el noroccidente, durante el período neolítico, que corresponde a un período temprano de la divergencia de las razas humanas y que, probablemente, fue favorecido por una ventaja selectiva para los heterocigotos. La hipótesis señalada, es apoyada por el fenómeno de desequilibrio de ligamiento entre el alelo F508 y varios haplotipos determinados por marcadores genéticos, entre los cuales el haplotipo B, revelado por las sondas KM19 y XV2C, ha sido el más analizado. Este fenómeno sugiere fuertemente la preservación ancestral de un segmento genómico que incluye al gen mutado (12, 22, 25).

El objetivo de este trabajo fue determinar la frecuencia de la mutación F508 en pacientes afectados con FQ, atendidos en la Unidad de Genética Médica de la Universidad del Zulia (UGM-LUZ) de Maracaibo, Venezuela, utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron 30 individuos, pertenecientes a 28 familias evaluadas en la Unidad de Genética Médica de la Universidad del Zulia, a quienes se les realizó historia clínica familiar y en los cuales se estableció el diagnóstico de FQ por la presencia de signos clínicos característicos y 2 determinaciones de Cl⁻ en sudor mayor de 60 mEq/L, utilizando la técnica de Iontoforesis con Pilocarpina (26). Así mismo, se estudiaron molecularmente los 56 progenitores de esos pacientes. Se utilizó un control negativo (C-) representado por un individuo vene-

zolano, sano, sin signos clínicos de FQ, con 2 determinaciones de Cl^- en sudor, menores de 60 mEq/L y con patrón molecular sin la mutación F508 y dos controles positivos; uno (C1+) obtenido de un afectado con FQ homocigoto para la mutación F508 y otro (C2+), obtenido de un afectado con FQ heterocigoto compuesto para la mutación F508. También se usó un control de sistema (CS) o mezcla de reacción sin ADN.

Se registró el lugar de nacimiento de los cuatro abuelos de los afectados, con la finalidad de conocer el probable origen geográfico de la mutación.

Para la realización de este trabajo, se contó con el consentimiento informado de las familias estudiadas y la aprobación del Comité de Bioética de la Unidad de Genética Médica de LUZ.

Para el análisis molecular de la mutación F508 se le extrajo a cada individuo 5 mL de sangre periférica anticoagulada con EDTA 5 mM, a la cual se le extrajo el ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico según la técnica Fenol Sevag (27).

La detección de la mutación F508 se realizó a través de la amplificación de parte del exon 10 del gen de FQ, mediante la RCP. Se utilizaron los iniciadores CF1 5'-GTT TTC CTG GAT TAT GCC TGG CAC- 3' y CF2 5'- GTT GGC ATG GTT TGA TGA CGC TTC- 3' donados por el Dr. Hugo Barrera, de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Monterrey, México. Estos iniciadores constan de 24 bases cada uno y limitan un segmento de 98 pb en cuyo interior se localiza el codón que codifica para el aminoácido fenilalanina en la posición 508. El montaje de la RCP se realizó con 200 ng de ADN genómico en un volumen de 45 μL de reacción, conteniendo 25,2 μL de agua ultrapura, 5 μL de solución amortiguadora 10X, 5 μL de cada iniciador, 3 μL de MgCl_2 , 1,3 μL de dNTP's y 0,5 μL de Taq polimerasa por

cada reacción y se colocó en un controlador térmico programable PTC-100 de la MJ Research, Inc., con el siguiente programa: desnaturalización prolongada a 94°C durante 5 min y 30 ciclos de: desnaturalización a 94°C durante 1 min, alineamiento a 62°C durante 45 seg, extensión a 72°C durante 1 min y una extensión prolongada a 72°C de 12 min (28). Los productos de la amplificación se separaron por electroforesis vertical en gel de poliacrilamida al 12% en buffer Tris-EDTA-Borato 1 x.

Se utilizó como marcador de peso molecular el 174, digerido con Hae III. El gel se coloreó con una solución de 5 mg/mL de Bromuro de Etidio, se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta (Hoefer Mod. UVTM-25) y se tomó fotografía con película Polaroid instantánea 667.

El alelo normal se evidenció por la presencia de un fragmento de 98 pb y el alelo mutado por un fragmento de 95 pb. En los heterocigotos se observaron dos bandas correspondientes a ambos fragmentos (95 y 98 pb) y dos bandas de mayor tamaño, correspondientes a los llamados heteroduplex, los cuales son el resultado del apareamiento de los 2 alelos.

La diferencia observada entre el trabajo de Arias y col. (28) y este trabajo fue valorada utilizando el estadístico d, y la diferencia de la frecuencia alélica entre varios países latinoamericanos y Venezuela se valoró con el estadístico χ^2 .

RESULTADOS

Se estudiaron 28 familias y se analizaron molecularmente 30 afectados con FQ. En 2 familias se estudiaron 2 hermanos afectados. En 5 familias se recogió antecedente de isonimia entre las parejas, observándose consanguinidad parental en 4.

En la Tabla I se observan los resultados obtenidos en el estudio molecular: 14,29% de los afectados con FQ resultaron homoci-

TABLE I
ESTUDIO MOLECULAR DE AFECTADOS CON FIBROSIS QUÍSTICA

Genotipos	Pacientes		Alelos (n)	Alelos F508		Alelos No F508 (X)	
	n	%		n	%	n	%
Homocigoto F508/ F508	4	14,29	8	8	14,29	0	0
Heterocigoto F508/no F508	7	25	14	7	12,5	7	12,5
No F508 (X/X)	17	60,71	34	0	0	34	60,71
Total	28	100	56	15	26,79	41	73,21

TABLE II
FRECUENCIA DE LA MUTACIÓN F508 EN DIFERENTES PAÍSES

Países	Afectados	Alelos	Frecuencia		Referencia
			N	%	
Argentina	114	228	130	57	35
Brasil	190	380	180	47	37
México	10	20	13	59,1	28
Chile	36	72	21	29,2	41
Cuba	72	144	49	34	38
Colombia	24	48	17	35,4	39
Venezuela	49	98	53	54	28
	28	56	15	26,79	Este trabajo

gotos para el alelo F508 (F508/ F508), 25% fueron heterocigotos compuestos F508/X, la X representa un alelo no F508 y 60,71% no se pudo evidenciar la presencia de alelos F508, por lo cual se asume la presencia de dos mutaciones no F508 o genotipo X/X.

La frecuencia del alelo F508 en los venezolanos afectados con FQ en este trabajo fue de 26,79%. En todos los progenitores de los homocigotos F508 y en 7 de los heterocigotos compuestos F508 fue corroborada la presencia de la mutación F508. El 73,21% de los alelos restantes eran no F508 (X).

En la Tabla II se observa la frecuencia de la mutación F508 en diferentes países latinoamericanos incluyendo Venezuela.

En la Fig. 1 se muestra el patrón molecular de los afectados homocigotos F508/ F508, de los heterocigotos compuestos F508/X y de los afectados en cuyo patrón molecular no se detectó la mutación F508.

La Fig. 2 representa la procedencia probable de las mutaciones de FQ, la cual fue determinada a través del lugar de nacimiento de los abuelos de los afectados, localizados en 5 países: Venezuela, Colombia, España, Italia y Portugal. Los 19 alelos F508 provinieron de familias cuyos abuelos en un 55,88% eran nacidos en Colombia, 23,53% en Europa y 20,59% en Venezuela; en 2 alelos no se logró determinar el lugar de origen. Los alelos no F508, mayoritariamente correspondieron a 79,27% fa-

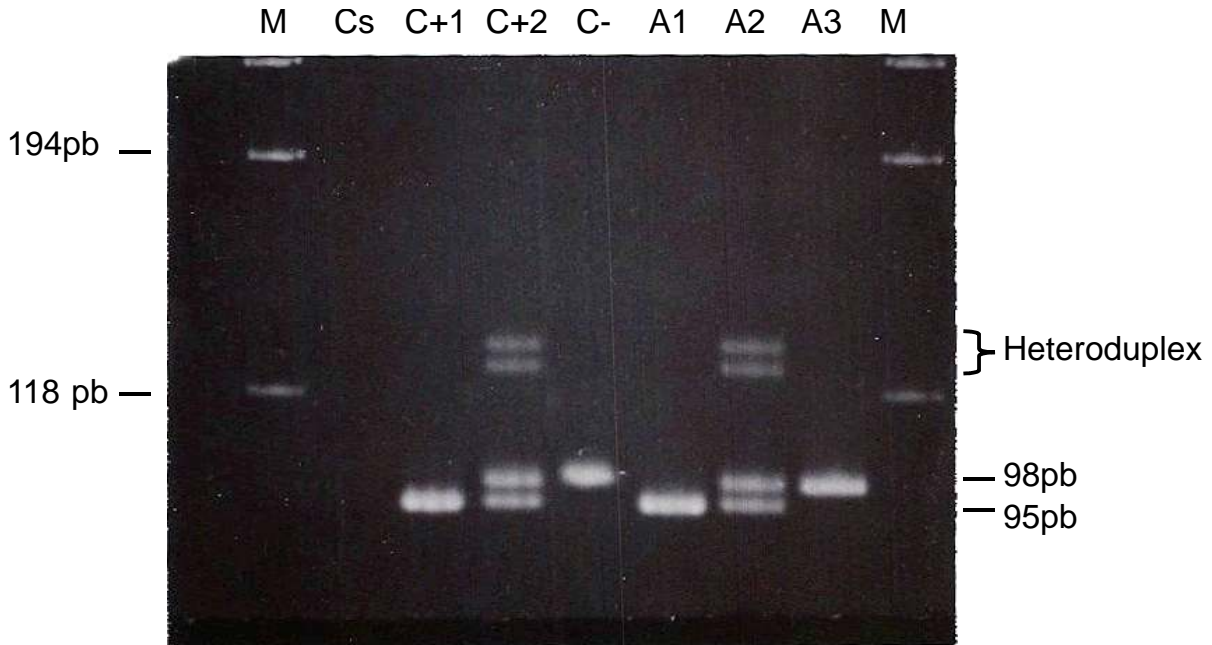


Fig. 1. Diagnóstico molecular de la mutación F508 en afectados con Fibrosis Quística. M: Marcador de peso molecular (174 digerido con Hae III). Cs: Control de sistema (mezcla de reacción sin ADN). C+1: Control positivo 1 (afectado con Fibrosis Quística, homocigoto F508/ F508). C+2: Control positivo 2 (afectado con Fibrosis Quística, Heterocigoto compuesto F508/X). C-: Control negativo (individuo sin Fibrosis Quística). A1: Patrón molecular de afectado con Fibrosis Quística homocigoto F508/ F508. A2: Patrón molecular de afectado con Fibrosis Quística heterocigoto compuesto F508/X. A3: Patrón molecular de afectado con Fibrosis Quística sin la mutación F508 (X/X). Heteroduplex: Dos bandas de mayor tamaño, las cuales son el resultado del apareamiento del fragmento de 95 y de 98 pb.

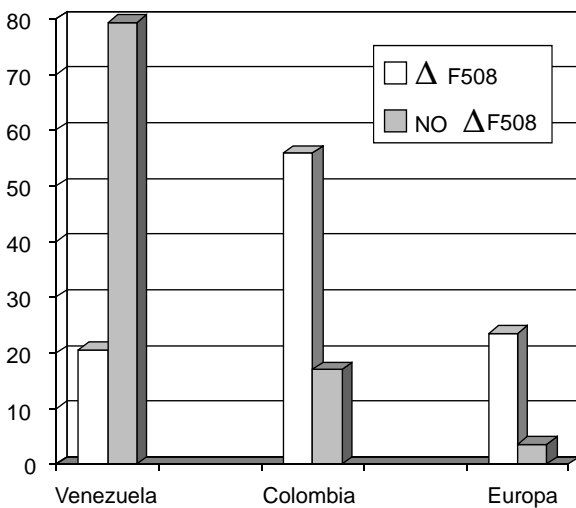


Fig. 2. Lugar de nacimiento de los abuelos de los pacientes afectados con Fibrosis Quística.

milias con abuelos nacidos en Venezuela, 17,07% de Colombia y 3,66% de Europa.

DISCUSIÓN

La mutación F508 es la alteración molecular más frecuente en los pacientes con FQ. Varios estudios han demostrado una variación considerable en la distribución de la mutación F508 en diferentes poblaciones. Entre las poblaciones con mayor frecuencia reportada se encuentran: Dinamarca 88% (19), Bélgica y Francia 80% (3, 30) y Norteamérica 75% (11). En Europa esta frecuencia decrece progresivamente hacia la zona del Mediterráneo siendo de 48 a 50,6% en España (31), 45 a 55% en Italia (32, 33) y 20,3 a 27% en Turquía (20, 34).

El rastreo de la mutación F508 en Latinoamérica resulta de particular interés, ya que es posible que este alelo haya sido introducido y diseminado a través de procesos de migración y mestizaje.

El primer reporte de la frecuencia del alelo F508 para las comunidades latinoamericanas fue un estudio realizado en Argentina, en el cual se analizaron principalmente descendientes de italianos y de otros grupos europeos, con una frecuencia del alelo F508 de 63% (35), en otro reporte más reciente se encontró una frecuencia de 57% (36). En México la frecuencia del alelo oscila entre 10% (37) y 50,1% (29). En Brasil, la frecuencia promedio reportada es de 47%, con marcada heterogeneidad intrapoblacional (38). En Cuba se ha reportado una frecuencia de 34% (39), en Colombia la frecuencia a nivel nacional varía entre 35,4% (40) y 48% (41) con variaciones en los diferentes departamentos y regiones estudiadas, con el valor más bajo de 25% en el Departamento Bolívar y el más alto 66,6% en Santander (41). En Chile la frecuencia es de 29,2% (42).

En relación a estos países latinoamericanos, se observa que la frecuencia en este estudio es significativamente baja si se compara con la reportada en Argentina (36) $p < 0,001$, Brasil (38) y México (29) $p < 0,01$. Con respecto a Chile, Cuba y Colombia no se observaron diferencias significativas en la distribución del alelo F508.

Como se observa, la frecuencia de la mutación F508 varía sustancialmente entre diferentes grupos poblacionales y étnicos. La variación de la frecuencia de esta mutación en Latinoamérica puede explicarse por el proceso de mestizaje iniciado después del descubrimiento de nuestro continente. Según reportes de varios investigadores la mayor fuente de mutaciones de FQ provino del Sur de Europa (43), que como se sabe tiene menor frecuencia de mutación F508 en relación con el Norte de Eu-

ropa. La mezcla con población negra también debe influir en la variación observada, así como el obviamente diferente ancestro indígena de las diferentes poblaciones que dieron asiento a distintas ondas migratorias.

La frecuencia de 26,79% del alelo F508 encontrada en la muestra de 56 cromosomas analizados en el presente estudio difiere significativamente de la reportada por Arias y col para pacientes venezolanos, quienes encuentran una frecuencia del alelo F508 de 54% (28) $d: 39,42; p < 0,01$. Estos resultados son sugerentes de que existen diferencias en la frecuencia del alelo F508 dependiendo de la población que se analice, pudiendo esto reflejar a su vez extracción étnica diferencial según localidad.

La composición de la población venezolana, es heterogénea, principalmente mestiza resultante de la mezcla racial entre europeos del Sur, nativos y de negros. La contribución de estos tres grupos puede explicar las variaciones en la frecuencia de la mutación F508.

Según el origen geográfico de los alelos con la mutación F508 en el gen de FQ, el cual fue determinado a través del lugar de nacimiento de los abuelos paternos y maternos de los afectados, en la muestra analizada solo el 20,59% de los abuelos de los pacientes con la mutación F508 eran de origen venezolano y el 55,88% eran de origen colombiano, seguidos de 23,53% de origen del Sur de Europa, de procedencia española e italiana. Mientras que en los pacientes con mutaciones no F508 (X), el porcentaje de abuelos venezolanos asciende a 79,27%.

La alta frecuencia de mutaciones de FQ No F508 detectadas (68,33%) en este estudio, nos sugiere la aplicación de análisis adicionales para determinar otras mutaciones ya reportadas y frecuentes en países tales como Africa, el sur de Europa y Colombia e incluso mutaciones propias de la región.

REFERENCIAS

1. Cutting G, Curristin S, Nash E, Rosenstein B, Lerer I, Abeliovich D, Hill A, Graham C. Analysis of four diverse population groups indicates that a subset of cystic fibrosis mutations occur in common among Caucasians. *Am J Hum Genet* 1992; 50:1185-1194.
2. Sferra T, Collins F. The molecular biology of cystic fibrosis. *Ann Rev Med* 1993; 44:133-144.
3. Simon-Bouy B, Mornet E, Serre J, Taillandier A, Boué J, Boué A. Nine mutations in the cystic fibrosis (CF) gene account for 80% of the CF chromosomes in French patients. *Clin Genet* 1991; 40:218-224.
4. Tsui I, Buchwald M. Biochemical and molecular genetics of cystic fibrosis. *Adv Hum Genet* 1991; 20: 153-263.
5. Rolo M. Experiencia diagnóstica con electrolitos del sudor en homocigotos y heterocigotos de fibrosis quística. Frecuencia y distribución de la enfermedad. (Resumen) *Memorias de Avances en Genética. V Congreso Venezolano de Genética* 1994; 109-113.
6. Borgo G, Cabrini G, Mastella G, Ronchetto P, Devoto M, Romeo G. Letter to the editor. Phenotypic intrafamilial heterogeneity in cystic fibrosis. *Clin Genet* 1993; 44:48-49.
7. Dean M, Santis G. Heterogeneity in the severity of cystic fibrosis and the role of CFTR gene mutations. *Hum Genet* 1994; 93: 364-368.
8. Sing C, Risser D, Howatt W, Erickson R. Phenotypic heterogeneity in cystic fibrosis. *Am J Med Genet* 1982; 13:179.
9. Vázquez C. Fibrosis quística de páncreas (mucoviscidosis): diagnóstico. En Pablo Sanjurjo, Antonio Baldellou, Eds. *Ergon S. A. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. Capítulo 47.* 2001; 505- 516.
10. Rosenstein B, Cutting G. The diagnosis of cystic fibrosis: A consensus statement. *J Pediatr.* 1998; 132: 589-595.
11. Kerem B, Rommens J, Buchanan J, Markiewicz D, Cox T, Chakravarti A, Buchwald M. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245: 1073-1080.
12. Rommens J, Zengerling S, Burns J, Melmer G, Kerem B, Plavsic N, Zsiga M, Kennedy D, Markiewicz D, Rozmahel R, Riordan J, Buchwald M, Tsui L. Identification and regional localization of DNA markers on chromosome 7 for the cloning of the cystic fibrosis gene. *Am J Hum Genet* 1988; 43: 645-663.
13. Riordan J, Rommens J, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou J, Drumm M, Iannuzzi M, Collins F, Tsui L. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science.* 1989; 245: 1066-1080.
14. Rommens J, Iannuzzi M, Kerem B, Drumm M, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole J, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan J, Tsui I, Collins F. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Research Articles* 1989; 1059-1065.
15. Anderson M, Gregory R, Thompson S, Souza D, Paul S, Mulligan R, Smith A, Welsh M. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 1991; 253:202-205.
16. Cheng S, Gregory R, Marshall J, Paul S, Souza D, White G, O'Riordan C, Smith A. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 1990; 63:827-834.
17. Kulczycki L, Kostuch M, Bellanti J. A clinical perspective of cystic fibrosis and new genetic findings: Relationship of CFTR mutations to genotype-phenotype manifestations. *Am J Med Genet* 2003; 116A: 262-267.
18. Bobadilla J, Macek M, Fine J, Farrel P. Cystic fibrosis: A worldwide análisis of CFTR mutations-correlation with incidente data and application to screening. *Hum Mut* 2002; 19:575-606.
19. Schwartz M, Johansen H, Koch C, Brandt N. Frequency of the F508 mutation on the cystic fibrosis chromosomes in Denmark. *Hum Genet* 1990; 85:427-428.

20. Hundrieser J, Bremer S, Peinemann F, Stuhmann M, Hoffknecht N, Wulf B, Schmidtke J. Frequency of the F508 deletion in the CFTR gene in Turkish cystic fibrosis patients. *Hum Genet* 1990; 85: 409-410.
21. Gabriel S, Brigman K, Koller B, Boucher R, Stutts M. Cystic Fibrosis heterozygote resistance to cholera toxin in the cystic fibrosis mouse model. *Science* 1994; 266: 107-109.
22. Baxter P, Goldhill J, Hardcastle J, Hardcastle P, Taylor C. Accounting for Cystic Fibrosis. *Nature* 1988; 335:211.
23. Behm J, Hagiwara G, Lewiston N, Quinton P, Wine J. Hyposecretion of beta-adrenergically induced sweating in cystic fibrosis heterozygotes. *Pediatr Res* 1987; 22:271-276.
24. Pier G, Grout M, Zaidi T, Meluleni G, Mueschenborn S, Banting G, Ratcliff R, Evans M, Colledge W. *Salmonella typhi* uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature* 1988; 339:79-82.
25. Romeo G, Devoto M, Galiotta LJ. Why is the cystic fibrosis gene so frequent? *Hum Genet.* 1989; 84: 1-5.
26. Gibson L, Cooke R. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing Pilocarpine by Iontoforesis. *Pediatrics* 1959; 545-549.
27. Barrera H. Aislamiento del ADN genómico por la técnica de la Proteínasa K-Fenol Sevag. En: Reacción en cadena de la polimerasa en el diagnóstico de las enfermedades hereditarias. Manual del curso teórico práctico. Universidad Autónoma de Nuevo León. 1993; 10-12.
28. Arias S, Rolo M, González N, Navas A, Ruggeri G. La mutación F508 constituye el 54% de los alelos patogénicos de CF en 49 familias Venezolanas estudiadas desde 1978. VI Congreso Venezolano de Genética. Sociedad Venezolana de Genética. Resúmenes de trabajos libres. 1995; 4.
29. Rojas A, Martínez R, Vásquez R, Gustinich S, Cantú J, Barrera H. Genética molecular de la fibrosis quística: el alelo F508 en familias mexicanas. *Bol Méd Hosp Infant Méx.* 1992; 49: 335-343.
30. Mercier B, Lissens W, Audrezet M, Bonduelle M, Liebaers I, Ferec C. Detection of more than 94% cystic fibrosis mutations in a sample of Belgian population and identification of four novel mutations. *Hum Mut* 1993; 2:16-20.
31. Estivill X, Chillón M, Casals T, Bosch A, Morral N, Nunes V, Gasparini P. F508 gene deletion in cystic fibrosis in Southern Europe. *Lancet* 1989; 2:1404.
32. Cremonesi I, Ruocco I, Seia M, Russo S, Giunta A, Ronchetto P, Fenu L. Frequency of the DF508 mutation in a sample of 175 Italian cystic fibrosis patients. *Hum Genet* 1990; 85:400-402.
33. Novelli G, Gasparini P, Savoia A, Pignatti P, Sangiulo F, Dalla - Piccola B. Polymorphic DNA haplotypes and F508 deletion in 212 Italian CF families. *Hum Genet* 1990; 85: 420-421.
34. Koprubasi F, Malik N, Bosch-Al-Jadoo N, Alkan M, Tanac R, Buhler E. Molecular genetic analysis of Turkish cystic fibrosis patients. *Ann Génét* 1993; 36:144-149.
35. The cystic fibrosis genetic analysis consortium. Worldwide survey of the F508 mutation report from the cystic fibrosis genetic analysis consortium. *Am J Hum Genet* 1990; 47: 354-359.
36. Chertkoff L, Visich A, Bienvenu T, Grenoville M, Segal E, Carniglia L, Kaplan J, Barreiro C. Spectrum of CFTR mutations in Argentine cystic fibrosis patients. *Clinical Genetics* 1997; 51: 43-47.
37. Flores S, Gallegos M, Morán M, Sánchez J. Tamizaje de 6 alelos en el gen de fibrosis quística (FQ) mediante amplificación simultánea y dot blot reverso en una muestra seleccionada. Ido. Congreso latinoamericano de Genética y 3ro. de mutagénesis, carcinogénesis, y teratogénesis ambiental. Puerto Vallarta. México. 1994; 131.
38. Raskin S, Phillips J, Krishnamani M, Vnencak-Jones C, Parkler R, Rozov T, Cardieri J, Marostica P, Abreu F, Giugliani R, Reis F, Rosario N, Ludwig N, Pilotto R. DNA analysis of cystic fibrosis in Brazil by direct PCR amplification from Guthrie cards. *Am J Med Genet* 1993; 46:665-669.

39. Collazo T, Magarino C, Chavez R, Suardiaz B, Gispert S, Gómez M, Rojo M, Heredero L. Frequency of Delta-F508 mutation and XV2C/KM19 haplotypes in Cuban cystic fibrosis families. *Hum Hered* 1995; 45:55-57.
40. Restrepo C, Pineda L, Rojas A, Gutierrez C, Morales-Machin A, Gómez y, Villalobos M, Borjas L, Delgado W, Myers A, Barrera-Saldaña H. CFTR mutations in three latin american countries. *Am J Med Genet* 2000; 91:277-279.
41. Keyeux G, Sánchez D, Garavito P, Stand I, Rodas C, Bienvenu T, Aristizábal G, Zarrante I, Prieto J, Anaya F, Aristizábal R, Barón O, Bermudez A, Bravo M, Cala I, Correa A, Dueñas E, Escamilla J, Naranjo M, Parra W, Plaza S, Ramirez M, Saa D, Sánchez A, Silva S, Ucrós S, Kaplan J, Bernal J. Estudios moleculares en pacientes colombianos con fibrosis quística. *Acta Méd Colomb* 1997; 22: 167-173.
42. Rios J, Orellana O, Aspillaga M, Avendaño I, Largo I, Rivero N. CFTR mutations in Chilean cystic fibrosis patients. *Hum Genet* 1994; 94: 291-294.
43. Arzimanoglou I, Tuchman A, Li Z, Gilbert F. Cystic fibrosis carrier screening in hispanics. *Am J Hum Genet* 1995; 56:544-547.